

Université de Lille – Nord de France
Ecole Doctorale Biologie – Santé de Lille (ED446)

THESE

Présentée par

Caroline EVRARD

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille

Spécialité : Neurosciences

Implication des systèmes de dégradation cellulaire, de la protéine VCP et de nouvelles molécules sur le métabolisme de l'APP : aspects fondamentaux et appliqués à la Maladie d'Alzheimer

Thèse dirigée par **M. le Dr. Nicolas SERGEANT**

Soutenue publiquement le 20 Novembre 2018 devant le jury composé de :

Mme. le Dr. Marie-Claude POTIER

Rapporteur

M. le Pr. Emmanuel MOYSE

Rapporteur

Mme. le Dr. Raphaëlle PARDOSSI-PIQUARD

Examineur

M. le Pr. Pascal KIENLEN-CAMPARD

Examineur

Mme le. Dr. Valérie VINGTDEUX-DIDIER

Examineur

A **Mum** depuis les nuages,

A **Dad** du haut de ton vélo

&

A **Pee-Wee** du haut de tes quatre pattes poilues.

Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier les membres de mon jury le **Dr. Marie-Claude Potier**, le **Dr. Raphaëlle Pardossi-Piquard**, le **Pr. Pascal Kienlen-Campard** et le **Pr. Emmanuel Moyse** pour m'avoir fait l'honneur de prendre part à ce jury et pour l'évaluation de mes travaux de thèse. Ainsi, je remercie le **Dr. Marie-Claude Potier** d'avoir accepté sans hésiter le rôle de rapporteur sans me connaître, pour la lecture et la correction de ce manuscrit. Je remercie également le **Dr. Raphaëlle Pardossi-Piquard** d'avoir participé au bon déroulement de ma thèse, pour votre aide scientifique et vos conseils à chaque fois que je vous ai sollicitée. Puis, je remercie le **Pr. Pascal Kienlen-Campard** d'avoir également été présent tout au long de ma thèse mais aussi de m'avoir accueillie dans son laboratoire. De même, j'en profite pour remercier **Bernadette Tasiaux** et **Rémi Opsomer** pour leur accueil chaleureux et leur aide lors de ma venue en Belgique. C'était un réel plaisir de travailler avec vous tous et je suis fière que cette collaboration ait abouti à la soumission d'un papier. Enfin, je te remercie **Emmanuel** de me faire l'honneur d'être rapporteur de ma thèse. Il s'agit de la suite logique après m'avoir aidée dans mon parcours universitaire du Master 2 jusqu'aujourd'hui. Tu es sincèrement le meilleur enseignant que je n'ai jamais connu à l'université car tu sais vraiment être disponible et tout faire pour tes étudiants. Tu as su m'aider pour en arriver jusqu'ici et je t'en suis vraiment reconnaissante.

Ensuite, je tiens à remercier particulièrement le **Dr Luc Buée** pour m'avoir accueillie au sein de son équipe durant ma thèse. Je vous remercie pour vos conseils et vos critiques qui ont su animer les réunions d'équipe et faire avancer mes travaux de thèse. Enfin, je vous remercie aussi pour votre incontournable et célèbre soupe de champagne de Noël.

Maintenant, vient le moment où je remercie le **Dr. Valérie 22**. Valérie, ça y est, je peux te tutoyer ? J'espère que oui, ou du moins, c'est ce que je vais faire dans mes remerciements. Il est vrai qu'au début de ma thèse je te tutoyais car tu mangeais avec nous le midi et que tu paraissais comme la chef accessible. Et puis, un jour, tu es arrivée dans mon bureau pour me dire que tu allais superviser mes travaux. Pour être honnête, je n'étais pas ravie au début. Mais finalement, tu es devenue ma « chef » et c'est moi qui suis plutôt tous les matins dans ton bureau. Je ne sais même pas par où commencer pour te remercier. Tu as toujours su être là pour des questions scientifiques comme personnelles. Ta porte était toujours ouverte et c'était fort agréable. Je te suis énormément reconnaissante car je pense honnêtement que sans toi, je ne serais pas arrivée à la fin de cette thèse. J'ai beaucoup appris de toi et tu m'as beaucoup impressionnée à passer de l'APP à l'AMPK en moins

de 5 sec. Tu as su reprendre en main les projets et me permettre d'être dans un brevet et plusieurs articles. Je suis tellement fière d'en être arrivée là et c'est en grande partie grâce à toi. Tu as été le parfait mentor qu'il me fallait ! Je te souhaite le meilleur pour la suite car tu es une personne avec de grandes qualités scientifiques et humaines. Tu mérites d'avoir un poste et je suis sûre que tu y arriveras ;)

Une grande partie de mes remerciements vont bien évidemment à mon cher directeur de thèse le **Dr. Nicolas Sergeant**. Tout d'abord, je vous remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir choisie comme candidate pour la thèse malgré le fait que vous ne me connaissiez pas. Je vous remercie d'avoir dirigé mes travaux et m'avoir donné cette liberté scientifique. Il est vrai que vous m'avez toujours laissé libre de faire ce que je voulais et c'était très agréable d'être indépendante et autonome. Je vous remercie pour vos conseils tout au long de ces 3 années. Vous avez su être de mon côté quand j'en ai eu besoin au laboratoire. Je vous remercie pour m'avoir permise d'aller jusqu'au bout de ma thèse et d'avoir contribué à ma réalisation scientifique. Finalement, je suis fière du travail que nous avons accompli.

Merci également aux docteurs **Valérie Buée-Scherrer, David Blum, Morvane Colin, Marie Galas, Malika Hamdane, Bruno Lefevbre, Didier Vieau** et **Bernard Sablonniere** pour leurs remarques pertinentes lors des réunions d'équipe. Je remercie particulièrement **Bruno** pour les discussions dans le L2 et **Bernard** pour vos danses endiablées à Noël.

Merci aux ITA : **Raphaëlle, Séverine** et **Sébastien**. Mention spéciale à **Sabiha** : merci d'avoir séché mes larmes un bon nombre de fois et d'avoir toujours été compréhensive avec moi. Tu as été d'une grande aide technique (même si tu m'as abandonnée :p) mais surtout morale ;)

Un grand merci aux copains du labo sans qui la vie aurait été plus morose. Merci à **Marie Albert**, j'espère que tu as finalement digéré la coupe du monde, que tu admires notre deuxième belle étoile et merci aussi pour tes supers gâteaux ! Merci à ma copine de rédaction **Mélissa Gilles**, c'était vraiment génial de se faire stresser mutuellement puis de se consoler en allant chercher des kinder bueno ou des muffins fourrés choco-noisettes ensemble. Dois-je remercier le collègue le plus désagréable du monde **Florian Vernon**. Bon, j'avoue qu'on se serait ennuyé sans te tacler tout le temps dans le bureau et je te remercie pour tes super énigmes personnalisées ;) Merci à **Mégane Williams**, je te souhaite beaucoup de courage parce qu'on va t'abandonner et qu'il n'y aura plus personne pour chanter du disney dans le bureau mais je suis sûre que tu feras une très belle thèse. Merci à la petite **Sarah**, toujours rigolote et pleine de gentillesse même trop ^^ Merci à **Théo**, le roi des blagues graveleuses même si je t'en veux d'avoir abandonné notre bureau. Trahison ! Disgrâce ! Merci

à **Claire** pour ses histoires et ses ragots mais aussi pour avoir affronté l'amiante du labo. Merci aux petits jeunes **Sarah G** et **Hamza**, à la coquine **Aude**, à **Clément**, à **Victoria**, à **Alejandro**, au petit **Alexandre**, à mon petit geek préféré **Kévin** pour nos balades à Euratech, à **Coco**, à **Matou**, à **Banban**, à **Domi**, pour les bons moments et les picolades partagées ici ou en dehors du labo. Merci à mon équipe d'accueil : **Manon**, mon petit M2 et travailleur préféré **Florent** et **Claudia** grâce à vous je sais désormais faire de magnifiques pochettes et je n'ai jamais manqué de rien ;)

Je tiens également à remercier les personnes qui gèrent notre quotidien et qui nous simplifient beaucoup la vie. Bien-sûr, je parle de toute l'équipe du secrétariat et de la laverie : **Céline Brand**, **Sophie Lesage**, **Nathalie Perrais**, **Michèle Revez**, **Thomas** et **Karim**. Merci les filles pour votre bonne humeur et vos sourires quand on vient vous embêter dans le bureau. Mention spéciale à **Nathalie** pour avoir réceptionné mes colis personnels de protéines ;) Merci aussi à **Charlotte** pour son sourire ☺ Enfin, je remercie aussi le **Dr. Guillemette Huet** pour m'avoir permise de faire du monitorat et pour m'avoir fait découvrir l'enseignement supérieur. Ce fut un réel plaisir d'apprendre un dosage simple à des étudiants même si cela me paraissait très compliqué au début.

Pour terminer ma partie laboratoire et université, je tiens à remercier l'université de Lille 2 pour avoir financé ma thèse ainsi que l'école doctorale et ses membres, et notamment, **François Delcroix** pour m'avoir aidé tout au long de ma thèse sur le plan administratif et qui a toujours su répondre à mes questions.

Maintenant, je souhaite remercier les personnes qui, en dehors du labo et souvent loin, comptent sincèrement pour moi et m'ont bien soutenu depuis plusieurs années ou ces derniers temps, enfin quand j'en ai eu besoin. Merci à **Clém0um0u** pour avoir été toujours là dans les bons comme dans les mauvais moments. Tu es vraiment l'une de mes meilleures amies enfin ma tween quoi ;) Merci à **Dania**, **Coralie** et **Lil0u** qui, malgré la distance, ont toujours pris de mes nouvelles, ont toujours su m'apporter du soutien et ont toujours su me faire rire. Merci à **Franck**, même si tu ne prends pas toujours de mes nouvelles ou mets 10 ans à répondre aux messages, je sais que je peux toujours compter sur toi et je suis vraiment ravie de te voir épanoui avec Audrey. Je vous souhaite plein de bonheur car tu le mérites et que tu es un mec génial, comme j'ai déjà dit, tu es l'homme idéal pour beaucoup ;) Merci à mon amie **Noémie** ou plutôt **Zoé** même si je ne t'écrirai pas un poème pour te remercier de ton amitié, je te remercie pour tes conseils de thésarde, ta compréhension envers moi et tous les bons moments qu'on a passé dans le Nord ou la capitale. Merci à celle qui restera toujours ma chef **Anne**, pour tout le soutien que tu m'as apporté dans l'année la plus difficile de ma vie, tu as su m'épauler et me permettre de réussir là où d'autres auraient arrêté. J'aurais aimé que tu passes ton HDR pour moi mais je suis sûre qu'un jour, tu trouveras un stagiaire avec presque autant de talent que moi, enfin, je te le souhaite ^^

Ensuite, même si je ne le connais pas et qu'il ne me connaît pas non plus, je souhaite remercier **Greg Glassman** pour avoir fondé le plus beau sport du monde : le Crossfit. Grâce à toi, j'ai enfin trouvé ma passion, une raison de me lever tôt le matin et un moyen de m'évader et de me surpasser. Bien que je n'aie pas encore fait toutes les box de Lille, j'ai enfin trouvé ma parfaite deuxième maison : Heresy. Vivement le chômage que j'y sois tous les jours toute la journée ! Merci à **Kenzo** et **Nathan** pour avoir créé une box formidable où l'on a envie de passer tout son temps, merci pour vos conseils et votre bienveillance, même blessée j'ai toujours pu woder et ça n'a pas de prix.

Si je parle de CF, j'en viens forcément à parler de mon binôme, ma team mate préférée et surtout une véritable amie : **Bénédicte**. Quand je repense au surnom que je t'ai donné à Domyos, je ne pensais pas que nous serions devenues amies par la suite. Tu me paraissais froide au début à noter toujours des choses sur ton cahier. Maintenant, je sais qu'il s'agissait seulement de PR à 20kgs en snatch ... alors que tu passes 30 aujourd'hui ^^ Tu peux vraiment être fière de tes progrès. J'ai hâte de te voir passer tes premières Pull Ups strictes ☺ En tous cas, je tiens à te remercier pour tout le soutien et la compréhension dont tu m'as fait part. Tu as toujours été là pour rire ou pleurer, pour me lyncher quand je ne savais pas t'assurer ou pour m'engueuler quand mon cardio faisait défaut. Grâce à toi, j'ai beaucoup progressé et je n'ose pas penser au jour où je devrai quitter la box. En tous cas, j'ai hâte qu'on se lance dans de nouvelles compétitions et qu'on fasse des MU bars synchro après avoir marché 20m en HSW (Over Head Walk). Ne change surtout pas en tous cas car tu es vraiment une belle personne dans tous les sens du terme. Je ne peux que te souhaiter de trouver ton Willy Georges parce que tu le mérites, pleins de PR, une belle carrière, enfin pleins de bonnes choses =)

Je tiens aussi à remercier ma petite **Amélie Haas** ou Mme Patate pour tous les fous rires à la box et autres conneries qu'on a su faire. J'ai découvert en toi une super fille adorable au grand cœur à qui je souhaite bien évidemment d'avoir un petit bébé dans les temps à venir !

Merci à MON copain **Thibaut** : un mec en or et toujours présent malgré ses défauts !

Enfin, je remercie tous ceux qui ont permis à mon intégration dans le Nord et qui m'ont fait oublier d'où je venais vraiment : **Jack, JB, Yves, Marion, Pauline, Mandy, Pierre, Vanessa, Antoine, Emma, Lysias**, tous les **coupains du CF** et **Belle-Moman**.

Pour finir ces remerciements plutôt « résumés » mais qui me tiennent à cœur, je vais terminer par ma famille de la personne la plus proche physiquement à la plus éloignée (et non pas, par ordre de préférence. Les kilomètres sont plus faciles à compter)

Merci à ma petite boule de poils **Pee-wee** ! Bien que certains puissent en rire, tu es mon plus fidèle compagnon et tu as le plus beau sourire du monde. Peu importe mon humeur, tu sais toujours

me faire la fête quand je rentre et tu sais me consoler quand il le faut. Tu représentes tellement d'amour et tu es tout simplement le plus beau cadeau que Mum m'ait donné. J'adore partager pleins de choses avec toi et te partager aussi avec Papa Loup. Je t'aime tout simplement mon petit Loup qui ronfle à côté de moi pendant que j'écris cela.

Merci à **TA** ! Je ne ferai pas la liste de toutes les choses pour lesquelles je te suis reconnaissante mais sache que sans toi, je n'en serai pas là. C'est vrai que sans toi, sans ton soutien, je n'aurai certainement pas été jusqu'au bout de ma thèse. Tu as su me supporter pendant bientôt 3 années. Trois ans de doutes, de ralages intempestifs et tu as toujours été là pour encaisser mon sale caractère. Je m'excuse encore pour toutes les fois où j'ai craqué et je te remercie de ta bienveillance, tes conseils et ton amour. Tu sais déjà tout ce que je pense de toi l'HDMV alors je ne m'étendrai pas plus. Je tiens juste à te remercier sincèrement car tu as été mon roc et mon soutien le plus fort durant cette thèse. J'ai maintenant hâte de pouvoir commencer cette nouvelle vie avec toi et de finir ma vie avec toi. Je t'aime TA <3 et n'oublie pas de m'épouser ;)

Merci à **Dad**, mon petit Papa Loup chéri d'amour ! Je n'aurai pas assez de ma vie pour te remercier pour tout. Il est certain que je n'en serai pas là sans toi, sans vous... Tu as toujours su me pousser et me motiver même si j'ai toujours eu du mal à croire en moi. « J'y arriverai pas... c'est trop dur... je veux arrêter... » : au sport, au lycée, à l'école, bref tu me comprends et tu as toujours été là. Je te remercie d'être le meilleur Papa du monde, de toujours tout faire et donner le meilleur pour moi. Je suis vraiment reconnaissante de ce que tu m'as permis d'accomplir et de la vie que j'ai eu grâce à toi. J'espère pouvoir te rendre toujours fière de moi car... moi je suis fière de toi, de tout ce que tu vas faire même de rien d'extraordinaire. Personne ne te remplacera <3 Tu es un père et un homme formidable. Je te souhaite le meilleur et d'être heureux. Je t'aime Papa <3

Merci à **Mum**, la femme de ma vie pour toujours et à jamais. J'aurai aimé que tu sois là, que tu me supportes pendant ces 3 ans mais tu as préféré fuir et me regarder du haut des nuages. Je crois que tu as bien fait de laisser ce fardeau à TA ^^ Je ne te remercierai jamais assez d'avoir été la meilleure Maman du monde et de m'avoir permise d'en arriver là. Avec Papa, vous avez toujours tout fait pour mon bien et mon bonheur. Je ne regrette rien de notre vie à 3 bien que je n'ai jamais eu Emilio le robot à Noël. Malgré tout, j'ai trouvé la force grâce à toi tout au long de ma thèse car tu es toujours là dans mon cœur, mon sang et mes mitochondries. J'espère que tu es fière de moi et du travail que j'ai accompli grâce aux études que tu m'as permises de faire. Je vais maintenant essayer de devenir une adulte aussi bien que toi sans jamais oublier tout ce que tu m'as appris. Je t'aime Mum <3

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative lente, progressive et irréversible. Elle est principalement caractérisée par deux lésions histopathologiques : les dégénérescences neurofibrillaires, causées par l'accumulation intraneuronale d'agrégats de protéines Tau hyper- et anormalement phosphorylées ; et les dépôts amyloïdes parenchymateux, constitués d'agrégats de peptides amyloïdes (A β) issus du clivage de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP). À ces deux lésions s'ajoute entre autres une dérégulation de l'homéostasie protéique et des systèmes de dégradation des protéines : protéasome, autophagie et voie endosome/lysosome qui sont les mécanismes principaux mis en jeu pour l'élimination des agrégats protéiques. Plusieurs études suggèrent que la surproduction et l'agrégation des peptides A β sont les causes principales de la MA. Ainsi, la réduction de leur production et/ou l'amélioration de leur clairance représentent des stratégies potentielles pour le développement de traitement contre la MA. Les objectifs de mes travaux de thèse furent d'étudier de façon plus approfondie l'implication respective des voies de dégradation de l'APP et de ses métabolites ; de déterminer le mode d'action biologique de dérivés chimiques de la chloroquine sur le métabolisme de l'APP en relation avec la Valosin-Containing protéine (VCP), supposée être la cible de ces molécules, et par la même occasion d'étudier la relation existante entre l'APP et VCP. Dans un premier temps, nous avons pu démontrer que l'APP et ses fragments carboxy-terminaux (APP-CTFs) étaient principalement dégradés par deux voies : la γ -sécrétase et la voie endo-lysosome. Ensuite, nous avons démontré que VCP régulait le trafic intracellulaire de l'APP. Enfin, nous avons découvert que l'action des molécules était indépendante de la protéine VCP et qu'il s'agissait de modulateurs indirects de l'activité β -sécrétase permettant ainsi de réduire la sécrétion de peptides A β . En conclusion, ces travaux ont permis de contribuer à une meilleure compréhension du métabolisme de l'APP et de ses processus de dégradation ainsi que de caractériser l'effet biologique de nouveaux inhibiteurs indirects de la β -sécrétase.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, APP, voie de dégradation, VCP, inhibiteurs indirects de la β -sécrétase.

Abstract

Implication of degradation systems, the Valosin-Containing Protein and new drugs on APP metabolism: fundamental and applied aspects to Alzheimer's Disease

Alzheimer's disease (AD) is a slow, progressive and irreversible neurodegenerative disease. There are two histopathological hallmarks found in AD brains: neurofibrillary tangles, caused by the intraneuronal accumulation of Tau protein aggregates in a hyper- and abnormally phosphorylated form; and amyloid deposits in the brain parenchyma which are mainly composed of amyloid peptides (A β) aggregates derived from the cleavage of the amyloid precursor protein (APP). AD physiopathology also includes a deregulation of protein homeostasis and degradation systems: proteasome, autophagy and the endosome/lysosome pathway, which are the main processes involved in the elimination of protein aggregates. Many evidences suggest that overproduction and aggregation of A β peptides are the main causes of AD and that strategies aiming to reduce their production and/or improve their clearance represent attractive approaches for AD therapeutics. Thus, this thesis aimed to study the respective contribution of γ -secretase, proteasome and lysosomes in APP degradation; to determine the biological mode of action of chloroquine derivatives on APP metabolism in relationship with the Valosin-Containing Protein (VCP), supposed to be the target of these molecules, and at the same time, to study the relationship between APP and VCP. First, we have demonstrated that APP and its carboxy-terminal fragments (APP-CTFs) were mainly degraded by two pathways: γ -secretase and the endosome/lysosome pathway. Next, we showed that VCP was involved in APP trafficking and processing. Finally, we have discovered that the action of our molecules does not depend on VCP but that they are indirect modulators of the β -secretase activity, reducing A β peptides secretion. In conclusion, this work contributed to a better understanding of APP metabolism and its degradation processes but also to characterize the biological effects of new indirect β -secretase inhibitors.

Key words: Alzheimer's disease, APP, degradation systems, VCP, β -secretase modulators.

Sommaire

Liste des abréviations.....	17
Index des figures et tableaux	19
Préambule	21
Introduction	23
Chapitre 1 : La Protéine Précurseur du Peptide Amyloïde	25
I. Gène et structure de l'APP.....	25
II. Les fonctions de l'APP.....	27
III. Les clivages de l'APP	32
IV. Dégradation de l'APP et de ses fragments.....	47
V. Mutation de l'APP et maladies associées	50
Chapitre 2 : La Maladie d'Alzheimer	54
I. Généralités.....	54
II. Origines et Causes	55
III. Clinique de la MA	58
IV. Caractéristiques biologiques et lésions de la MA	62
V. Stratégies thérapeutiques	76
Chapitre 3 : Des nouveaux composés anti-Alzheimer	83
I. Que sont ces nouveaux composés ?	83
II. Origine des MSBD.....	83
III. Les MSBD.....	85
Chapitre 4 : La protéine VCP	90
I. La protéine contenant de la Valosine.....	90
II. Les fonctions cellulaires de VCP.....	95
III. Les mutations de VCP et maladies associées.....	104
IV. VCP et la maladie d'Alzheimer	108
Objectifs	111
Objectifs scientifiques	113
Résultats	115

Partie 1 : Contribution de la voie endo-lysosomale et du système protéasomal à la dégradation de l'APP et de ses fragments carboxy-terminaux	117
I. Objectif de l'étude	117
II. Résultats	118
III. Discussion	120
Partie 2 : Détermination des effets biologiques des MSBD et leurs dérivés sur les processus pathologiques de la MA	122
I. Etude du rôle de VCP sur le métabolisme de l'APP.....	122
II. Implication de VCP dans l'effet des molécules.....	142
III. Mode d'action des MBSD et dérivés.....	146
Conclusion.....	153
Discussion générale	155
Conclusion.....	159
Références	161
Annexes	242
Annexe 1 : Revue « <i>Tau as a therapeutic target</i> »	244
Annexe 2 : Article « <i>New piperazine multi-effect drugs prevent neurofibrillary degeneration and amyloid deposition, and preserve memory in animal models of Alzheimer's disease</i> »	289

Liste des abréviations

AAC : Angiopathie Amyloïde Cérébrale

A β : Peptide β -amyloïde

ACE (*Angiotensin-Converting Enzyme*) :
Enzyme de conversion de l'angiotensine

AD (*Alzheimer's Disease*) : Maladie
d'Alzheimer

ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*) :
Désintégrine et métalloprotéase

ADP : Adénosine Diphosphate

AEP : Asparagine Endopeptidase

AICD (*APP Intracellular Domain*) : Domaine
intracellulaire de l'APP

ALS (*Amyotrophic Lateral Sclerosis*) :
Sclérose Latérale Amyotrophique

APLP (*Amyloid Precursor-Like Protein*) :
Protéine de type APP

ApoE : Apolipoprotéine E

APP (*Amyloid Precursor Protein*) : Protéine
précurseur du peptide amyloïde

ATP : Adénosine Triphosphate

BACE (*Beta-site APP-Cleaving Enzyme*) :
Enzyme clivant l'APP au site beta

C-ter : Carboxy-terminal

CTF (*Carboxy-Terminal Fragment*) :
Fragment Carboxy-terminal

CQ : Chloroquine

DNF : Dégénérescence Neurofibrillaire

ECE (*Endothelin-Converting Enzyme*) :
Enzyme de conversion de l'endothéline

EOAD (*Early Onset Alzheimer's Disease*) :
Formes précoces de la MA

ERAD (*Endoplamic Reticulum-Associated
Degradation*) : Dégradation associée au RE

FDG : Fluorodeoxyglucose

FTD (*Frontotemporal Demencia*) : Démence
fronto-temporale

IACHe : Inhibiteur de l'Acétylcholinestérase

IBMPFD (*Inclusion Body Myopathy with
Paget's disease of bone and Fronto-temporal
Dementia*) : Myopathie à corps d'inclusions
associée à la maladie osseuse de Paget et/ou à
la démence frontotemporale

IDE (*Insulin-Degrading enzyme*) : Enzyme de
dégradation de l'insuline

kDa : kilo Dalton

KPI (*Kunitz-type Protease Inhibitor*) :
Inhibiteur de protéase de type Kunitz

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LTP (*Long-Term Potentiation*) :
Potentialisation à long terme

MA : Maladie d'Alzheimer

MAP (*Microtubule Associated Protein*) :
Protéine associée aux microtubules

MSBD : Melnyk Sergeant Buée Delacourte

MT : Microtubule

MT-MPP (*Membrane-Type Matrix Metalloproteinase*) : Métalloprotéinase matricielle membranaire

MTP : Modification Post-Traductionnelle

NCT : Nicastrine

NEP : Neprilysine

NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate

NMJ (*Neuromuscular Junction*) : Jonction neuromusculaire

N-ter : Amino-terminal

PHF (*Paired Helical Filaments*) : Filaments appariés en hélice

PS : Présénilline

PSP : Paralyse Supranucléaire Progressive

P-tau : Forme phosphorylée de la protéine Tau

UPS (*Ubiquitin-proteasome system*) : Système ubiquine-protéasome

RE : Réticulum Endoplasmique

ROS (*Reactive Oxygen Species*) : Espèces réactives de l'oxygène

sAPP (*soluble APP*) : fragment soluble de l'APP

TGN (*Trans-Golgi Network*) : Réseau trans-Golgi

VCP (*Valosin-Containing Protein/p97*) : Protéine contenant de la valosine

Index des figures et tableaux

- Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la structure générale des trois isoformes principales de l'APP

Figure 2 : Trafic intracellulaire de l'APP

Figure 3 : Les voies classiques non-amyloïdogénique et amyloïdogénique de l'APP

Figure 4 : Les nouveaux clivages de l'APP

Figure 5 : Cartographie des mutations de l'APP

Figure 6 : Photographie d'Alois Alzheimer et de sa patiente Auguste Deter

Figure 7 : Séries d'IRM en coupe coronale d'un patient atteint de MA

Figure 8 : Consommation de glucose et détection de la charge amyloïde dans des cerveaux de patients Alzheimer comparés à des contrôles

Figure 9 : Dépôts de plaques amyloïdes dans des cerveaux de patients atteints de la MA

Figure 10 : Représentation des 5 phases de déposition des plaques amyloïdes dans la MA selon Thal

Figure 11 : Immuno-marquage de dégénérescences neurofibrillaires dans l'hippocampe d'un patient Alzheimer par la méthode PAP de Sternbefser

Figure 12 : Le gène *MAPT* humain et les 6 isoformes de la protéine Tau dans le cerveau humain

Figure 13 : Différentes fonctions de la protéine Tau dans le neurone

Figure 14 : Evolution de la distribution des dégénérescences neurofibrillaires au cours de la maladie d'Alzheimer

Figure 15 : Candidats médicaments en essais cliniques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer en 2018

Figure 16 : Structure chimique des MSDB

Figure 17 : Activité des MSBD dans des lignées cellulaires surexprimant de manière stable l'APP (SY5Y-APP^{695WT}) ou la protéine Tau (SY5Y-hTau46)

Figure 18 : Structure chimique de l'AZP2006

Figure 19 : Les sondes MSBD forment un complexe avec VCP

Figure 20 : Mise en évidence de la liaison de l'AZP2006 à VCP par RMN-STD

Figure 21 : Représentation schématique de la structure et du complexe l'hexamérique VCP/p97

Figure 22 : Modèle mécanistique du rôle de VCP dans le système Ubiquitine-Protéasome

Figure 23 : Implication de VCP dans la dégradation associée au réticulum endoplasmique

Figure 24 : Vue d'ensemble du processus d'autophagie

Figure 25 : Principales fonctions de VCP dans la cellule

Figure 26 : Structure chimique de MAG-S

Figure 27 : Etude de l'efficacité de MAG-S sur le métabolisme de l'APP après répression de l'expression de VCP ou inhibition de l'activité ATPasique de VCP par le NMS-873

Figure 28 : Représentation schématique du mode d'action du composé 31 (PEL)

- **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Propriétés des différents produits issus des clivages de l'APP par ses différentes sécrétases

Préambule

Désormais, nous vivons de plus en plus longtemps grâce à l'amélioration des conditions de vie et des services de santé, et ce, partout dans le monde. En effet, nous observons un vieillissement général de la population mondiale avec une espérance de vie allant désormais au-delà de 60 ans. Ce phénomène ne cesse de s'accélérer puisque le nombre de personnes âgées de plus de 60 ans devrait doubler d'ici 2050, ce qui représenterait 22% de la population mondiale contre 12% à ce jour (Organisation Mondiale de la Santé, 2018).

Bien que le vieillissement soit un processus biologique normal, il s'accompagne malheureusement d'un déclin des capacités physiques et mentales associé à un risque accru de maladies plus ou moins distinctes. Plus de 20% des personnes de plus de 60 ans souffrent de troubles neurologiques. Parmi ces atteintes neurologiques, la maladie d'Alzheimer (MA) représente la cause la plus fréquente de démence, à l'origine de 70 à 80% des cas. La démence est définie comme un syndrome caractérisé par une dégradation de la mémoire, du raisonnement, du comportement et de l'aptitude à réaliser les activités quotidiennes (Organisation Mondiale de la Santé, 2017).

Malgré l'apparition de la MA plus fréquente chez les personnes âgées, il ne s'agit pas d'un processus normal du vieillissement, même si l'âge représente le facteur de risque majeur. En effet, la MA est une véritable pathologie et représente un enjeu à la fois de santé publique mais aussi sociétal.

A l'heure actuelle, la MA est toujours une maladie incurable et les seuls traitements existants n'empêchent pas la progression de celle-ci, ils ne font que ralentir temporairement les déficits cognitifs ou les symptômes. C'est pourquoi une meilleure compréhension des mécanismes biologiques associés à la MA et la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques sont nécessaires. De même, il devient urgent de développer les recherches pour traiter cette maladie et améliorer les conditions de vie des patients atteints de la MA.

La MA est caractérisée par deux lésions histopathologiques que sont les plaques amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire. Les premières sont causées par l'accumulation dans le parenchyme cérébral de peptides A β , issus du clivage de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP, pour *Amyloid Precursor Protein*). La dégénérescence neurofibrillaire est, elle, le résultat de l'accumulation intraneuronale de la protéine Tau anormalement et hyperphosphorylée. Ces deux aspects ont donné lieu à de nombreuses études et découvertes concernant les mécanismes physiopathologiques de la MA ainsi que les rôles de l'APP et de Tau dans ces processus. Bien que l'APP et Tau représentent des

cibles thérapeutiques importantes, la recherche actuelle s'intéresse à tous les aspects de la MA pour prévenir cette pathologie.

Ainsi, ce travail de thèse s'inscrit d'une part dans une optique de recherche fondamentale en apportant de nouvelles données concernant le métabolisme de l'APP dont la dérégulation est à l'origine de l'une des deux lésions de la MA. D'autre part, ces travaux contribuent également au développement thérapeutique pour lutter contre la MA puisqu'ils s'intéressent à la compréhension de l'activité biologique de composés pharmacologiques sur les processus pathologiques de la MA. Enfin, une partie de ces travaux de thèse fut également consacrée à la compréhension du lien pouvant exister entre l'APP et VCP qui fut suggérée comme cible potentielle de ces composés pharmacologiques. Il s'agit d'une protéine clé de l'homéostasie cellulaire et des systèmes de dégradation cellulaire, eux aussi dérégulés dans la MA.

Introduction

Chapitre 1 : La Protéine Précurseur du Peptide Amyloïde

Le gène codant la protéine précurseur du peptide β -amyloïde ou APP, pour *Amyloid Precursor Protein*, fut identifié dans les années 80 comme étant à l'origine du constituant majeur des plaques amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (MA) : le célèbre peptide $A\beta$ (Glennner and Wong, 1984; Goldgaber *et al.*, 1987; Kang *et al.*, 1987; Tanzi *et al.*, 1987). Il s'agit ainsi de la première protéine associée à la MA et n'a depuis cessé de susciter d'intenses questionnements scientifiques. Il existe à ce jour environ 21 404 articles de recherches scientifiques disponibles dans PubMed associés à l'APP. En effet, comprendre le métabolisme et le fonctionnement physiologique de l'APP est d'une réelle pertinence dans le combat contre la MA.

Dans ce chapitre, nous allons présenter en détails l'APP, du gène à la protéine, son métabolisme et ses métabolites, leurs fonctions et localisations cellulaires ainsi que les mécanismes impliqués dans leur dégradation.

I. Gène et structure de l'APP

1. Le gène APP

L'APP, chez l'Homme, est codée par un seul gène porté par le chromosome 21q21.3 (Kang *et al.*, 1987). Il appartient à la famille des gènes APP, à laquelle sont également associés les gènes codant pour les protéines APLP1 et APLP2, pour *amyloid precursor-like protein 1 and 2*, chez les mammifères (Wasco *et al.*, 1993; Wasco, Brook and Tanzi, 1993). Bien qu'ils partagent des homologies de séquence, seul l'APP code pour le peptide $A\beta$.

L'APP possède 19 exons (au minimum 18) dont l'épissage alternatif des exons 7, 8 et 15 donne naissance à une dizaine d'isoformes variant de 365 à 770 acides aminés. Il existe trois isoformes majeures de l'APP : l'APP695, l'APP751 et l'APP770, différant par l'inclusion des exons 7 et/ou 8 ou non et pouvant toutes conduire à la production du peptide $A\beta$ (Yoshikai *et al.*, 1990; Zheng and Koo, 2006). Plusieurs mutations de l'APP sont d'ailleurs associées à la MA, sur lesquelles nous reviendrons plus tard dans ce chapitre.

L'APP est exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus humains mais des différences peuvent être observées selon les isoformes. En effet, les isoformes APP751 et 770 sont majoritairement

exprimées dans les cellules non neuronales alors que l'isoforme APP695 est spécifiquement retrouvée dans les neurones où elle y est fortement exprimée (Neve, Finch and Dawes, 1988; Golde *et al.*, 1990). Cette différence de localisation peut être associée à l'absence de l'exon 7 dans l'isoforme APP695, codant pour un domaine inhibiteur de sérine protéase de type Kunitz (KPI). Cependant, il n'y a encore que très peu d'explications à l'heure actuelle concernant cet épissage tissu-spécifique (Zheng and Koo, 2006; Nguyen, 2015).

2. Structure de l'APP

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire de type I, c'est-à-dire ne possédant qu'un seul segment transmembranaire, un segment extracellulaire amino-terminal (N-ter) et une partie intracellulaire carboxy-terminale (C-ter). Les isoformes de l'APP partagent toutes cette structure commune, plus ou moins longue, divisée en trois domaines (Figure 1).

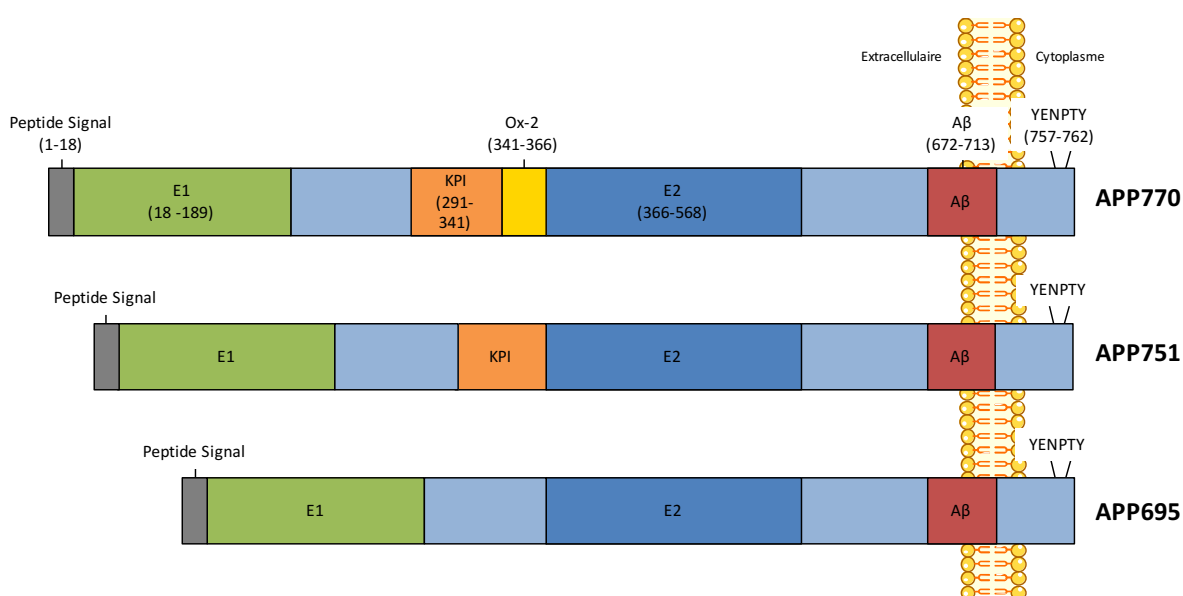


Figure 1 : Représentation schématique de la structure générale des trois isoformes principales de l'APP. L'APP peut être divisée en trois domaines : un domaine extracellulaire (N-ter), un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire (C-ter). Le domaine extracellulaire comporte un peptide signal (1-18), un domaine E1 riche en cystéine (18-190), un domaine KPI (291-341), un antigène Ox-2 (341-366), un domaine E2 (366-568) ainsi qu'une partie du segment Aβ (672-713) pour l'APP770. L'APP751 ne possède pas de domaine Ox-2 et l'APP695 ne possède ni le domaine KPI ni le domaine Ox-2. Le domaine intracellulaire court contient un motif d'internalisation YENPTY. Inspirée de (Müller, Deller and Korte, 2017).

La longue partie N-ter extracellulaire de l'APP (exon 1-17) comporte un peptide signal, un domaine E1, suivi d'une région riche en acides aminés acides, un domaine KPI (pour l'APP751 et l'APP770) et/ou un antigène Ox-2 (pour l'APP770) et un domaine E2. La séquence du peptide A β (exon 16-17), variant de 35 à 42 acides aminés, est contenue d'une part dans la région C-ter du domaine E2 et d'autre part dans la partie transmembranaire de l'APP (exon 17-18). La structure de l'APP se termine par un domaine C-ter intracellulaire relativement court (exon 17-18), qui possède plusieurs sites de phosphorylation et un motif conservé YENPTY lui permettant d'être internalisée et d'interagir avec de nombreux partenaires (Zheng and Koo, 2006; Coburger, Hoefgen and Than, 2014; Nguyen, 2015).

De par sa structure transmembranaire et sa courte demi-vie, l'APP semble être une protéine plutôt régulatrice que structurelle et possède plusieurs fonctions en rapport avec le domaine extracellulaire ou intracellulaire de la cellule que nous allons développer plus précisément.

II. Les fonctions de l'APP

L'APP, dans sa forme entière et mature, s'est vu attribuée de nombreuses fonctions depuis sa découverte mais il n'existe pas encore de consensus exact pour décrire toutes ses fonctions. Cela s'explique, en partie, parce que les recherches ont porté majoritairement sur les propriétés amyloïdogéniques et la toxicité des peptides A β , avec une attention moindre portée aux aspects physiologiques de l'APP et de ses métabolites. Nous allons ainsi présenter ci-dessous les principales fonctions qui sont attribuées à la forme totale de l'APP (*Full-length*), une autre partie sera exclusivement dédiée à ses différents produits de clivage.

1. Maturation et trafic intracellulaire de l'APP

Une fois synthétisée, l'APP peut subir plusieurs modifications post-traductionnelles (MPT) telles que la N-glycosylation, la O-glycosylation, la phosphorylation (dont la plus étudiée est celle de la thréonine 668), la palmitoylation, l'ubiquitylation, la sumoylation ou encore la sulfatation. Ces MPT sont très importantes pour l'APP puisqu'elles régulent son métabolisme en jouant sur son trafic intracellulaire, ses clivages et/ou sa dégradation (Vingtdeux *et al.*, 2005; Feyt *et al.*, 2007; X. Wang *et al.*, 2017). C'est en transitant successivement à travers le réticulum endoplasmique (RE) puis l'appareil

de Golgi (Golgi) avant de rejoindre la voie sécrétoire, que ces MPT ont lieu (Weidemann *et al.*, 1989; Lyckman *et al.*, 1998; X. Wang *et al.*, 2017).

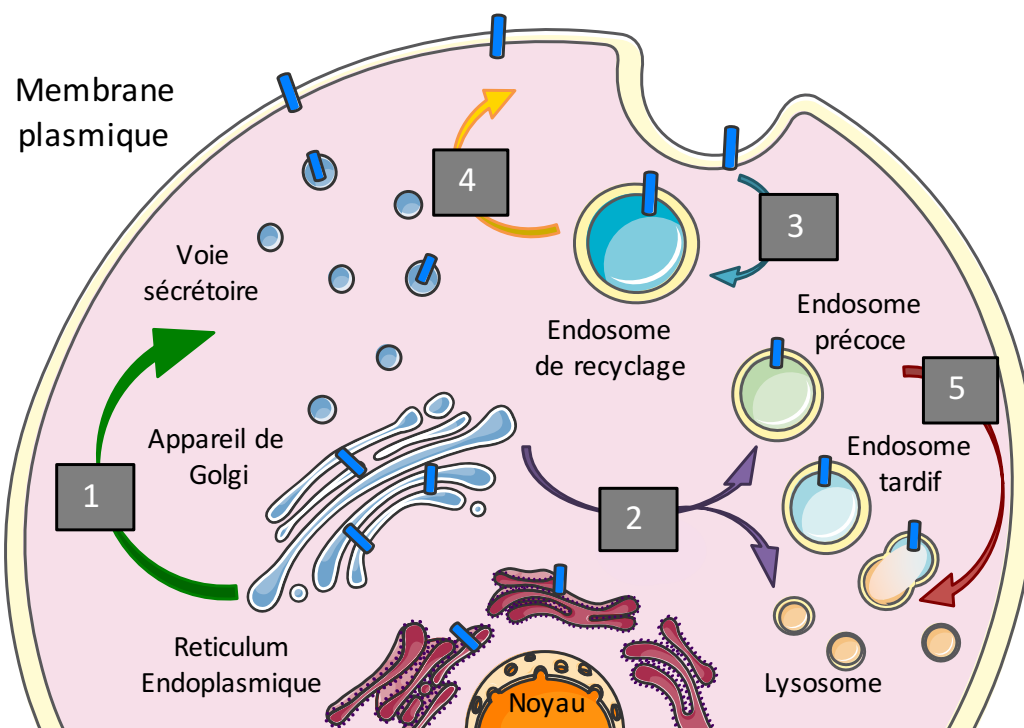


Figure 2: Trafic intracellulaire de l'APP. L'APP (rectangle bleu) mature à travers la voie de sécrétion constitutive (1 - flèche verte). Une fraction de cette APP peut aussi rejoindre directement les endosomes ou les lysosomes (2 - flèche violette). Une fois que l'APP atteint la surface cellulaire, elle peut être rapidement internalisée et acheminée vers les endosomes de recyclage (3 - flèche turquoise). L'APP peut ainsi être recyclée vers la surface cellulaire (4 - flèche jaune) ou être dégradée par la voie endo-lysosomale (5 - flèche rouge). Inspirée de (Haass *et al.*, 2012) et actualisée avec les données de la littérature.

Le long de la voie sécrétoire, l'APP est abondamment enrichie dans les membranes des compartiments intracellulaires (Müller, Deller and Korte, 2017). Une fois devenue mature, l'APP est transportée par la voie antérograde et adressée à la membrane plasmique (Koo *et al.*, 1990; Groemer *et al.*, 2011; Laßek *et al.*, 2013). A partir de la surface cellulaire, l'APP peut être clivée par des sécrétases, que nous traiterons ultérieurement, ou être internalisée par la voie d'endocytose médiée par la clathrine pour rejoindre le système endosome-lysosome, notamment grâce à son motif YENPTY (T Yamazaki, Koo and Selkoe, 1996; Dawkins and Small, 2014). Une partie de l'APP produite peut aussi être adressée directement depuis le Golgi aux endosomes précoces grâce à Arl5b et AP-4 ou aux lysosomes via la protéine adaptatrice AP-3 (Tam, Seah and Pasternak, 2014; Toh *et al.*, 2017). En

effet, la majorité de l'APP passe via les endosomes pour rejoindre les lysosomes où elle finit par être dégradée (Haass *et al.*, 1992; Swaminathan, Zhu and Plowey, 2016). Cependant, l'APP peut aussi être rapidement recyclée de nouveau vers la surface cellulaire et ne pas être dégradée (Tsuneo Yamazaki, Koo and Selkoe, 1996) (Figure 2).

Bien que l'APP soit localisée aussi bien dans les compartiments somatodendritiques que dans les axones des neurones (Kins *et al.*, 2006), c'est à la surface cellulaire que l'APP, dans sa forme intégrale, a démontré ses principales fonctions.

2. Quelles fonctions pour l'APP ?

2.1. Un récepteur de surface cellulaire

De par sa structure, la littérature a d'abord suggéré que l'APP pouvait être un facteur de croissance cellulaire ou un récepteur de surface cellulaire, notamment par analogie de structure secondaire avec la protéine Notch (Selkoe and Kopan, 2003; Dawkins and Small, 2014). En effet, l'APP peut, de la même façon que certains récepteurs de surface tels que EGFR, former des homo-dimères, notamment grâce à son domaine KPI, ou des hétéro-dimères avec d'autres protéines de la même famille (Scheuermann *et al.*, 2001; Ben Khalifa *et al.*, 2012; Decock *et al.*, 2015). D'ailleurs, il fut également montré que cette capacité de dimérisation permettait l'adhésion cellulaire (Soba *et al.*, 2005; Zheng and Koo, 2006). Aujourd'hui, l'APP serait plutôt considérée comme une protéine « receptor-like » ou un récepteur libre (Deyts, Thinakaran and Parent, 2016). En effet, il ne semble pas encore y avoir de ligand défini pour le récepteur APP bien que de nombreuses protéines soient proposées pour interagir avec l'APP. Il est possible que l'ectodomaine de l'APP puisse servir de ligand à d'autres protéines de la famille APP ou des produits de clivage de l'APP lui-même cependant ces idées restent plutôt controversées à l'heure actuelle.

2.2. Rôle de l'APP dans l'adhésion cellulaire

A contrario, il y a de très nombreuses données confortant le rôle de l'APP dans l'adhésion cellulaire. La partie extracellulaire de l'APP a démontré de nombreuses interactions, via ses domaines E1 et E2, avec différents composants de la matrice extracellulaire (héparine, collagène de type I, laminine) et les protéoglycanes d'héparane sulfate, supportant un rôle dans l'adhésion de la cellule à la matrice, l'adhésion synaptique ou l'adhésion des cellules entre elles (Kibbey *et al.*, 1993; Behr *et*

al., 1996; Small *et al.*, 1999; Müller, Deller and Korte, 2017). Cette capacité d'interaction avec les composants extracellulaires permet à l'APP d'avoir plusieurs fonctions au niveau des neurones et des synapses dès le début de la formation de l'organisme.

2.3. Rôles de l'APP au cours du développement

Chez l'embryon, les différentes isoformes de l'APP s'expriment dès les premiers stades de développement du système nerveux suggérant un rôle physiologique important de l'APP dans le développement cérébral, la neurogénèse et la synaptogénèse (Fisher, Gearhart and Oster-Granite, 1991). Des données rapportent que l'APP est impliquée dans la migration neuronale, la croissance neuritique et la survie neuronale durant cette période (Penke, Bogár and Fülöp, 2017). En effet, il a été proposé que l'APP pourrait faire le lien entre la matrice extracellulaire et les protéines motrices du cytosquelette pour permettre la migration cellulaire puisque l'APP est capable d'interagir avec des protéines de la matrice comme le collagène, la laminine ou encore la pancortine (Kant and Goldstein, 2015). D'ailleurs, il a été montré que la perte d'expression d'APP altérait la migration des précurseurs neuronaux dans le développement cortical d'embryons de rats (Young-Pearse *et al.*, 2010).

Le rôle de l'APP dans le développement persiste après la naissance en intervenant dans la formation des contacts synaptiques et leur maintenance (Löffler and Huber, 1992). En effet, elle est exprimée au niveau des éléments pré- et post-synaptiques et son niveau d'expression augmente durant la période critique de synaptogénèse après la naissance. Dans les neurones, il existe d'ailleurs une quantité d'APP localisée au niveau post-synaptique suggérant un rôle synaptique de l'APP (Shigematsu, McGeer and McGeer, 1992).

2.4. Développement et mutants de l'APP

Bien que l'APP participe grandement au développement, cette protéine ne joue pas à elle seule un rôle essentiel dans ce processus puisque les modèles de souris *APP^{-/-}* sont viables. L'absence de l'APP peut être compensée par d'autres protéines de la même famille, notamment APLP2, puisque la mort des souris peu après la naissance n'est induite que par la déficience simultanée des gènes *APP* et *APLP2* ou des trois gènes de la famille APP (Zheng *et al.*, 1995; Kant and Goldstein, 2015). Le modèle *APP^{-/-}* présente plusieurs troubles neurologiques pouvant être dus à des effets sur la synaptogénèse ou associés à des défauts au niveau des fonctions synaptiques appuyant le rôle de l'APP dans ces différentes fonctions (Dawkins and Small, 2014).

2.5. Importance de l'APP dans le système nerveux mature

L'APP possède diverses fonctions trophiques pour les neurones, notamment au niveau des synapses, qui perdurent dans le système nerveux mature central et périphérique après le développement. De façon consistante avec cela, la réduction ou la perte d'expression d'APP altère l'élongation neuritique et la viabilité neuronale *in vitro* et réduit l'activité synaptique *in vivo* (Allinquant *et al.*, 1995; Hérard *et al.*, 2006). *A contrario*, la surexpression de l'APP chez les souris sauvages augmente le nombre d'épines dendritiques et permet leur maintenance (Lee *et al.*, 2010). Cette stimulation de la croissance neuritique par l'APP impliquerait d'ailleurs l'adhésion cellulaire (Dawkins and Small, 2014; Müller, Deller and Korte, 2017).

2.6. Implication de l'APP dans le système nerveux périphérique

Des études ont aussi montré d'une part l'importance de l'APP au niveau du système nerveux périphérique dans le développement et les fonctions des jonctions neuromusculaires (NMJ pour *Neuromuscular Junction*) (Caldwell *et al.*, 2013). En effet, les modèles de souris APP^{-/-} montrent également des défauts moteurs et de force de grip causés par des altérations du relargage de neurotransmetteurs (Zheng *et al.*, 1995; Müller, Deller and Korte, 2017). D'autre part, il a aussi été montré que la neurotransmission cholinergique était régulée par l'APP en association avec APLP2, affirmant le rôle de ces protéines dans la physiologie des synapses neuromusculaires (Wang *et al.*, 2005). Bien que le phénotype synaptique soit visible avec une surexpression d'APLP au niveau des NMJ, la surexpression de l'APP n'a pas d'impact sur ces dernières (Zheng and Koo, 2006).

2.7. Rôles de l'APP dans les processus de mémorisation

Il a aussi été suggéré que l'APP pourrait être impliquée dans la plasticité synaptique et les capacités d'apprentissage et de mémoire. En effet, l'APP régule les taux d'expression de la sous-unité GluR2 du récepteur AMPAR, ayant un rôle dans la formation des épines dendritiques, et elle affecte également le flux de calcium synaptique en régulant la distribution des récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) à la surface (Cousins *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). De plus, d'autres études ont montré que la forme entière de l'APP pouvait directement augmenter la potentialisation à long terme (LTP pour *Long-Term Potentiation*) et que l'APP était importante dans les processus de mémoire (Seabrook *et al.*, 1999; Mileusnic *et al.*, 2000; Puzzo *et al.*, 2017).

L'étendue et la divergence des études concernant les fonctions physiologiques de l'APP suggèrent que l'APP serait aussi impliquée dans d'autres processus tels que la neuroprotection ou les traumatismes crâniens, permettant la réparation tissulaire (Plummer *et al.*, 2016). Aujourd'hui, une certaine cohérence semble émerger et les scientifiques s'accordent sur les rôles de l'APP dans les mécanismes d'adhésion cellulaire, de croissance neuritiques et axonales et dans le support des diverses fonctions associées au développement et la maintenance des synapses.

Malgré ces diverses fonctions, il est suggéré par la littérature que seule une petite portion de l'APP mature est présente à la surface cellulaire. Il semblerait que moins de 10% de l'APP atteindrait la membrane plasmique alors que la majorité de l'APP serait localisée au niveau de l'appareil de Golgi et du réseau trans-Golgi (TGN pour *Trans-Golgi Network*) (Thinakaran and Koo, 2008; Choy, Cheng and Schekman, 2012). De plus, l'APP a une demi-vie relativement courte, environ 10 minutes à la surface cellulaire, puisque son turnover est assez rapide, entre 30 et 90 minutes (LeBlanc, Xue and Gambetti, 1996; T Yamazaki, Koo and Selkoe, 1996; Lyckman *et al.*, 1998; Herreman *et al.*, 2003). En effet, l'APP, si elle n'est pas directement dégradée, est rapidement clivée par diverses enzymes dénommées sécrétases. Avant d'être la protéine précurseur du peptide β -amyloïde ($A\beta$), l'APP est aussi le précurseur d'autres métabolites issus de différents clivages qui ont fait l'objet de nombreuses études.

III. Les clivages de l'APP

Le métabolisme protéolytique de l'APP rassemble un ensemble de clivages subcellulaires complexes qui conduisent à la production de nouveaux fragments biologiquement actifs par l'action de sécrétases, le terme « sécrétase » faisant référence à la sécrétion des substrats libérés (Haass *et al.*, 2012). La génération de ces fragments, pouvant avoir des fonctions spécifiques et même opposées entre elles, est compartimentalisée. En effet, les clivages de l'APP et/ou de ses métabolites peuvent se produire dans différents organites intracellulaires. De ce fait, c'est leur localisation qui va influencer les clivages qu'ils vont subir par les différentes sécrétases.

De manière très simplifiée, la protéolyse de l'APP peut suivre deux voies canoniques (Figure 3) : la voie amyloïdogénique, menant à la production de peptides $A\beta$ et la voie non-amyloïdogénique, qui comme son nom l'indique, prévient la génération des peptides $A\beta$. Cependant, le métabolisme de l'APP s'est complexifié depuis ces dernières années puisque de nouvelles sécrétases sont désormais

impliquées en amont ou en parallèle de ces deux voies (Robert J Andrew *et al.*, 2016). Ainsi, nous traiterons d'abord des deux voies classiques (non-amyloïdogénique et amyloïdogénique) avant d'introduire toutes les sécrétases impliquées à ce jour dans les clivages de l'APP.

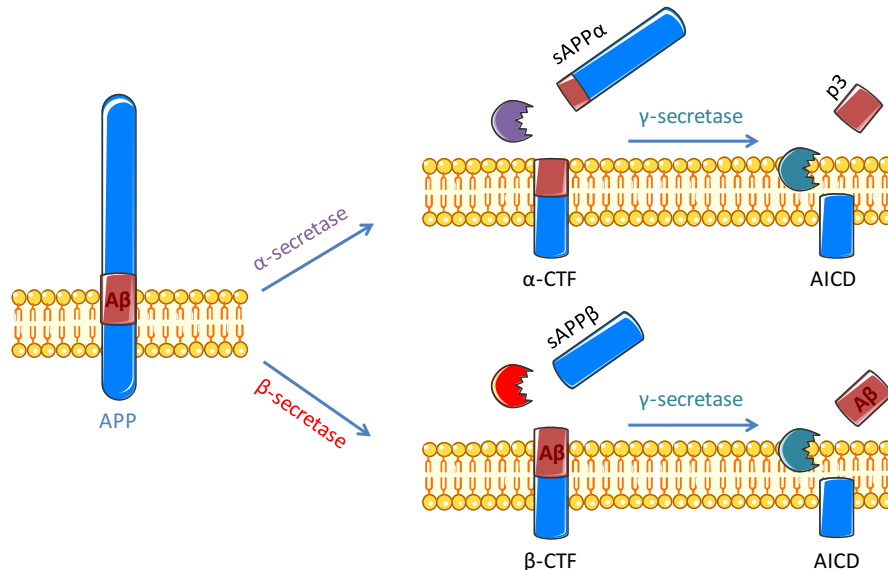


Figure 3: Les voies classiques non-amyloïdogénique et amyloïdogénique de l'APP. Après synthèse et maturation, l'APP peut classiquement suivre deux voies différentes : la voie non amyloïdogénique ou la voie amyloïdogénique, la dernière étant à l'origine de la production de peptides Aβ. Dans la voie non amyloïdogénique, l'APP est d'abord clivée par l'α-sécrétase (mauve) dans la séquence Aβ, libérant un fragment soluble sAPPα et un fragment carboxy-terminal transmembranaire (APP-CTF) appelé α-CTF. Ensuite, la γ-sécrétase (turquoise) clive l'α-CTF en fragment p3 et en domaine intracellulaire de l'APP (AICD). Dans la voie amyloïdogénique, le fragment soluble sAPPβ et le β-CTF sont libérés suite au clivage de l'APP par la β-sécrétase (en rouge). Le β-CTF est ensuite clivé par la γ-sécrétase en peptide Aβ et AICD. D'après (Evrard *et al.*, 2018).

1. La voie non-amyloïdogénique

La voie non-amyloïdogénique est caractérisée par la non-production de peptides Aβ parce qu'elle est initiée par un clivage α-sécrétase de l'APP entre la lysine-16 et la leucine-17 dans la séquence Aβ (résidus 612 et 613 de l'APP695), prévenant ainsi la production de peptides Aβ (Esch *et al.*, 1990; Anderson *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1991). Ce clivage constitutif est localisé à la surface cellulaire et conduit à la libération d'un fragment soluble sAPPα dans le compartiment extracellulaire et d'un fragment carboxy-terminal (CTF) transmembranaire α-CTF ou C83 (10 kDa). Ce dernier fragment α-CTF peut lui-même être ensuite coupé par la γ-sécrétase dans son domaine transmembranaire. Cette coupure entraîne la libération d'une version tronquée du peptide Aβ non

pathogénique dénommé fragment p3 (3 kDa) dans l'espace extracellulaire et du domaine intracellulaire de l'APP (AICD pour *APP intracellular domain*) (environ 6,5 kDa) dans le cytosol (Haass et al., 1993). Cette voie est la voie majeure dans laquelle s'engage l'APP et représente environ 90% de sa protéolyse. Dans 10% des cas, l'APP suit la voie amyloïdogénique (Penke, Bogár and Fülöp, 2017).

2. La voie amyloïdogénique ou la voie de production de peptides A β

Le peptide A β est produit suite à deux clivages successifs de l'APP par la β -sécrétase puis la γ -sécrétase le long de la voie d'endocytose, dépendant possiblement de l'acidification durant la maturation de ces organelles. Le clivage β -sécrétase de l'APP, en amont de l'acide aspartique-1 (Asp¹) du domaine A β (entre les résidus 596 et 597 de l'APP695), génère un fragment soluble sAPP β (environ 110 kDa) dans la lumière endosomale et un fragment β -CTF ou C99 (12 kDa) transmembranaire. Il existe également un clivage β' de l'APP, juste après l'acide glutamique-11 (Glu¹¹) dans la séquence du peptide A β (Vassar *et al.*, 1999). Ce dernier, favorisé dans le TGN, entraîne la libération d'un fragment sAPP β' dans la lumière vésiculaire et d'un β' -CTF ou C89 transmembranaire (Huse *et al.*, 2002). La γ -sécrétase clive ensuite le β -CTF en peptide A β_{1-X} (ou le β' -CTF en peptide A β_{11-X}), variant en moyenne de 34 à 50 acides aminés (environ 4 kDa) sécrété dans le milieu extracellulaire ou la lumière vésiculaire, d'une part et en AICD (environ 6,5 kDa) libéré dans le cytoplasme d'autre part (Kant and Goldstein, 2015). Ce dernier fragment AICD pourrait d'ailleurs être généré préférentiellement par cette voie et serait plus stable que celui issu de la voie non amyloïdogénique (Goodger *et al.*, 2009; Belyaev *et al.*, 2010; Flammang *et al.*, 2012).

3. Les clivages non canoniques de l'APP

En plus des voies amyloïdogénique et non amyloïdogénique de l'APP, il existe aussi d'autres voies de protéolyse ne faisant pas intervenir des sécrétases. En effet, l'APP peut également être le substrat de caspases ou de protéases de type caspase (Barnes *et al.*, 1998; Weidemann *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2000). Ce clivage s'opère après l'acide aspartique 664 dans la partie C-ter de l'APP, de l'APP-CTF ou de l'AICD libérant un fragment de 31 acides aminés C-ter dénommé C31 et un fragment N-ter tronqué de ces 31 résidus APP Δ 31, CTF Δ 31 et Jcasp (2,8 kDa) respectivement. Bien que les caspases responsables du clivage de l'APP *in vivo* ne soient pas encore complètement identifiées, le fragment C31 ainsi que certaines caspases activées sont détectées dans le cerveau de patients Alzheimer (Lu *et al.*, 2000; Nhan, Chiang and Koo, 2015).

Ces différents clivages de l'APP, qu'ils soient α -, β -, γ - ou autre, se font suivant des interactions enzyme-substrat qui suivent un cheminement à la fois spatial mais aussi temporel, complexifiant le métabolisme de l'APP. En effet, c'est la disponibilité de l'APP à une localisation donnée qui va guider son entrée dans une voie de protéolyse plutôt que l'autre. Nous allons ainsi passer en revue la contribution de chacune des sécrétases connues à ce jour et entrer dans les détails de l'implication de chacune dans la protéolyse de l'APP.

4. Les sécrétases

4.1. L' α -sécrétase

L'activité α -sécrétase de l'APP peut être exercée par différentes protéases transmembranaires. Ces enzymes appartiennent principalement à la famille des métalloprotéases dénommées ADAM pour *A Disintegrin And Metalloprotease* (Vingtdeux and Marambaud, 2012). Parmi cette famille, quatre enzymes : ADAM9, ADAM10, ADAM17 et ADAM19 se sont vues associées au clivage α -sécrétase de l'APP (Buxbaum, 1998; Koike *et al.*, 1999; Lammich *et al.*, 1999; Tanabe *et al.*, 2007). Une étude d'inactivations conditionnelles dans différentes lignées cellulaires et en culture primaire de neurones a d'ailleurs montré que ADAM10 était l'enzyme responsable du clivage constitutif α -sécrétase de l'APP, suggérant un clivage régulé par les autres enzymes (Kuhn *et al.*, 2010). En effet, le clivage α -sécrétase peut être constitutif ou inductible (Vingtdeux and Marambaud, 2012).

4.1.1. Le clivage α -sécrétase

Le clivage en α de l'APP s'effectue principalement à la surface cellulaire, où elle y est transportée par la voie sécrétoire (Sisodia, 1992). Il dépend à la fois de la disponibilité en substrat mais aussi en enzyme, c'est-à-dire que ce clivage α de l'APP dépend du transport intracellulaire de l'APP et de l' α -sécrétase à la surface cellulaire (F. Lichtenthaler, 2012). L' α -sécrétase est l'enzyme de clivage principale de l'APP qui arrive à la surface (De Strooper and Annaert, 2000). L'APP, si elle échappe aux α -sécrétases, est endocytée et peut suivre différentes voies : soit être dégradée dans la voie endosome/lysosome ou subir un clivage β -sécrétase.

4.1.2. L' α -sécrétase et MA

Parce qu'elle entrave la production de peptides $A\beta$ et favorise la production de fragments sAPP α qui possèdent des propriétés bénéfiques pour les neurones (Tableau 1), l'activation du clivage

α -sécrétase représente une opportunité thérapeutique dans le cas de la MA (Kumar *et al.*, 2018). En effet, la surexpression d'ADAM10 dans un modèle de souris Alzheimer réduit la production de peptides A β et le nombre de plaques amyloïdes associés à une amélioration des déficits cognitifs (Postina *et al.*, 2004). Cependant, l'APP n'étant pas le seul substrat de ces enzymes, ADAM10 possède d'ailleurs une trentaine de substrats, il est essentiel de rester prudent quant aux conséquences d'une activation chronique d'ADAM10 (Lichtenthaler, 2011). Malgré le potentiel de cette approche thérapeutique, elle reste peu développée sur le plan clinique à l'heure actuelle.

4.2. La β -sécrétase

La voie amyloïdogénique est initiée par le clivage β -sécrétase de l'APP dont la production de peptides A β est dépendante. L'enzyme responsable de ce clivage est nommée BACE1 pour *beta-site APP-cleaving enzyme*, Mémapsine 2 ou encore Asp-2 pour *Aspartyl Protease 2*. Il s'agit d'une aspartyl-protéase transmembranaire de type I qui fut identifiée en 1999 par cinq groupes (Hussain *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 1999; Vassar *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000). BACE1 est aussi responsable du clivage β' de l'APP. Il existe également une autre enzyme capable d'avoir une activité β -sécrétase sur l'APP : BACE2 ou Asp-1, une aspartyl-protéase homologue à BACE1 (Bennett *et al.*, 2000; Farzan *et al.*, 2000). BACE2 peut couper l'APP au même site β que BACE1 mais également au sein du domaine A β entre les phénylalanines 19 et 20 (proche du site de clivage α), et ce, de manière plus efficace. Cependant, le niveau d'expression de BACE2 est relativement faible dans le cerveau humain contrairement à BACE1, dont l'expression est bien plus importante, notamment dans les neurones. De plus, une étude a montré que l'inactivation seul du gène *BACE1* dans des souris suffisait à abolir la production de peptides A β , suggérant ainsi que BACE1 est l'enzyme majoritairement responsable du clivage β de l'APP (Cai *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2001).

4.2.1. Les Cathepsines

A noter que les Cathepsines, des protéases lysosomales, ont aussi été proposées pour jouer le rôle de β -sécrétase (Hook *et al.*, 2005; Klein, Felsenstein and Brenneman, 2009). Plusieurs études ont montré une régulation de la production de peptides A β par ces protéases. Cependant, leur rôle reste controversé. En effet, il a été montré d'une part qu'inhiber la cathepsine B, par exemple, permet de réduire la production de peptides A β et d'améliorer les déficits cognitifs. Alors qu'il a aussi été démontré d'autre part, que son activation permettait aussi de réduire le nombre de plaque amyloïdes

et les déficits synaptiques *in vivo* (Hook, Kindy and Hook, 2008; Sun *et al.*, 2008; Hook *et al.*, 2014). Les cathepsines intervenant dans la fonctionnalité des lysosomes feront plutôt l'objet d'études dans les systèmes de dégradation de l'APP et ses métabolites sur lesquels nous reviendrons plus tard dans ce chapitre.

Bien que BACE2 et les cathepsines y jouent un rôle, il ne s'agit pas des enzymes majoritairement responsables du clivage β de l'APP ainsi nous ne considérons que BACE1 dans le cas du clivage β -sécrétase dans la suite de cette thèse.

4.2.2. BACE1 ou l'activité β -sécrétase

BACE1 est retrouvée au niveau de la membrane cellulaire de plusieurs compartiments cellulaires. BACE1 transite le long de la voie sécrétoire. Elle passe par la surface cellulaire avant d'être recyclée dans la voie endosomale où elle va cliver l'APP (Vassar *et al.*, 1999; Huse *et al.*, 2000). Dans les neurones, une large proportion de BACE1 est localisée dans les endosomes de recyclage (Das *et al.*, 2015). En effet, l'activité sécrétase de BACE1 est plus élevée dans les environnements acides et semble optimale à pH 4,5 (Vassar *et al.*, 1999). Bien avant l'identification de l'enzyme responsable du clivage β -sécrétase de l'APP, il avait d'ailleurs déjà été montré que ce clivage était localisé dans les compartiments acides et que des agents alcalinisant réduisaient la production de peptides A β (Knops *et al.*, 1995). Cependant, du fait de la colocalisation de l'APP et de BACE1 dans d'autres compartiments que les endosomes (TGN ou surface cellulaire par exemple), il a été également suggéré que les peptides A β peuvent être générés dans ces compartiments où l'APP et BACE1 convergent tous les deux (Greenfield *et al.*, 1999; Sun and Roy, 2017). Néanmoins, il est à noter que le pH de ces compartiments (réticulum endoplasmique/appareil de Golgi) est aux alentours de 6-7 alors que le pH optimum de BACE1 est plutôt acide (Venugopal *et al.*, 2008).

4.2.3. BACE1 et MA

Bien qu'aucune mutation de *BACE1* ne soit associée à la MA, son activité β -sécrétase joue un rôle clé dans cette pathologie puisque l'expression de BACE1 et son activité s'avèrent augmentées dans les cerveaux de patients atteints de la MA (Fukumoto *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Cole and Vassar, 2008). Ce sont plutôt certaines mutations de l'APP qui vont affecter le clivage β -sécrétase de BACE1 et favoriser la production de peptides A β pro-toxiques et pro-agrégatifs (Tableau 1) (M. Dai *et al.*, 2018). L'inhibition de BACE1 représente une cible thérapeutique plutôt intéressante dans la lutte

contre la MA et plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours. Nous reviendrons plus précisément sur cela dans la partie concernant les traitements de la MA.

4.3. La γ -sécrétase

Que l'APP soit sujet à un clivage α - ou β -sécrétase, il s'en suit un clivage par la γ -sécrétase du fragment APP-CTF produit, si ce dernier n'est pas directement dégradé.

4.3.1. Le complexe γ -sécrétase

Le terme γ -sécrétase est associé à un complexe multi-protéique de haut poids moléculaire qui requière 4 protéines spécifiques, au minimum, pour être enzymatiquement actif : la Présénilline 1 ou 2 (PS1 ou PS2), la Nicastrine (NCT), Aph-1 pour *anterior pharynx defective* et Pen-2 pour *presenilin enhancer* (Edbauer *et al.*, 2003; Kimberly *et al.*, 2003; Takasugi *et al.*, 2003; De Strooper and Annaert, 2010). Les présénilines furent les premières protéines identifiées dans le clivage γ -sécrétase de l'APP, avec la PS1 représentant le centre catalytique du complexe enzymatique (De Strooper *et al.*, 1998; Wolfe *et al.*, 1999). Les PS1 et PS2 sont toutes deux des aspartyl-protéases dont les mutations génétiques sont directement associées à la MA (Sherrington *et al.*, 1995). La nicastrine fut ensuite identifiée comme étant impliquée dans le clivage menant à la production de peptides A β (Yu *et al.*, 2000). Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de type I qui semblerait plutôt agir comme récepteur de substrat au sein du complexe (Shah *et al.*, 2005). Aph-1 fut découverte par son interaction avec NCT et les PS et semblerait être un stabilisateur du complexe, notamment au niveau des PS (Goutte *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2003). Aph-1 possède deux variants chez l'Homme : Aph-1a (avec deux formes d'épissage Aph1aS et Aph1aL) et Aph-1b contribuant à l'hétérogénéité du complexe (Shirovani *et al.*, 2004). Enfin, l'identification de Pen-2 se fit avec Aph-1 chez *Caenorhabditis elegans*. Il s'agit d'une protéine intégrale de la membrane qui favoriserait l'endoprotéolyse des PS et la stabilisation du complexe γ -sécrétase après maturation (Francis *et al.*, 2002; Prokop *et al.*, 2004; Pardossi-Piquard *et al.*, 2009). L'assemblage de tout ce complexe, ou d'au moins ces 4 protéines nommées précédemment, se construit par étapes successives le long du RE/Golgi pour terminer sa maturation dans le TGN avant de rejoindre la surface cellulaire (Kim *et al.*, 2007). NCT et Aph-1 forment un premier complexe auquel s'ajoute une PS puis l'ajout de Pen2 finit par terminer le complexe γ -sécrétase (Li, Wolfe and Selkoe, 2009).

4.3.2. Le clivage γ -sécrétase

L'activité γ -sécrétase diffère en fonction de sa localisation cellulaire et a été détectée au niveau de la membrane plasmique pour les α -CTFs et dans les endosomes précoces pour les β -CTFs (Kaether *et al.*, 2006). La γ -sécrétase peut couper successivement les APP-CTFs en deux sites dénommés γ et ϵ . En effet, il a été montré qu'il y aurait d'abord un clivage ϵ au niveau de la partie cytoplasmique de l'APP-CTF au niveau de la valine 50 majoritairement, et également au niveau de la leucine 49, dans une moindre mesure (Gu *et al.*, 2001; Weidemann *et al.*, 2002; Qi-Takahara, 2005). Ce clivage ϵ libère ainsi des fragments AICD50-99 ou AICD49-99 et $A\beta_{1-49}$ ou $A\beta_{1-48}$ respectivement à partir de l'APP β -CTF. L'APP β -CTF apparaît d'ailleurs comme un meilleur substrat pour la génération d'AICD dépendante de la γ -sécrétase (Flammang *et al.*, 2012). Les produits $A\beta$ de forme « longue » ($A\beta_{1-49}$ ou $A\beta_{1-48}$) sont ensuite coupés au site γ pour générer des peptides plus courts dont les principaux sont $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{1-42}$ (Funamoto *et al.*, 2004; Kakuda *et al.*, 2006). Bien que moins étudié, l'APP α -CTF est également sujet au clivage ϵ qui produit les mêmes fragments AICD et p3, plus courts que les peptides $A\beta$.

4.3.3. La γ -sécrétase et MA

La biologie du clivage des APP-CTFs par la γ -sécrétase représente un large champ d'études dans la littérature scientifique du fait de sa complexité, de son implication dans la génération de peptides $A\beta$ et du fait que les mutations des gènes *PSEN1* et *PSEN2* (codant pour la PS1 et la PS2 respectivement) sont à l'origine de la MA. Elle fut longtemps une cible thérapeutique potentielle pour la MA. Un inhibiteur, le *Semagacestat*, est allé jusqu'en phase 3 d'essais cliniques mais échoua du fait d'effets secondaires indésirables, notamment associés à un autre de ses substrats Notch (Henley *et al.*, 2014). En effet, la γ -sécrétase possède plus de 90 substrats dont l'APP et son inhibition altère ainsi d'autres voies métaboliques (Carroll and Li, 2016). Toutefois, des inhibiteurs de la γ -sécrétase sélectifs pour l'APP ont été développés mais ils n'ont pas encore montré à ce jour d'effet sur la production de peptides $A\beta$ chez l'Homme (Golde *et al.*, 2013).

Les clivages de l'APP par les sécrétases canoniques α -, β - et γ - représentent une vision plutôt simplifiée du métabolisme de l'APP bien qu'ils soient admis depuis de nombreuses années. En effet, de récentes découvertes ont permis l'identification de nouvelles sécrétases impliquées dans le métabolisme de l'APP avec la production de nouveaux métabolites ajoutant de la complexité à la protéolyse de l'APP.

5. Les nouveaux clivages de l'APP

Récemment, la δ -sécrétase, la η -sécrétase et la Méprine β furent identifiées comme de nouvelles enzymes intervenant dans le processus catalytique de l'APP (Robert J Andrew *et al.*, 2016). Il s'agit de clivages physiologiques qui peuvent se retrouver altérés dans la MA (Figure 4).

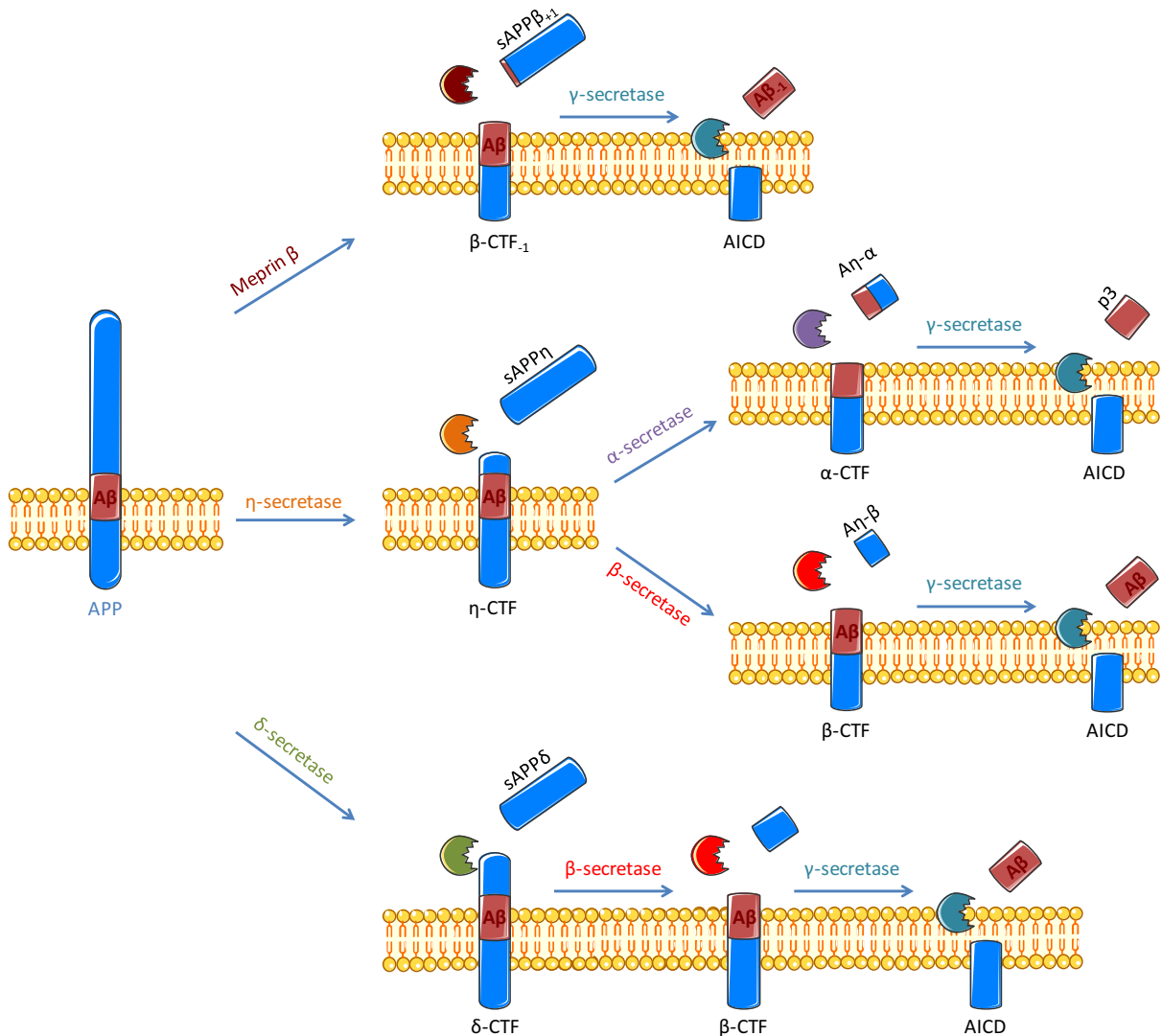


Figure 4 : Les nouveaux clivages de l'APP. Alternativement à un clivage direct par l' α - ou la β -sécrétase, l'APP peut être prise en charge par d'autres sécrétases qui ont été récemment décrites. La Méprine β (marron) peut agir en tant que variante de la β -sécrétase libérant un fragment sAPP β avec 1 acide aminé en plus (sAPP β_{+1}) et un β -CTF avec un acide aminé moins (β -CTF $_{-1}$). Le β -CTF $_{-1}$ est, comme son homologue β -CTF, clivé par la γ -sécrétase. La η -sécrétase (orange) clive l'APP en fragments sAPP η et η -CTF. Le η -CTF peut suivre la voie amyloïdogénique ou non amyloïdogénique, libérant les produits A η - β et β -CTF ou A η - α et α -CTF, respectivement. Les APP-CTFs restants (α - et β -) sont probablement clivés par la γ -sécrétase, suivant les voies classiques. La δ -sécrétase (verte) transforme l'APP en sAPP δ et en δ -CTF. Les clivages successifs du δ -CTF par les β - et γ -sécrétases libèrent ainsi les peptides A β et AICD. D'après (Evrard *et al.*, 2018).

5.1. La δ -sécrétase

Bien qu'il avait déjà été observé dans les années 90, c'est en 2015 que le clivage de l'APP en position N373 et N585 fut caractérisé et attribué à la δ -sécrétase ou Asparagine Endopeptidase (AEP) (Simons *et al.*, 1996; Zhentao Zhang *et al.*, 2015). L'AEP est une cystéine protéase lysosomale qui coupe les liaisons peptidiques après un résidu d'asparagine. C'est une enzyme impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques dans le cerveau et dont l'altération conduit à des anomalies des lysosomes et des endosomes tardifs. Sa régulation dépend du pH (active à pH 6) et son activité est augmentée au cours du vieillissement et dans la MA (Zhentao Zhang *et al.*, 2015).

5.1.1. L'activité δ -sécrétase

Le clivage δ -sécrétase de l'APP s'opère dans la voie d'endocytose, au niveau des endolysosomes, et libère des fragments solubles sAPP₁₋₃₇₃ (80 kDa) ou sAPP₁₋₅₈₅ (environ 130 kDa) et APP- δ CTF₃₇₄₋₆₉₅ ou APP- δ CTF₅₈₆₋₆₉₅ (Zhentao Zhang *et al.*, 2015). Les APP- δ CTFs produits deviennent des substrats disponibles aussi bien pour un clivage α - que β -sécrétase. Cependant, l'APP- δ CTF₅₈₆₋₆₉₅ est un meilleur substrat pour BACE1 que l'APP totale ou l'APP- δ CTF₃₇₄₋₆₉₅, augmentant ainsi la production de peptides A β (Figure 4). Ainsi, de par son impact dans la production de peptides A β et la libération de produits neurotoxiques (Tableau 1), la δ -sécrétase représente une nouvelle cible thérapeutique intéressante puisque son inhibition conduit à une amélioration des déficits cognitifs et une réduction de perte de mémoire chez des modèles murins de la MA (Zhang, Xie and Ye, 2016; Zhentao Zhang *et al.*, 2017). En effet, le rôle de l'AEP apparaît comme une nouvelle enzyme clé dans la MA puisqu'en plus d'être fortement activée dans les cerveaux de patients Alzheimer et de réguler la production de peptides A β , l'AEP intervient également dans la dégradation de la protéine Tau. L'activation de l'AEP peut induire l'agrégation de Tau aggravant ainsi l'apparition de dégénérescence neurofibrillaire (Zhang *et al.*, 2014; Z.-H. Wang *et al.*, 2017).

5.2. La η -sécrétase

Plus récemment, la η -sécrétase fut décrite par deux groupes comme étant responsable du clivage de l'APP₆₉₅ entre les acides aminés 504 et 505, contribuant à la production de peptides A β (Willem *et al.*, 2015; Baranger *et al.*, 2016). C'est la Métalloprotéinase Matricielle Membranaire de Type 5 (MT5-MMP ou MMP-24), une enzyme principalement neuronale qui est responsable de ce clivage η de l'APP. Des travaux bien plus anciens l'avaient d'ailleurs suggérée comme étant impliquée

dans la régulation de l'APP parmi d'autres MT-MMPs causant une coupure de l'ectodomaine de l'APP et libérant de nouveaux fragments CTFs (Ahmad *et al.*, 2006).

5.2.1. Le clivage η -sécrétase

La coupure η -sécrétase de l'APP entraîne la libération d'un fragment sAPP η (95 kDa) et d'un fragment APP-CTF η (25 kDa) transmembranaire qui peut ensuite suivre l'une des deux voies de protéolyse classique de l'APP (Figure 4) ou être dégradé par les lysosomes (Wang *et al.*, 2015). L'APP η -CTF peut être clivé soit par BACE1 pour donner un fragment soluble A η - β (12 kDa) et le β -CTF ; ou par ADAM10 libérant un fragment soluble A η - α (15 kDa) et le α -CTF. Bien que la localisation exacte du clivage de l'APP par MT5-MMP ne soit pas bien identifiée, il semblerait qu'elle interagisse avec l'APP le long de la voie amyloïdogénique et qu'elle favorise la convergence de l'APP vers les endosomes. En effet, il a été montré que MT5-MMP augmentait la quantité de peptides A β ₄₀ au niveau des endosomes et qu'elle n'avait pas d'impact sur les activités β - et γ -sécrétases, suggérant que cette enzyme favoriserait la voie amyloïdogénique de l'APP (Baranger *et al.*, 2017).

5.2.2. La η -sécrétase et MA

La η -sécrétase n'est pas clairement associée à la MA mais il semblerait que son activité soit augmentée et que des fragments η -CTFs soient retrouvés accumulés dans des cerveaux de patients Alzheimer (Willem *et al.*, 2015). Ce clivage apparaît comme pro-toxique ou « pro-amyloïdogénique ». En effet, la surexpression de MT5-MMP *in cellulo* entraîne une augmentation des β -CTFs et des peptides A β . *A contrario*, la déplétion de MT5-MMP^{-/-} dans un modèle de souris Alzheimer entraîne une diminution de ces mêmes fragments, de l'inflammation gliale et des niveaux d'interleukines 1 β au niveau du cortex et de l'hippocampe associés à une amélioration des performances d'apprentissages par rapport au modèle contrôle Alzheimer (Baranger *et al.*, 2016; Baranger, Khrestchatisky and Rivera, 2016). Un an plus tard, la même équipe a démontré des résultats similaires concernant la déplétion de MT5-MMP au niveau du cortex frontal cette fois-ci, protégeant ainsi contre les troubles associés aux déficits frontaux (Baranger *et al.*, 2017). La MT5-MMP se place ainsi comme une nouvelle cible thérapeutique au carrefour de l'amyloïdogénèse et de l'inflammation. Néanmoins, des études plus approfondies seront nécessaires pour établir précisément le rôle et la pertinence de cette enzyme et de des métabolites de l'APP qu'elle produit.

5.3. La Méprine β

Une autre enzyme récemment ajoutée au métabolisme de l'APP est la Méprine β . Il s'agit d'une métalloprotéase dépendante du zinc retrouvée au niveau de la surface cellulaire. Dans un premier temps, il fut montré que son clivage de l'APP entraînait la libération de fragments N-ter *in vivo* spécifiques et non cytotoxiques : N-APP20 (20 kDa) issus d'une coupure après les résidus 305 ou 308 et N-APP11 (11 kDa) due à une coupure entre les résidus 124/125 (Jefferson *et al.*, 2011). Peu de temps après, la Méprine β fut proposée comme une β -sécrétase alternative puisqu'elle peut aussi cliver l'APP au niveau du site de coupure β , entre les résidus 596/597, et ce, de façon plus efficace que BACE1 *in vitro*. Elle peut aussi agir entre les résidus 597/598 et 598/599 produisant ainsi des peptides A β et des formes A β tronqués (A β_{2-x}) (Figure 4) (Bien *et al.*, 2012). Bien que BACE1 soit l'enzyme majoritairement responsable du clivage β -sécrétase de l'APP initiant la production de peptides A β , la Méprine β est suggérée comme une enzyme additionnelle responsable de la libération d'espèces A β tronquées, plus enclin à s'agréger que les peptides A β non tronqués, dont elles favorisent aussi l'agrégation (Schönherr *et al.*, 2016).

5.3.1. Le clivage par la Méprine β

L'APP et la Méprine β interagissent ensemble au niveau de la surface cellulaire et de la voie sécrétoire. C'est au niveau de la membrane cellulaire que l'APP est clivée par cette enzyme dont le produit APP-CTF est pris en charge par la γ -sécrétase pour produire des peptides A β tronqués (Jäckle *et al.*, 2015; Schönherr *et al.*, 2016). Ce clivage de l'APP par la Méprine β est indépendant de BACE1 et est altéré par la double mutation suédoise de l'APP (K670N/M671L) qui entraîne une réduction du clivage Méprine β contrairement à BACE1 dont le clivage est augmenté.

5.3.2. Méprine β et MA

Bien que les peptides A β_{2-x} soient détectés spécifiquement dans les cerveaux de patients Alzheimer mais moins abondamment que les peptides A $\beta_{1-40/1-42}$, les niveaux d'ARNm de la Méprine β y sont bien plus élevés que dans des cerveaux de personnes non-démentes suggérant un rôle possible de cette enzyme dans la neurodégénérescence (Wiltfang *et al.*, 2001; Bien *et al.*, 2012). La Méprine β se présente ainsi comme une nouvelle enzyme physiologiquement intéressante dans le métabolisme de l'APP, à l'origine d'espèces A β mais dont le rôle pathologique reste à démontrer.

L'identification de nouvelles secrétases de l'APP indique que nos connaissances et notre compréhension de son métabolisme ainsi que sa contribution à la MA reste encore incomplète. En effet, il existe d'autres fragments N-ter, C-ter de l'APP et des espèces A β non identifiés retrouvés dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le cerveau qui ne sont pas encore caractérisés et qui pourraient avoir un rôle physiopathologique (Robert J Andrew *et al.*, 2016). Par conséquent, il reste encore un long chemin avant que toutes les secrétases responsables de la production de ces fragments soient identifiées, que les voies de protéolyse soient accordées entre elles et que les fonctions biologiques des métabolites de l'APP soient caractérisées.

6. Les métabolites de l'APP

A l'issue des différents clivages que nous avons détaillés précédemment, l'APP peut conduire ainsi à plusieurs métabolites différents possédant des caractéristiques propres à chacun. Bien que certains soient étudiés depuis plus longtemps que d'autres, les principales fonctions des fragments de l'APP, en accord avec les données de la littérature actuelle, peuvent être résumées selon le tableau suivant (Tableau 1). Les nouveaux fragments absents de ce tableau n'ont pas montré de fonctions notables ou n'ont pas encore été caractérisés.

<u>Fragment de l'APP</u>	<u>Caractéristiques fonctionnelles</u>
sAPPα	<ul style="list-style-type: none"> -Facteur neurotrophique : favorise la croissance des neurones, des neurites, la neurogénèse et la synaptogénèse (Saitoh <i>et al.</i>, 1989; Araki <i>et al.</i>, 1991; Mattson <i>et al.</i>, 1993; Clarris <i>et al.</i>, 1994; Jin <i>et al.</i>, 1994; Roch <i>et al.</i>, 1994; Caille, 2004; Gakhar-Koppole <i>et al.</i>, 2008) -Stimule la prolifération des cellules souches neuronales chez l'embryon (Hayashi <i>et al.</i>, 1994; Ohsawa <i>et al.</i>, 1999). -Améliore les performances mnésiques, la conservation de la mémoire et la potentialisation à long terme (LTP) (Roch <i>et al.</i>, 1994; Meziane <i>et al.</i>, 1998; Taylor <i>et al.</i>, 2008) -Protège contre les dommages neuronaux lors de traumatismes crâniens (Corrigan <i>et al.</i>, 2012; Plummer <i>et al.</i>, 2016) -Facteur neuroprotecteur : protège contre l'excitotoxicité, les produits métaboliques, les dommages oxydants, toxiques tels que le glutamate, le peptide Aβ et active la microglie (Schubert and Behl, 1993; Goodman and "rMattson, 1994; Barger and Harmon, 1997; Furukawa and Mattson, 1998; Cheng <i>et al.</i>, 2002; Mileusnic, Lancashire and Rose, 2004) -Impliqué dans la survie cellulaire (Milosch <i>et al.</i>, 2014)
<ul style="list-style-type: none"> -Propriétés plutôt bénéfiques dans les conditions physiologiques (Chasseigneaux and Allinquant, 2012) -Implication dans la tumorigénèse suggérée en cas de surabondance (Nhan, Chiang and Koo, 2015) -Taux d'expression diminués dans la MA (Taylor <i>et al.</i>, 2008) 	

sAPP β

-Même séquence que le sAPP α avec 16 acides aminés en moins au niveau de la région C-ter (Chasseigneaux and Allinquant, 2012)

-Facteur neuroprotecteur similaire au fragment sAPP α mais 100 fois moins efficace (Furukawa *et al.*, 2002)

-Favorise la croissance axonale durant le développement et en réponse aux dommages cérébraux (Chasseigneaux *et al.*, 2011)

-Induit la différenciation neuronale des cellules souches (Freude *et al.*, 2011)

-Facteur déterminant dans le stress du RE, l'inflammation et la résistance à l'insuline dans les cellules du muscle squelettique (Botteri *et al.*, 2018)

-Stimule le système glutamatergique dans les neurones hippocampiques *in vitro* et régule le développement neuronal et la formation des synapses de manière dépendante du stade (Hesse *et al.*, 2018)

-Active DR-6, un récepteur cytoplasmique de mort cellulaire, pour induire la neurodégénérescence (Nikolaev *et al.*, 2009)

α -CTF

-Peu de données disponibles concernant ce fragment (Nhan, Chiang and Koo, 2015; Müller, Deller and Korte, 2017).

-Aucune fonction identifiée à ce jour

β -CTF

-Fragment plutôt délétère pour les neurones (Nhan, Chiang and Koo, 2015)

- S'accumule dans les cerveaux de patients Alzheimer (Pera *et al.*, 2013).

-Facteur neurotoxique *in vitro* et *in vivo* (Neve, Kammesheidt and Hohmann, 1992; Kim and Suh, 1996; Song *et al.*, 1998; Bittner *et al.*, 2009; Lauritzen *et al.*, 2016)

-Altère la LTP, les processus de mémorisation et d'apprentissage (Nalbantoglu *et al.*, 1997; Berger-Sweeney *et al.*, 1999; Tamayev *et al.*, 2012)

-Initiateur du processus de neurodégénérescence et des altérations cognitives dans un modèle de souris transgénique modélisant la MA (Lauritzen *et al.*, 2012)

AICD

-Petit peptide court, difficile à isoler et à caractériser, qui est transloqué vers le noyau par interaction avec Fe65 (Cupers *et al.*, 2001; Kimberly *et al.*, 2001)

-Rôle controversé dans la MA (Ghosal *et al.*, 2009; Giliberto *et al.*, 2010)

-Interagit avec plus de 70 partenaires qui régulent sa stabilité et sa localisation cellulaire (Müller *et al.*, 2008; Bukhari *et al.*, 2017)

-Facteur de transcription de plus d'une vingtaine de gènes, régulant ainsi plusieurs fonctions et voies de signalisation cellulaires (Cao, 2001; Pardossi-Piquard and Checler, 2012; Bukhari *et al.*, 2017)

-Facteur cytotoxique et pro-apoptotique *in vitro* et *in vivo* (Kinoshita *et al.*, 2002; Kim, 2003; Chang *et al.*, 2006; Ozaki *et al.*, 2006; Nakayama *et al.*, 2008; Ohkawara *et al.*, 2011)

A β

-Existe sous plusieurs formes : monomères, dimères, trimères, oligomères, fibrilles (de 4 à plus de 100 kDa) (Jarosz-Griffiths *et al.*, 2016)

-Monomères majoritaires : A β ₄₀ (90%) et A β ₄₂ (<10% et formes plus agrégatives) (Sisodia and St George-Hyslop, 2002).

-Fragment majeur associé à la MA d'où l'hypothèse de la cascade amyloïde (Controversée) (Hardy *et al.*, 1992; De Strooper and Karran, 2016)

-Réduction d'A β ₄₂ dans le liquide céphalorachidien = bio marqueur de patients atteints de la MA (Shaw *et al.*, 2009)

-Impliqué à faible dose (pico molaire) dans le fonctionnement physiologique de la LTP et de la mémoire (Puzzo *et al.*, 2008, 2011; Morley and Farr, 2012)

-Favorise la croissance des neurones et neurites *in vitro* (Whitson, Selkoe and Cotman, 1989; Koo, Park and Selkoe, 1993; Chen and Dong, 2009)

-Peptides neurotoxiques (A β ₄₂ plus que A β ₄₀) : inhibe la LTP, altère la mémoire et le fonctionnement synaptique (Dahlgren *et al.*, 2002; Kienlen-Campard and Octave, 2002; Walsh *et al.*, 2002; Shankar *et al.*, 2008; S. Li *et al.*, 2011; Mucke and Selkoe, 2012; Jarosz-Griffiths *et al.*, 2016)

p3

-Très peu de données sur ce fragment et semble plutôt toxique (Nhan, Chiang and Koo, 2015)

-S'accumule dans les plaques amyloïdes des cerveaux de patients Alzheimer (Gowing *et al.*, 1994).

-Entraine l'apoptose dans les neurones (Wei, 2002)

-Facteur pro-inflammatoire (Szczepanik, Rampe and Ringheim, 2001)

-Neurotoxique (Jang *et al.*, 2010)

C31

-Pas de fonction particulière rapportée dans la littérature (Nhan, Chiang and Koo, 2015)

-Toxique de manière dépendante de l'APP et pro-apoptotique (Lu *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2009)

<p style="text-align: center;">Jcasp</p> <p>-Fragment jamais isolé dans un système biologique car certainement fort instable (Nhan, Chiang and Koo, 2015)</p>	<p>-Entraine l'apoptose dans les neurones <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> (Bertrand <i>et al.</i>, 2001; Madeira <i>et al.</i>, 2005)</p>
<p style="text-align: center;">sAPPδ₁₋₃₇₃</p> <p>-Nouveau fragment avec un seul article scientifique traitant de ses caractéristiques</p> <p>-Seul fragment soluble issu du clivage par l'AEP qui montre des effets (Zhentao Zhang <i>et al.</i>, 2015)</p>	<p>-Toxique pour les neurones : entraine une fragmentation axonale et la mort neuronale contrairement au fragment sAPP₁₋₅₈₅ qui n'est pas neurotoxique (Zhentao Zhang <i>et al.</i>, 2015)</p>
<p style="text-align: center;">Aη-α</p> <p>-Nouveau fragment avec un seul papier traitant de sa toxicité mais aucune fonction attribuée</p>	<p>-Réduit de manière significative de la LTP chez la souris lorsqu'il s'accumule (Willem <i>et al.</i>, 2015).</p> <p>-Réduit l'activité neuronale <i>in vivo</i> (Willem <i>et al.</i>, 2015).</p>

Tableau 1 : Propriétés des différents produits issus des clivages de l'APP par ses différentes sécrétases. En vert : fragment principalement bénéfique ou non pathologique, en rouge : fragment clairement impliqué dans la pathologie, en bleu : fragment au rôle incertain.

IV. Dégradation de l'APP et de ses fragments

Outre les différentes sécrétases intervenant dans la protéolyse quelque peu complexe de l'APP, il existe des voies alternatives de dégradation indépendantes de ces enzymes. Le rôle de ces voies dans le métabolisme de l'APP apparaît d'ailleurs intéressant à étudier et à comprendre puisque certains fragments dont les β -CTFs ou les peptides A β sont moins dégradés dans la MA. En effet, ils se retrouvent accumulés causant des altérations dans le cerveau de patients Alzheimer parce que les processus de dégradation s'avèreraient défectueux (Pera *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2018; Colacurcio *et al.*, 2018).

1. Les processus de dégradation intracellulaire

La cellule possède des systèmes de dégradation intracellulaire qui sont principalement représentés par le système ubiquitine-protéasome (UPS pour *Ubiquitin-proteasome system*) et la voie lysosomale (Nam *et al.*, 2017). Le système UPS ou le protéasome (26S) prend en charge la dégradation des protéines de durée de vie courte, qui lui sont adressées via la fixation d'une chaîne d'ubiquitine (au minimum 4) ou polyubiquitinylation, et qui sont ensuite recyclées en acides aminés. Les lysosomes dégradent, eux, les cargos (plus grosses protéines, de longue durée de vie ou organelles endommagées) qui lui sont délivrés par la voie d'autophagie ou la voie d'endocytose.

De par leurs propriétés différentes, l'APP et ses fragments ne sont pas tous dégradés de la même façon ce que nous allons présenter ci-dessous.

2. Dégradation de l'APP et des APP-CTFs

2.1. Rôle du protéasome

Bien que la forme entière de l'APP puisse être polyubiquitinylée sur des résidus lysine et prise en charge par des protéines impliquées dans la dégradation associée au RE (ERAD pour *Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*), il n'apparaît pas évident dans la littérature que l'APP soit directement dégradée par le protéasome (Kaneko *et al.*, 2010; El Ayadi *et al.*, 2012; Morel *et al.*, 2013; Atkin *et al.*, 2014). Des études ont d'ailleurs montré que l'inhibition du protéasome n'altérait pas les niveaux d'expression de l'APP totale (Kienlen-Campard *et al.*, 2006; Agholme *et al.*, 2012). Le protéasome aurait plutôt des effets indirects sur la dégradation de l'APP en modulant la dégradation de protéases impliquées dans son métabolisme telles que APH-1, PS1, NCT ou BACE1 (Marambaud *et al.*, 1998; He *et al.*, 2006, 2007; Wang *et al.*, 2012).

2.2. Rôle des lysosomes

Ainsi, et comme nous l'avons expliqué dans la partie II de ce chapitre, l'APP est retrouvée le long de la voie endosome/lysosome et est majoritairement adressée aux lysosomes où elle va y être dégradée dans les conditions physiologiques.

De la même façon, les fragments APP-CTFs sont également dégradés par la voie lysosomale puisque l'inhibition des protéases lysosomales par des agents alcalinisant tels que la chloroquine ou le chlorure d'ammonium, entraîne une accumulation de ces fragments (Caporaso, 1992; Schrader-Fischer and Paganetti, 1996; Vingtdeux, Hamdane, Bégard, *et al.*, 2007; Vingtdeux, Hamdane, Loyens, *et al.*,

2007; González *et al.*, 2017). Cependant, il est suggéré dans la littérature que le protéasome pourrait également être responsable de la dégradation des APP-CTFs et notamment du fragment β -CTF (Skovronsky *et al.*, 2000; Nunan *et al.*, 2001, 2003). Plusieurs études ont rapporté des effets différents sur la dégradation des APP-CTFs par le protéasome. Alors que certains auteurs montrent que l'inhibition du protéasome entraîne une augmentation des peptides A β , d'autres montrent que cette production est réduite (Nunan *et al.*, 2001; Lopez Salon *et al.*, 2003; Kienlen-Campard *et al.*, 2006). Ces observations ne sont pas toutes rapportées dans le même modèle cellulaire ou animal avec une expression d'APP endogène, une surexpression d'APP ou de formes tronquées APP-CTFs. Des précautions doivent être prises dans l'interprétation des résultats et leurs comparaisons. Par ailleurs, les contributions relatives du protéasome et des lysosomes à la dégradation des APP-CTFs restent à établir et seront développées dans la partie résultats de cette thèse.

3. Dégradation des peptides A β et AICD

3.1. Dégradation extracellulaire du peptide A β

Il existe plusieurs protéases impliquées dans la dégradation du peptide A β : l'IDE pour *Insulin-Degrading Enzyme*, la Neprilysine (NEP), des MMPs, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), les enzymes de conversion de l'endothéline 1 et 2 (ECE-1 et ECE-2), la Plasmine et les cathepsines principalement (Bart De Strooper, 2010; Saido and Leissring, 2012; Baranello *et al.*, 2015). Parmi ces enzymes, l'IDE et la NEP sont les plus étudiées dans la littérature. Ce sont toutes deux des zinc métalloprotéases capables de dégrader le peptide A β sécrété mais c'est la NEP qui apparaît être l'enzyme la plus efficace (Vekrellis *et al.*, 2000; Shirotani *et al.*, 2001).

3.2. Dégradation intracellulaire du peptide A β

Le peptide A β peut ainsi être dégradé dans le milieu extracellulaire lorsqu'il est sécrété mais aussi, avant cela, au sein de la cellule par certaines des protéases citées précédemment. En effet, l'IDE, la NEP, les MMPs, l'ECE, l'enzyme de conversion de l'angiotensine et les plasmines sont des enzymes sécrétées dans le milieu extracellulaire où elles peuvent agir sur les peptides A β relargués par la cellule. Bien qu'elles soient sécrétées, certaines de ces enzymes comme l'IDE ou l'ECE peuvent aussi être localisées dans la cellule, notamment au niveau des endosomes de recyclage ou des lysosomes où elles peuvent dégrader les peptides A β avant qu'ils ne soient sécrétés (Murakami *et al.*, 1998; Saido and Leissring, 2012; Pacheco-Quinto and Eckman, 2013). L'IDE est une protéine principalement

cytosolique qui est d'ailleurs l'enzyme de dégradation majeure de l'AICD (Edbauer *et al.*, 2002; Buoso *et al.*, 2010). D'autres enzymes n'agissent, elles, que dans la cellule comme les cathepsines. Ce sont, notamment les Cathepsine B et D, qui furent découvertes plus tôt, comme étant impliquées dans la dégradation du peptide A β au niveau de la voie endosome/lysosome (Hamazaki, 1996; Frautschy *et al.*, 1998; Asai *et al.*, 2011).

3.3. Dégradation de l'AICD

D'autre part, la contrepartie du peptide A β qu'est l'AICD pourrait aussi être, lui-aussi, dégradé par la voie endosome/lysosome, en plus de l'IDE, puisqu'il s'accumule en présence de traitements alcalinisants (Vingtdeux, Hamdane, Bégard, *et al.*, 2007). Cependant, l'AICD étant libéré dans le cytosol après clivage de l'APP-CTF par la γ -sécrétase, son transport vers cette voie vésiculaire reste encore à élucider. De façon intéressante, il a été montré que l'AICD peut interagir avec la Flottiline-1, une protéine présente dans les radeaux lipidiques (microdomaines de la membrane plasmique) et qu'il est aussi retrouvé dans la lumière des corps multi-vésiculaires (Chen *et al.*, 2006; Vingtdeux, Hamdane, Loyens, *et al.*, 2007). Ces données suggèrent bien que l'AICD peut être localisé dans des vésicules intracellulaires, et ce, probablement par interaction avec des protéines membranaires.

V. Mutation de l'APP et maladies associées

Nous avons pu voir que l'APP et ses métabolites étaient impliqués dans diverses fonctions importantes pour la cellule. Ainsi, il apparaît évident qu'une dérégulation de l'APP et/ou de son métabolisme soient impliquées dans des mécanismes pathologiques.

1. Conséquences pathologiques des mutations de l'APP

Les mutations de l'APP, généralement faux-sens, sont principalement associées aux formes familiales précoces de la MA (EOAD pour *Early Onset Alzheimer's Disease*) ainsi qu'aux angiopathies amyloïdes cérébrales (AAC) dans lesquelles le peptide A β s'accumule dans la paroi des vaisseaux cérébraux. Il existe plus d'une cinquantaine de mutations de ce gène recensées à ce jour (uantwerpen.vib.be/ADMutations/; alzforum.org/mutations). Il s'agit de mutations autosomales dominantes pour la plupart mais une mutation autosomale récessive fut découverte en 2010 (Giaccone

et al., 2010). En plus des mutations, les duplications de l'APP conduisent également à des formes d'EOAD autosomales dominantes et aux AAC (Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006; Sleegers *et al.*, 2006; Mann *et al.*, 2018). La trisomie du chromosome 21, lequel portant l'APP et à l'origine du syndrome de Down, est de la même façon associée à la MA (Delabar *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2017).



Figure 5: Cartographie des mutations de l'APP. Les mutations sont nommées par rapport à leur position dans la séquence en acide aminé de l'isoforme APP770. Les mutations pathogéniques sont indiquées en rouge et les non pathogéniques en vert. La mutation protectrice 673 est indiquée en jaune et en bleu, une mutation dont l'effet est incertain.

Source : alzforum.org/

2. Les mutations de l'APP

Toutes les mutations de l'APP ne sont pas nécessairement pathogéniques mais elles le sont pour la plupart (Figure 5). La pathogénicité de celles-ci altère le métabolisme de l'APP par les sécrétases en augmentant la production de peptides A β totale ou de certaines formes et/ou en modifiant le ratio de peptides A β en faveur des formes plus toxiques et plus agrégatives (TCW and Goate, 2017; M. Dai *et al.*, 2018). En effet, les différentes mutations pathogéniques sont situées proches des sites de

clivage β -sécrétase, γ -sécrétase ou au niveau de la séquence du peptide $A\beta$. Cependant, le mécanisme exact liant la mutation avec le changement de clivage par les sécrétases n'est pas encore bien compris.

A noter que les mutations dans les gènes codant pour les présénillines 1 et 2 (*PSEN1* et *PSEN2*), sont également associées à des altérations du métabolisme de l'APP et possèdent des conséquences similaires à celles mentionnées ci-dessus, que nous aborderons dans le chapitre II.

2.1. Mutation *APPV717I*

La première mutation décrite de l'APP fut la mutation pathogénique faux-sens *APPV717I*, substituant une valine par une isoleucine en position 717 dans l'exon 17 de ce gène. Elle fut dénommée « *London Mutation* » pour avoir été originalement découverte chez une personne anglaise atteinte précocement de la MA en 1991 (Goate *et al.*, 1991). Il s'agit d'une des mutations les plus fréquentes dans le monde. Elle est localisée au niveau du domaine transmembranaire de l'APP proche du site de coupure γ -sécrétase affectant à la fois le clivage γ -sécrétase mais aussi le clivage β -sécrétase (Muratore *et al.*, 2014). Il en résulte une augmentation du ratio $A\beta_{42/40}$ et des formes $A\beta_{42}$ et $A\beta_{38}$. Cette mutation entraîne ainsi la présence de plaques amyloïdes, de dégénérescences neurofibrillaires et des AAC variables (Hunter and Brayne, 2018).

2.2. Mutation *APPA673T* ou mutation protectrice

Malgré ces mutations pathogéniques, il existe une seule mutation de l'APP décrite à ce jour protectrice contre la MA et les déficits associés. Mise en évidence dans une population d'islandais en 2012, elle fut dénommée « *Icelandic mutation* ». Cette substitution d'une alanine par une thréonine en position 673 est retrouvée significativement plus fréquente chez des personnes âgées non atteintes de la MA que chez des patients Alzheimer. Elle est associée à une meilleure conservation des fonctions cognitives avec l'âge (Jonsson *et al.*, 2012). De plus, des études *in vitro* réalisées par ce même groupe ont montré que cette mutation diminuait la production des formes sAPP β d'environ 50% et des peptides $A\beta_{40/42}$ de 40% démontrant ainsi une réduction du clivage β -sécrétase de l'APP. L'effet protecteur de cette substitution fut confirmé par un autre groupe de scientifiques dont les résultats démontrèrent une réduction du clivage de l'APP par BACE1 et de l'agrégation des peptides $A\beta$ (Maloney *et al.*, 2014).

L'identification de nombreuses mutations de l'*APP*, entraînant une augmentation ou une réduction de la production de peptides A β et accroissant ou non le risque de MA, alimente l'hypothèse de la cascade amyloïde proposée par John A. Hardy et Gerald A. Higgins en 1992. Cette dernière suggère que les plaques amyloïdes ou plus particulièrement leurs constituants majeurs : les peptides A β , sont à l'origine de la MA (Hardy *et al.*, 1992). Toutefois, la linéarité de cette cascade reste encore mal comprise et très controversée. En effet, elle apparaît incompatible avec les observations cliniques et ne considère pas que plusieurs mécanismes ou même un seul puissent avoir différents effets à différents niveaux de la pathologie.

Selon les généticiens, la cascade amyloïde est « reine » pour expliquer le développement des formes familiales de la MA causées par des mutations de l'*APP*. Cependant, ces formes sont très rares, représentant moins de 1% des cas et n'impliquent pas que des mutations de l'*APP* (Hunter and Brayne, 2018). En effet, la MA est une pathologie multifactorielle dans laquelle l'*APP* n'est pas la seule protéine impliquée.

Chapitre 2 : La Maladie d'Alzheimer

C'est en 1906, au 37^{ème} congrès des psychiatres allemands à Tübingen, que le psychiatre et neuropathologiste allemand, Alois Alzheimer (1864-1915), présenta la première description histopathologique des lésions cérébrales caractéristiques de la pathologie à laquelle son nom sera donnée quelques années plus tard (Hippius and Neundörfer, 2003). Il y exposa le cas de sa patiente, Auguste Deter (Figure 6), admise à l'hôpital en 1901 à l'âge de 51 ans pour cause de démence et qui y décéda 5 ans plus tard d'une maladie non connue à cette époque. A sa mort, Alzheimer pratiqua une autopsie de son cerveau et rapporta « un processus morbide sévère et étrange du cortex cérébral » devenant ainsi le premier cas de MA.

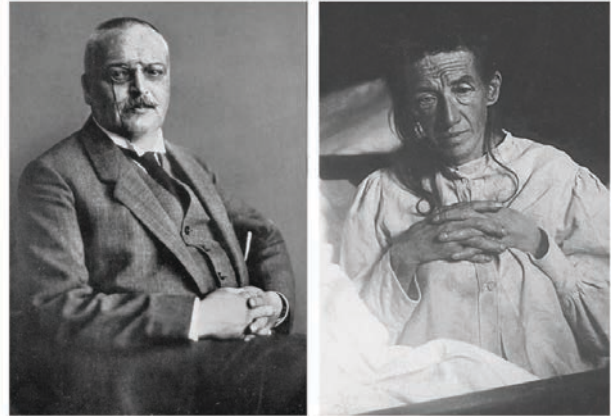


Figure 6 : Photographie d'Alois Alzheimer (Gauche) et de sa patiente Auguste Deter (Droite). Issue de (Bondi, Edmonds and Salmon, 2017)

I. Généralités

La MA est une pathologie neurodégénérative sévère, lente et progressive associée principalement à des troubles de la mémoire, de l'attention, des fonctions exécutives et instrumentales avec un déclin cognitif qui évolue vers une perte d'autonomie (El Kadmiri *et al.*, 2013). Les troubles de la mémoire sont d'ailleurs plus fortement accentués dans cette maladie et en constituent généralement le premier symptôme.

La MA est la maladie neurodégénérative la plus fréquente dans le monde, la 4^{ème} cause de mortalité en France et représente plus de 70% des syndromes démentiels de la personne âgée (www.frm.org). Il s'agit d'une démence évolutive qui s'aggrave avec le temps. L'espérance de vie des personnes démentes varie beaucoup entre les individus, avec une médiane de survie comprise entre 3,2 et 6,6 ans à partir du diagnostic (Todd *et al.*, 2013). Bien qu'elle représente un enjeu de santé publique majeure, notamment en France, il n'existe toujours pas de traitements efficaces et la MA reste encore une maladie incurable à ce jour.

II. Origines et Causes

La MA est une affection polyfactorielle, c'est-à-dire qu'il n'existe pas une seule cause pour expliquer le développement de cette maladie. Son étiologie semble résulter à la fois de facteurs génétiques mais aussi de facteurs environnementaux (El Kadmiri *et al.*, 2013).

1. Formes familiales de la MA

Les formes familiales de la MA sont causées par des mutations génétiques monogéniques et se transmettent principalement de manière autosomique dominante (forme héréditaire). Ces formes sont très rares puisqu'elles représentent moins de 1% de l'ensemble des formes de MA. Elles sont également caractérisées par une sévérité et une progression plus importantes ainsi qu'une apparition plus précoce de la maladie, avant l'âge de 65 ans, contrairement aux formes sporadiques (Reitz and Mayeux, 2014).

1.1. Mutations génétiques à l'origine de la MA

Il existe à ce jour environ 343 mutations identifiées à l'origine de la MA impliquant trois gènes distincts et reconnus : *APP*, *PSEN1* et *PSEN2* (Alzforum.org; Goate *et al.*, 1991; Schellenberg *et al.*, 1992; Rogaev *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995). Il existe également d'autres cas de formes génétique de MA qui ne peuvent pas être à l'un de ces trois gènes et qui restent encore à découvrir.

Les mutations de l'*APP* représentent environ 15% des cas de formes monogéniques de la MA et 0,5% de la totalité des cas de MA. Elles sont à l'origine de modifications de la production de peptides A β comme décrit précédemment (voir Chap. I. V).

1.2. Mutations des gènes *PSEN1* et *PSEN2*

Les mutations les plus fréquentes causant la MA sont retrouvées dans le gène *PSEN1*, porté par le chromosome 14 et impliqué dans 72% de cas contre 13% de mutations du gène *PSEN2*, porté par le chromosome 1 (El Kadmiri *et al.*, 2013). Les mutations de ces gènes codant pour des protéines du complexe γ -sécrétase altèrent les fonctions de ce complexe et la production des peptides A β . Cependant, la contribution de ces mutations à la MA n'est pas encore bien comprise (Hunter and Brayne, 2018). En effet, l'implication de la γ -sécrétase dans diverses voies cellulaires tels

l'homéostasie du calcium dans le RE ou les fonctions mitochondriales suggèreraient qu'une modification du clivage γ -sécrétase de l'APP ne serait pas le seul événement cellulaire à l'origine de la MA (De Strooper and Annaert, 2010; Contino *et al.*, 2017).

2. Formes sporadiques de la MA et les facteurs de risques

Les formes sporadiques de la MA représentent plus de 95% des cas et se développent pour la majorité, après l'âge de 65 ans (Reitz and Mayeux, 2014). Elles sont associées à plusieurs facteurs de risques génétiques ou environnementaux dont certains sont clairement reconnus. En outre, l'étude PAQUID (Personne âgée quid), une étude épidémiologique française, a notamment permis de mettre en évidence certains facteurs de risques liés à la MA qui sont également confortés par d'autres études (Dartigues *et al.*, 2012).

2.1. Les risques physiologiques

Tout d'abord, c'est l'âge qui apparaît être le principal facteur de risque associé à la MA dont la prévalence augmente avec le vieillissement : 5% après 65 ans et 30% après 80 ans (fondation-alzheimer.org). Les maladies cérébrovasculaires, les syndromes métaboliques, l'obésité ou les désordres cardiovasculaires comme le diabète de type 2, l'hypertension artérielle et des taux élevés de lipides dans le sang dont le cholestérol, sont également des facteurs qui accroissent le risque de MA (Reitz, Brayne and Mayeux, 2011; Dartigues *et al.*, 2012; Imtiaz *et al.*, 2014; Reitz and Mayeux, 2014).

2.2. Les risques liés au mode de vie

Le mode de vie peut également avoir un impact négatif sur le risque de développer la MA mais aussi s'avérer être un facteur protecteur contre celle-ci. En effet, il a été montré à travers plusieurs études qu'une alimentation saine et équilibrée en légumes, poissons et fruits ; la pratique d'une activité physique ; la non-consommation d'alcool et de tabac ; ou encore l'éducation et les interactions sociales permettaient de réduire le risque de démence et/ou de MA (Imtiaz *et al.*, 2014; Reitz and Mayeux, 2014). Comme c'est d'ailleurs le cas pour beaucoup d'autres pathologies, un mode de vie de bonne qualité diminue le risque de développer la MA.

2.3. Les risques génétiques non associés à des mutations

Pour finir, il existe également une composante génétique non associée à des mutations dominantes, par opposition aux EOAD, qui peut être un facteur de susceptibilité majeur de la MA.

2.3.1. L'apolipoprotéine E

Les porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ du gène de l'apolipoprotéine E (ApoE), impliquée dans la distribution des lipides aux cellules de l'organisme dont le cerveau, ont un risque augmenté de MA : 2 à 3 fois plus élevé avec un seul allèle et 12 à 15 fois plus de risques pour les porteurs de deux allèles (Strittmatter *et al.*, 1993; Farrer, 1997; El Kadmiri *et al.*, 2013). En effet, ce gène est présent sous trois formes alléliques dans la population générale ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) codant pour trois isoformes protéiques E2, E3 et E4 respectivement. L'isoforme ApoE4 est associée à une augmentation de la concentration du LDL-cholestérol dans le plasma et donc à un risque d'infarctus du myocarde contrairement à l'isoforme E2 qui le réduit. L'ApoE4 est plus susceptible d'adopter des conformations pathologiques et plus préjudiciables pour la neurobiologie. Récemment, il a même été démontré que l'ApoE pouvait stimuler la transcription de l'*APP* et la production de peptides A β en agissant sur des voies MAP kinase *in vivo*, avec l'isoforme ApoE4 ayant un effet plus fort que l'ApoE3 (Huang *et al.*, 2017). Bien que cette population présente un risque, la présence de l'allèle $\epsilon 4$ n'est pas nécessaire ni suffisante pour développer la MA (El Kadmiri *et al.*, 2013).

2.3.2. Les études d'association pangénomique

D'autres gènes ont pu être identifiés comme facteurs de risques via des études d'association pangénomique répartis principalement dans trois voies : le transport de l'*APP* (*PLD3*), l'endocytose (*PICALM*, *BNI*, *SORL1*) ou le métabolisme lipidique (*SORL1*, *CLU*, *APOE*) (Harold *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2009; Seshadri, 2010; Reitz and Mayeux, 2014; Shen and Jia, 2016; Penke, Bogár and Fülöp, 2017; Zhu *et al.*, 2017). De nombreuses études de ce genre sont réalisées pour permettre d'établir des locus à risques additionnels et de mieux comprendre le développement de la MA.

Que la MA soit d'origine familiale ou sporadique, les caractéristiques cliniques et biologiques développées par les patients atteints sont principalement les mêmes. En effet, comme mentionné plus haut, c'est la sévérité et la progression des dommages qui peuvent varier. Ainsi, nous allons présenter les caractéristiques cliniques puis biologiques de la MA dans les paragraphes suivants.

III. Clinique de la MA

La MA n'est pas une maladie bien diagnostiquée en France malgré des avancées importantes dans le domaine. Il semblerait qu'un cas sur deux soit diagnostiqué (vaincrealzheimer.org). Malheureusement, c'est parfois au stade de démence bien avancé que la maladie est constatée, retardant la prise en charge des patients.

1. Le diagnostic

1.1. Les premiers diagnostics

A l'origine, le diagnostic d'une atteinte probable de la MA reposait sur l'association d'une démence établie par des examens cliniques et confirmée par des tests neuropsychologiques ; une détérioration d'au moins deux fonctions cognitives ; une aggravation progressive de la mémoire et d'autres fonctions cognitives ; l'absence de trouble de la conscience et l'absence d'autres désordres neurologiques pouvant conduire à une démence. Ces critères avaient été établis en 1984 par le groupe de travail NINCDS-ADRDA, pour *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (Farrer, 1997). Ils permettaient de déterminer une MA soit possible, soit probable ou alors certaine. Depuis, ces critères furent révisés et élargis afin d'intégrer les nouvelles connaissances sur la génétique de la MA comme la détection de biomarqueurs (A β et Tau) et l'imagerie cérébrale (McKhann *et al.*, 2011).

1.2. Le diagnostic de nos jours

Désormais, le diagnostic des patients repose sur un ensemble d'examens cliniques qui permettent d'orienter le diagnostic du syndrome démentiel vers une pathologie Alzheimer ou une autre. Il débute par le dépistage clinique de troubles cognitifs grâce à des instruments d'évaluation cognitive brève dont le plus largement utilisé est le MMSE, pour *Mini-Mental State Examen* (Folstein, Folstein and McHugh, 1975; El Kadmiri *et al.*, 2013). Lorsque ces outils permettent de conclure à la suspicion de démence, les examens cliniques à proprement parler sont engagés. Ils consistent en l'anamnèse prise auprès du patient et son entourage et des analyses médicales : tests sanguins, ponction lombaire et imageries cérébrales pour détecter les caractéristiques cliniques de la MA. Ces derniers ne sont pas obligatoirement réalisés en routine mais apparaissent très utiles pour augmenter la spécificité du diagnostic (Reitz and Mayeux, 2014). Bien que ces outils permettent d'établir un diagnostic clinique

sur l'état du patient, le diagnostic définitif et certain ne peut être réalisé que *post-mortem* après autopsie du cerveau, en observant la présence des deux lésions caractéristiques de la MA (plaques amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires).

2. Caractéristiques cliniques et biomarqueurs

Dans la MA, les premières lésions cérébrales se développent plusieurs années avant l'apparition des premiers symptômes (phase pré-symptomatique). C'est à la suite des tests cliniques orientés vers une MA que le patient est amené à pratiquer des tests paracliniques pour conclure au diagnostic spécifique de la maladie. Grâce aux recherches épidémiologiques, de nombreux biomarqueurs de la MA ont pu être identifiés. Ces outils, comprenant des mesures dans le LCR et de la neuroimagerie, permettent de mettre en évidence les risques mais surtout de contribuer à augmenter la spécificité du diagnostic de la MA.

2.1. Biomarqueurs du LCR

Bien que cela soit une technique invasive, la ponction lombaire de LCR permet de doser les biomarqueurs de la MA que sont les peptides A β et les protéines Tau (totale et phosphorylée) (Blennow *et al.*, 2010). Le LCR, étant en contact direct avec le cerveau, permet les échanges protéiques et reflète les changements métaboliques cérébraux. Ainsi, celui de patients diagnostiqués Alzheimer est caractérisé par une diminution des taux de peptides A β , et plus particulièrement du ratio A $\beta_{42/40}$, ainsi que par une augmentation des protéines Tau totales et phosphorylées (P-tau) (Ewers *et al.*, 2007; Hansson *et al.*, 2007). En effet, il est suggéré que c'est l'accumulation des espèces A β en protofibrilles puis en plaques amyloïdes, ainsi retenues dans le parenchyme cérébrale, qui réduit les formes solubles d'A β pouvant diffuser dans le LCR (Fagan *et al.*, 2006). Cependant, la corrélation entre les taux de P-Tau dans le LCR et les dégénérescences neurofibrillaires (agrégats de protéines Tau voir Chapitre II. IV. 3) reste encore controversée dans la littérature (Reitz and Mayeux, 2014). Malgré son efficacité et sa précision, la ponction lombaire n'est proposée qu'aux personnes dont le diagnostic est atypique ou incertain (vaincrealzheimer.org).

2.2. Imagerie cérébrale et MA

Parmi les méthodes d'investigation clinique, l'imagerie médicale est une technique moins invasive et permet des études plus précises sur l'anatomie et la fonctionnalité du cerveau. Elle permet également de suivre l'évolution de la maladie de façon chronologique et spatiale.

2.2.1. Imagerie par résonance magnétique ou par tomodensitométrie

Dans la MA, il existe une atrophie cérébrale corticale au niveau du lobe temporal, particulièrement l'hippocampe et l'amygdale, qui peut être quantifiée chez les patients par résonance magnétique (IRM) (Figure 7) ou tomodensitométrie (CT-scan) (Jack *et al.*, 1992; Ballard *et al.*, 2011). Ces méthodes permettent la mise en évidence des changements de densité et de volume de la matière cérébrale, donc de l'atrophie, celle-ci étant le reflet probable de la perte neuronale et dendritique caractéristique de la MA. Il est d'ailleurs possible de distinguer, grâce à l'IRM, une atrophie liée au vieillissement normal d'une atrophie causée par un stage précoce de MA avec une bonne spécificité (Scheltens *et al.*, 2002; Henriques *et al.*, 2018). La volumétrie de l'hippocampe apparaît comme un des marqueurs structurels les mieux établis dans le suivi de la progression de la MA.

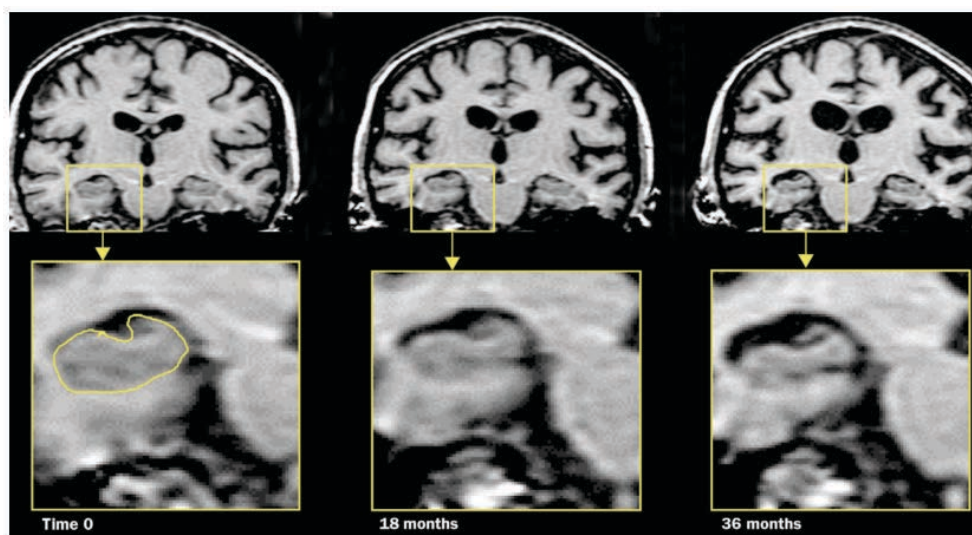


Figure 7 : Séries d'IRM en coupe coronale d'un patient atteint de MA. Image d'IRM à trois temps donné à 18 mois d'intervalle. L'atrophie progressive de l'hippocampe est distinguable notamment grâce aux grossissements sur la région (entourée en jaune). Issue de (Scheltens *et al.*, 2002)

2.2.2. La tomographie par émission de positron

Un autre genre d'information peut être collecté au niveau cérébral à l'aide de ligands radioactifs en utilisant la tomographie par émission de positons (PET). En effet, cette technique permet de mesurer le métabolisme cérébral et l'activité synaptique chez les patients grâce au ^{18}F -fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG) (Sokoloff, 1977). Il s'agit d'un analogue du glucose radiomarqué dont la consommation par le cerveau reflète l'activité neuronale. Dans la MA, il existe un hypométabolisme du glucose dans certaines régions spécifiques du cerveau (zone pariétale) permettant de diagnostiquer les patients atteints (Figure 8) (Reitz and Mayeux, 2014; Henriques *et al.*, 2018). De plus, cette diminution de consommation de glucose locale peut coïncider avec une charge amyloïde importante au niveau des régions pariétales (Klunk *et al.*, 2004). La charge amyloïde peut également être détectée par PET avec le ^{18}F -florbetapir et le ^{11}C -Pittsburg Compound B (^{11}C -PIB) (Figure 8) (Landau *et al.*, 2014). Les dépôts amyloïdes caractéristiques de la maladie peuvent être ainsi marqués de façon sélective chez les patients atteints de la MA, contribuant au diagnostic précis de la maladie.

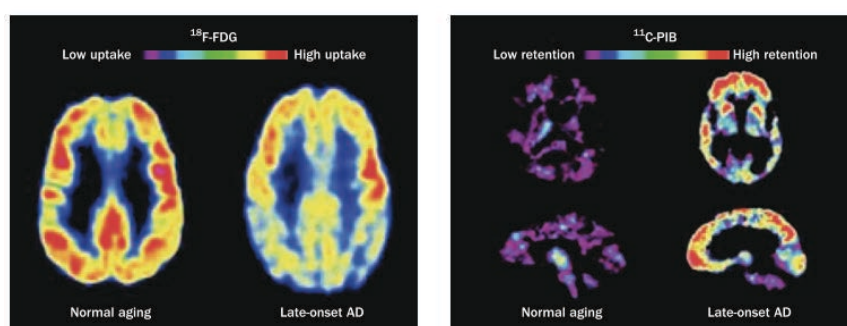


Figure 8 : Consommation de glucose et détection de la charge amyloïde dans des cerveaux de patients Alzheimer comparés à des contrôles. L'hypométabolisme du glucose est visible sur le panel de gauche où l'incorporation de ^{18}F -fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG) est réduite chez le patient atteint, particulièrement dans les régions pariétales et temporales, en comparaison avec le cerveau sain âgé. Sur le panel droit, la forte concentration de ^{11}C -Pittsburg Compound B (^{11}C -PIB) chez le patient Alzheimer traduit un nombre important de dépôts amyloïdes chez celui-ci par rapport au control. Issue de (Reitz, Brayne and Mayeux, 2011)

Ces différentes méthodes de diagnostic et d'analyses médicales ont conduit à une meilleure compréhension de la MA et du lien existant entre les anomalies cérébrales et l'expression clinique observée. Aussi, une meilleure compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans le développement de la MA permettrait de développer des traitements une fois le diagnostic établi.

IV. Caractéristiques biologiques et lésions de la MA

1. Généralités

Il existe deux principales composantes neuropathologiques de la MA qui sont : les plaques amyloïdes extracellulaires, composées d'agrégats de peptides A β , et les enchevêtrements neurofibrillaires intraneuronaux causés l'accumulation de protéines Tau, anormalement et hyperphosphorylées (Brion *et al.*, 1985; Bart De Strooper, 2010; Ballard *et al.*, 2011). Il s'agit là des caractéristiques les plus représentatives de la MA puisque ce sont les deux lésions qui permettent d'émettre un diagnostic définitif de la MA au décès du patient. Cependant, la MA est également marquée par : une perte synaptique, une dérégulation de l'homéostasie cellulaire et des systèmes de clairance mis en jeu pour l'élimination des agrégats protéiques (système ubiquitine-protéasome et autophagie), une neuro-inflammation, un stress oxydatif avec production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) et une perte neuronale *in fine* (De Strooper and Karran, 2016; Chung *et al.*, 2018).

Bien que les caractéristiques de la MA soient maintenant connues et largement étudiées, il n'est pas encore possible de conclure sur le processus cellulaire initiant le développement de la MA. Le déroulement temporel des mécanismes moléculaires de cette maladie reste encore indéfini. En effet, la toxicité induite par les peptides A β , les protéines Tau et leur agrégation semble pouvoir être aussi bien une cause comme une conséquence des dérégulations de l'homéostasie cellulaire dans la MA, sous forme sporadique (De Strooper and Karran, 2016; Congdon and Sigurdsson, 2018).

Au court de cette thèse, nous nous sommes notamment intéressés à la réduction pharmacologique des deux éléments protéiques retrouvés accumulés dans la MA : les peptides A β et la protéine Tau. En effet, les dépôts amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire (DNF) constituent le cœur de la maladie et sont des cibles thérapeutiques majeures.

2. Les dépôts amyloïdes

2.1. Composition

Les dépôts ou plaques amyloïdes sont composés par l'accumulation et l'agrégation de peptides A β dans le parenchyme intercellulaire, issus des clivages séquentiels de l'APP par les sécrétases de la voie amyloïde (cf. chapitre I) (Glennner and Wong, 1984; Goldgaber *et al.*, 1987; Tanzi *et al.*, 1987). L'accumulation de ce peptide semble être le résultat de l'augmentation de sa production, de la

génération de formes plus propices à l'agrégation associées à une diminution de sa dégradation (Baranello *et al.*, 2015; Takahashi, Nagao and Gouras, 2017).

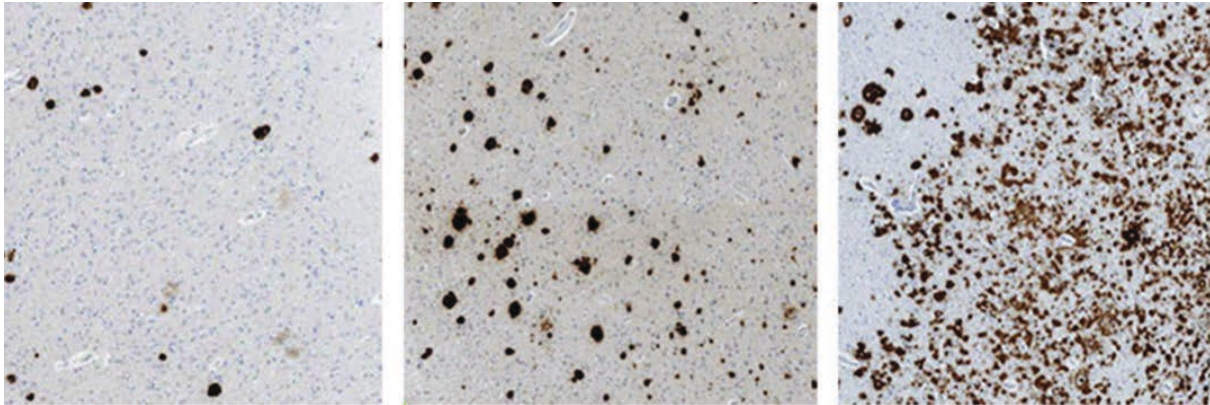


Figure 9 : Dépôts de plaques amyloïdes dans des cerveaux de patients atteints de la MA. Exemple de l'augmentation visuelle des dépôts amyloïdes avec une charge amyloïde légère à gauche, une charge modérée au centre et une charge sévère à droite. Il s'agit de coupes cérébrales produites à partir de blocs de paraffine marqués avec un anticorps anti-A β (clone 6F/3D). Issue de (Josephs *et al.*, 2008)

2.2. L'agrégation des peptides A β

C'est la forme A β_{1-42} qui est majoritairement présente dans les plaques amyloïdes et qui est la première à s'accumuler, bien que la forme A β_{1-40} soit plus abondante dans le cerveau (Iwatsubo *et al.*, 1994; Lamere *et al.*, 1996; Reiss *et al.*, 2018). Les peptides A β_{1-42} sont plus propices à l'agrégation et vont s'associer en oligomères plus rapidement (Jarrett, Berger and Lansbury, 1993b, 1993a; El-Agnaf *et al.*, 2000). Les oligomères d'A β vont ensuite devenir des fibrilles, lesquelles vont s'agréger en dépôts (Figure 9) (Benseny-Cases, Cócera and Cladera, 2007). Une fois agrégés en fibrilles, les agrégats de peptides A β deviennent résistants à la dégradation et aux clivages protéolytiques.

2.3. Toxicité liée aux peptides A β et leurs formes

Bien que la relative toxicité de chaque forme reste encore controversée dans la littérature, il semblerait que les produits intermédiaires (oligomères ou protofibrilles), s'accumulant très précocement dans la MA, soient plus toxiques que les plaques elles-mêmes (Walsh and Selkoe, 2004; Reiss *et al.*, 2018). Les monomères de peptides A β ne sont pas toxiques à des concentrations de l'ordre du picomolaire (Tableau 1) et peuvent même s'avérer neuroprotecteurs (Giuffrida *et al.*, 2009).

Cependant, dès qu'ils s'agrègent, ils peuvent devenir toxiques en interférant avec les fonctions synaptiques ou neuronales. En effet, plusieurs études ont montré que les oligomères pouvaient interagir avec la membrane, des récepteurs et/ou des canaux protéiques, des voies de signalisation, altérant l'intégrité des membranes, la transmission et/ou l'activité synaptique et neuronale (Haass and Selkoe, 2007). D'autre part, les dépôts fibrillaires d'A β sont également associés à des neurites dystrophiques, une neurodégénérescence ou altérations locales des synapses (Tsai *et al.*, 2004; He *et al.*, 2012; Reiss *et al.*, 2018).

2.4. Mécanisme d'agrégation

Le mécanisme par lequel les peptides s'agrègent entre eux et l'espace (intra- ou extracellulaire) dans lequel il débute, ne sont pas encore clairement établis. Cependant, il a récemment été suggéré dans la littérature que des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation dans le milieu extracellulaire ou la formation de pyroglutamate pourraient influencer ce phénomène agrégatif (Schlenzig *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011; Thal *et al.*, 2015). En outre, certains auteurs suggèrent que l'agrégation serait initiée plutôt dans les neurones que dans l'espace extracellulaire (Friedrich *et al.*, 2010; Takahashi, Nagao and Gouras, 2017). A l'heure actuelle, les données scientifiques s'accordent sur le fait que les peptides A β extra- et intracellulaires sont aussi importants les uns que les autres dans le développement de la MA et pourraient s'influencer mutuellement dans l'agrégation.

2.5. La pathologie amyloïde

Ainsi, les peptides A β et les dépôts associés ont suscité un grand intérêt dans la recherche scientifique concernant la MA. Ces plaques sont caractéristiques des cerveaux de patients atteints de la MA mais sont aussi retrouvées dans le cerveau de personnes âgées non démentes dans lequel elles se développent jusqu'à un certain seuil (Mackenzie, 1994). En effet, leur apparition ne conduit pas forcément à la MA et leur seule présence ne permet pas de prédire la survenue de la MA (Dubois *et al.*, 2018).

Les dépôts amyloïdes se font progressivement, dans le cerveau, selon un enchaînement spatio-temporel dans lequel les régions cérébrales sont impliquées de manière hiérarchique. Dans les années 2000, Thal et ses collaborateurs ont divisé cette progression en 5 phases dont la première débute exclusivement dans tout le néocortex (Figure 10). Dans une seconde phase, les dépôts se développent dans les régions allocorticales. Troisièmement, les noyaux diencephaliques, le striatum et les noyaux

cholinergiques du cerveau antérieur sont atteints. Dans la phase 4, plusieurs noyaux du tronc cérébral sont impliqués avant que l'ensemble du cerveau soit touché dans la phase 5 finale (Thal *et al.*, 2000, 2002).

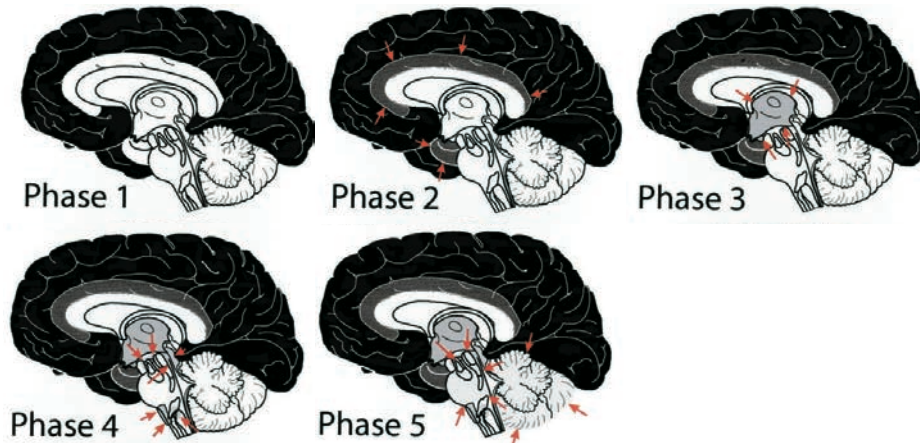


Figure 10 : Représentation des 5 phases de déposition des plaques amyloïdes dans la MA selon Thal. La phase 1 est caractérisée par des dépôts amyloïdes exclusivement néocorticaux (zone noire). La phase 2 montre des dépôts A β additionnels dans le cortex entorhinal et insulaire (flèches rouges). Dans la phase 3, des dépôts s'ajoutent au niveau des noyaux diencéphaliques (flèches rouges) et du striatum (non marqué). La phase 4 est marquée par l'atteinte de plusieurs noyaux du tronc cérébral : substance noire, noyaux rouges, centre gris, Colliculus supérieurs et inférieurs, olive bulbair et une partie de la formation réticulée (flèches rouges). Enfin, le cervelet et des noyaux cérébraux supplémentaires (noyaux pontiques, locus coeruleus, noyaux parabrachiaux, noyau réticulo-tegmental, noyau tegmental dorsal et noyaux de raphé oral et central) (flèches rouges) sont touchés dans la phase 5. Issue de (Thal *et al.*, 2002)

La progression de la pathologie amyloïde dans ces phases est ainsi associée à une propagation des dépôts amyloïdes mais aussi à des changements dans la composition en peptides A β des agrégats (Thal *et al.*, 2015). Elle suit un chemin séquentiel dans lequel la concentration en peptides A β solubles augmente et les agrégats insolubles s'accumulent. Des modifications post-traductionnelles, pouvant diminuer la clairance des peptides et contribuer à leur augmentation, se produisent également. Cependant, l'évènement critique à l'origine de la propagation des dépôts amyloïdes reste encore à déterminer. En effet, il n'y a actuellement aucune explication concernant l'initiation de la pathologie ou la raison pour laquelle elle se produit, du moins pour les formes sporadiques (Musiek and Holtzman, 2015).

3. La dégénérescence neurofibrillaire

3.1. Composition

La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) représente une lésion intraneuronale caractéristique de la MA mais elle est également retrouvée dans le vieillissement normal et dans d'autres pathologies de type démentiel. Les neurones affectés de manière préférentielle par la DNF sont les cellules pyramidales du cortex entorhinal, de l'hippocampe et du néocortex. La DNF correspond à un ensemble de filaments hélicoïdaux appariés (PHF pour *Paired Helical filaments*) retrouvés au niveau du corps cellulaire et des dendrites des neurones (Figure 11) (Kidd, 1963; Wiśniewski, Narang and Terry, 1976). De nombreux travaux ont d'ailleurs montré que les PHF étaient essentiellement constitués de la protéine Tau agrégée, anormalement et hyperphosphorylée (Brion *et al.*, 1985; Delacourte and Defossez, 1986; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986).

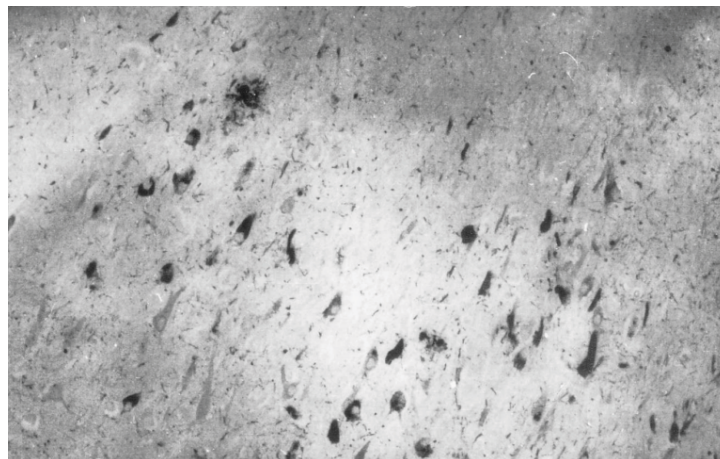


Figure 11 : Immuno-marquage de dégénérescences neurofibrillaires dans l'hippocampe d'un patient Alzheimer par la méthode PAP de Sternbefser. (x 800) Issue de (Brion *et al.*, 1985)

3.2. La protéine Tau

La protéine Tau est une protéine du cytosquelette appartenant à la famille des protéines associées aux microtubules (MAP pour *Microtubule Associated Protein*) (Weingarten *et al.*, 1975). Elle est codée par un gène unique *MAPT*, porté par le chromosome 17 (locus 17q21) dont l'expression peut conduire à 6 isoformes dans le cerveau humain adulte par épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 (Figure 12) (M Goedert *et al.*, 1989).

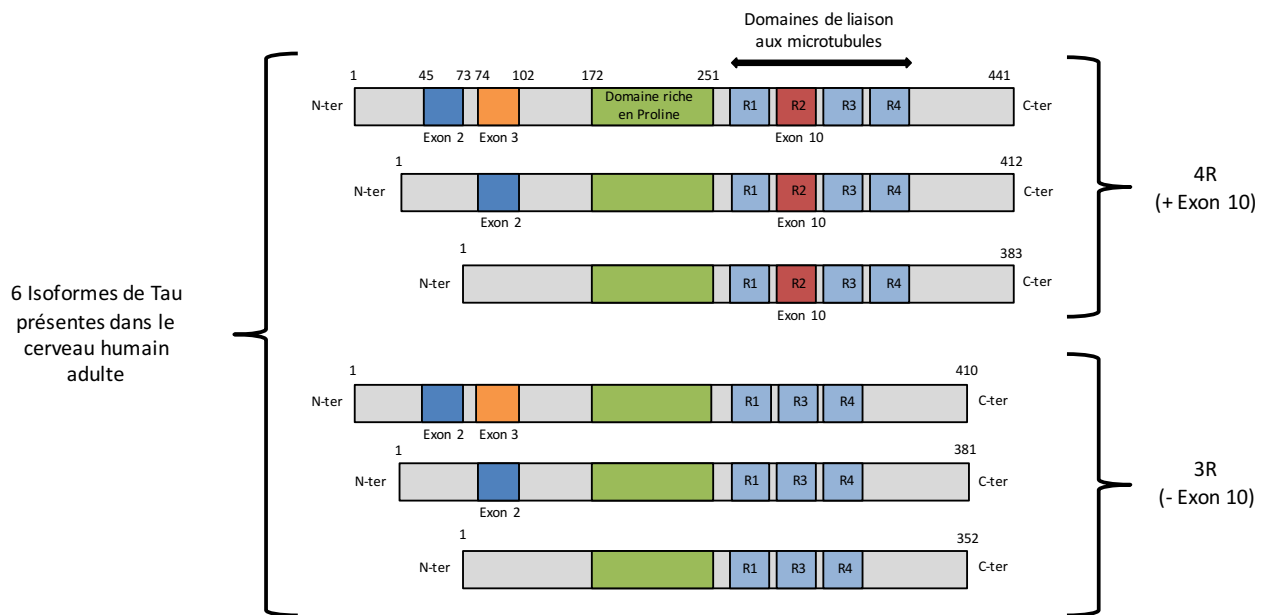


Figure 12 : Le gène *MAPT* humain et les 6 isoformes de la protéine Tau dans le cerveau humain.

Le gène codant pour la protéine Tau humaine, *MAPT*, possède 16 exons. Les exons 1 (E1), E4, E5, E7, E9, E11, E12 et E12 sont exprimés de façon constitutive tandis que les exons E2, E3 et E10 subissent un épissage alternatif. Les exons E-1 et E1 codent pour les séquences non traduites en 5' de l'ARNm de *MAPT*, tandis que E14 fait partie de la région non traduite en 3'. Les 6 isoformes de Tau présentes dans le cerveau humain adulte sont générées par un épissage alternatif de E2, E3 et E10. Ces isoformes diffèrent selon la présence de 0, 1 ou 2 inserts amino-terminaux (0N, 1N ou 2N, respectivement) et la présence de répétition R2, donnant 3 ou 4 domaines répétitifs carboxy-terminaux (3R ou 4R, respectivement). L'expression de la protéine Tau humaine est régulée par le développement : dans le cerveau adulte, six isoformes sont exprimées, alors que dans le cerveau du fœtus, seule l'isoforme de Tau la plus courte est exprimée. Dans le cerveau humain adulte, les niveaux des formes 3R et 4R sont à peu près égaux et l'isoforme 2N est sous-représentée par rapport aux autres : les isoformes Tau 0N, 1N et 2N représentent ~37%, ~54% et ~9% de l'expression des protéines Tau totale, respectivement. L'expression de Tau dans le cerveau humain montre une hétérogénéité importante au regard des différentes régions cérébrales. Inspirée de la thèse de TA 2016 et de (Wang and Mandelkow, 2016).

Les isoformes de la protéine Tau diffèrent entre elles par la présence ou non des fragments amino-terminaux (0N, 1N ou 2N) et/ou d'un 4^{ème} domaine de liaison aux microtubules (3R ou 4R) et par leur expression au cours du développement (Caillet-Boudin *et al.*, 2015; Guo, Noble and Hanger, 2017a; Chong *et al.*, 2018). Il est d'ailleurs possible de distinguer les pathologies associées à Tau, ou Tauopathies, en fonction des isoformes qui s'agrègent (Dickson *et al.*, 2012). Par exemple, la MA est une tauopathie 3R+4R.

3.2.1. Localisation et fonctions de Tau dans les neurones

Dans le cerveau, Tau est une protéine majoritairement neuronale et est retrouvée au niveau des axones mais aussi dans le noyau, les dendrites ou au niveau des synapses (Binder, 1985; Wang and Mandelkow, 2016). Elle possède plusieurs rôles physiologiques (Figure 13) dont le plus décrit est son implication dans la dynamique et la stabilisation des microtubules (MT) facilitant l'assemblage des dimères de tubuline et donc la polymérisation des MT (Drechsel *et al.*, 1992).

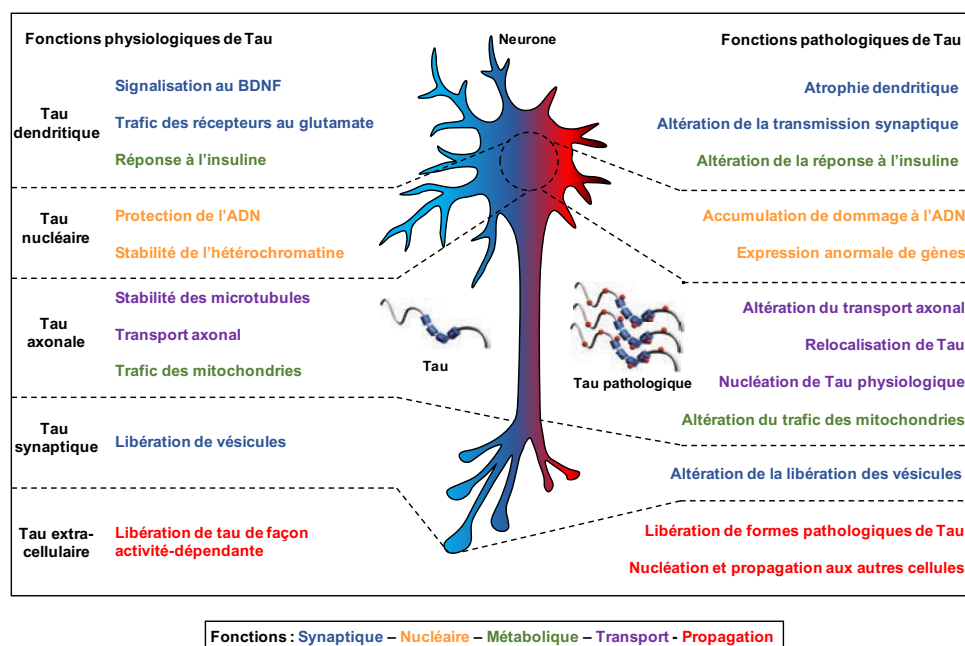


Figure 13 : Différentes fonctions de la protéine Tau dans le neurone. Outre la stabilisation des microtubules, Tau intervient dans les fonctions suivantes : activité synaptique (voie de signalisation, transmission synaptique), stabilité nucléaire, métabolisme (réponse insulinaire et trafic mitochondrial) et fonctions extracellulaires qui restent encore à déterminer. Dans les conditions pathologiques, il existe une altération de ces fonctions qui pourrait expliquer plusieurs des déficits observés dans les Tauopathies humaines et leurs modèles animaux.

La protéine Tau intervient également dans le transport axonal (antérograde et rétrograde) en influençant le fonctionnement des protéines motrices telles que la kinésine et la dynéine. Tau a aussi des fonctions nucléaires : protection contre les dommages à l'ADN et stabilité de l'hétérochromatine ; des fonctions synaptiques : voies de signalisation, LTP, transmission synaptique ; des fonctions métaboliques : réponse à l'insuline et métabolisme mitochondriale ; et également des fonctions extracellulaires qui restent à élucider (Guo, Noble and Hanger, 2017a). Les diverses fonctions de Tau sont présentées de manière plus approfondie dans la revue en préparation que nous avons rédigée avec les étudiants de l'équipe (Annexe 1 Albert *et al.*).

3.2.2. Modifications post-traductionnelles de Tau

La régulation de la protéine Tau dans ces diverses fonctions cellulaires se fait via de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT) telles que la phosphorylation, l'acétylation, la troncation, la glycosylation ou l'ubiquitinylation, par exemple. La dérégulation des MPT de Tau est d'ailleurs associée avec son agrégation et son devenir pathologique (Chong *et al.*, 2018).

3.2.3. La phosphorylation de Tau

Parmi ces MPT, c'est la phosphorylation sur laquelle les scientifiques se sont le plus penchée, régulant finement les fonctions de Tau dont sa liaison aux MT et qui est dérégulée dans la MA (Ihara *et al.*, 1986). En effet, la phosphorylation de Tau est augmentée à huit phosphates par molécule dans la MA (Evelyn Köpke *et al.*, 1993). Tau possède environ 85 sites de phosphorylation potentiels dans sa forme la plus longue (2N4R) (Tableau web de Diane Hanger). La majorité de ces sites sont situés de part et d'autres des régions de liaisons aux MT (Sergeant, Bretteville, Hamdane, Grognet, *et al.*, 2008; Wang and Mandelkow, 2016). Parmi ces 85 sites, 17 motifs thréonine-proline ou sérine-proline sont anormalement phosphorylés dans la MA et d'autres tauopathies. Tau peut également être phosphorylée sur des résidus tyrosines. Bien que plusieurs mécanismes soient proposés pour expliquer la pathogénicité de l'hyperphosphorylation de Tau : mauvaise répartition des axones aux compartiments somatodendritiques altérant les fonctions synaptiques, altération de sa dégradation ou favorisation de l'agrégation, ils restent encore sujets à débat à ce jour.

3.2.4. Les mutations du gène *MAPT* et maladies associées

Bien qu'il soit admis d'une part que les mutations de *MAPT* ne conduisent pas à la MA, une étude a suggéré en 2012 qu'un variant du gène *MAPT* pourrait être associé à des cas diagnostiqués de MA (Cruchaga *et al.*, 2012). D'autre part, une récente étude pangénomique a montré une association entre le chromosome 17 et le risque de MA (Jun *et al.*, 2016). En revanche, plus d'une centaine de mutations sur ce gène ont été identifiées dont les formes pathogéniques conduisent à des démences fronto-temporales (FTD) ou d'autres tauopathies telles que la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la dégénérescence corticobasale et la maladie de Pick (uantwerpen.vib.be/ADMutations/; alzforum.org/mutations) (Wang and Mandelkow, 2016). Les tauopathies, familiales ou sporadiques, sont caractérisées par des agrégats de protéines Tau dans les cellules du système nerveux. Dans la MA, Tau peut exister sous forme monomérique, de petits oligomères, en PHF ou en filaments droits (Congdon and Sigurdsson, 2018). Bien que l'agrégation de Tau soit caractéristique de certaines

maladies neurodégénératives, les PHF-tau sont également retrouvés dans le cerveau de personnes âgées saines non démentes (Schöll *et al.*, 2016).

3.3. La pathologie Tau

La contribution pathologique de Tau est causée principalement par son agrégation. L'identification de mutations semble expliquer le développement de formes familiales de tauopathies. Cependant, les raisons de l'agrégation de Tau dans les cas sporadiques dont la MA, ne sont pas encore bien comprises. En effet, le détachement de Tau aux MT, les changements de conformation et les MPT modifient les fonctions physiologiques de Tau et jouent un rôle dans son agrégation, contribuant potentiellement à l'altération des fonctions neuronales et la progression de la pathologie. L'hyperphosphorylation de Tau est d'ailleurs un des événements les plus précoces dans le développement de la MA (Guo, Noble and Hanger, 2017a; Congdon and Sigurdsson, 2018).

3.3.1. Développement des DNF dans la MA

Au cours de la MA, la distribution des DNF dans le cerveau suit une séquence temporelle hiérarchisée qui fut établie au début des années 1990 et révisée en 2006, partant de la région transentorhinale (locus coeruleus et noyaux magnocellulaires) pour s'étendre progressivement à la région entorhinale puis au néocortex (Braak and Braak, 1991; Braak *et al.*, 2006). Il s'agit des stades de Braak : 6 stades de dégénérescence progressive (Figure 14). D'autres auteurs ont également réalisé l'analyse biochimique des protéines Tau liées aux PHF et défini des stades plus précis correspondant aux 10 régions corticales du cerveau successivement atteintes (Delacourte *et al.*, 1999). Ces études ont également permis d'établir que les anomalies biochimiques précèdent les lésions neuropathologiques.

La sévérité de la démence Alzheimer est d'ailleurs reliée au nombre de DNF présentes dans le néocortex. En effet, les DNF contribuent d'une part aux altérations précoces de la mémoire puisqu'elles commencent par s'accumuler préférentiellement dans le cortex transentorhinal et entorhinal détériorant les voies afférentes et efférentes, isolant l'hippocampe avant de l'atteindre (Arriagada *et al.*, 1992). D'autre part, de nombreux travaux ont démontré une corrélation entre la perte neuronale et la progression spatio-temporelle des DNF dans la MA contrairement aux dépôts amyloïdes (Gómez-Isla *et al.*, 1997; Thal *et al.*, 1998).

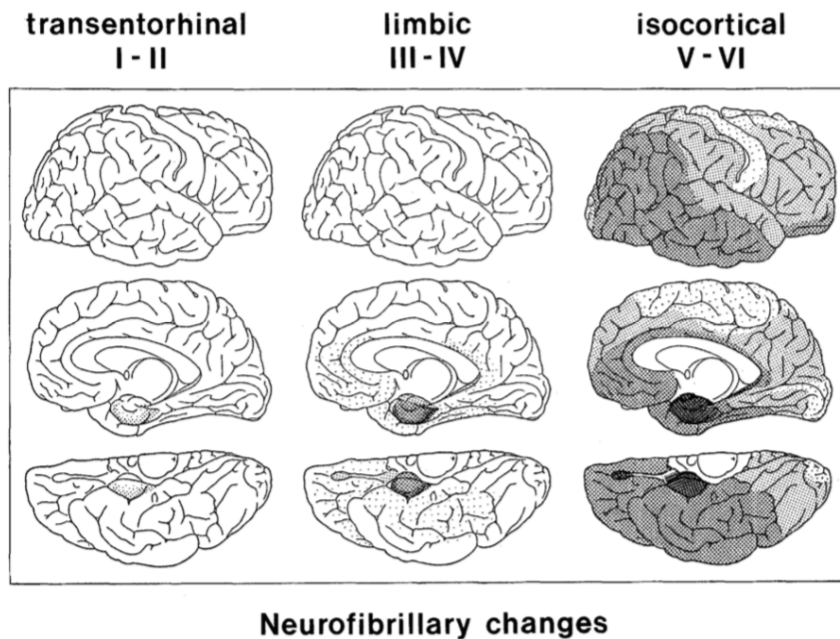


Figure 14 : Evolution de la distribution des dégénérescences neurofibrillaires au cours de la maladie d'Alzheimer. Six stades (I à VI) peuvent être distingués. Les stades I-II montrent des altérations confinées pratiquement à une seule couche de la région transentorhinale (stades entorhinaux) puis atteignent le cortex entorhinal. Les stades III-IV sont caractérisés par l'atteinte sévère dans le cortex transentorhinal et entorhinal ainsi que de l'hippocampe (stades hippocampiques ou limbiques). Les stades V-VI sont marqués par une destruction isocorticale (stades corticaux). L'augmentation de la densité de l'ombrage indique une augmentation de la gravité des DNF. Issue de (Braak and Braak, 1991)

4. Relation entre les pathologies tau et amyloïde

Les deux caractéristiques de la MA étant les pathologies amyloïdes et tau, il apparaît intéressant d'étudier la relation reliant ces deux composantes et leur développement dans la MA.

4.1.1. Paradoxe anatomique

Pour commencer, il est intéressant de questionner le développement respectif de la pathologie tau et de la pathologie amyloïde dans la MA. En effet, il n'existe pas de corrélation temporelle et anatomique entre le développement des dépôts amyloïdes et des DNF dans le cerveau de patient Alzheimer (Price *et al.*, 1991). Comme décrit précédemment, c'est la pathologie tau qui corrèle le plus avec la perte neuronale, temporellement et spatialement, la sévérité et la durée de la démence plutôt que la pathologie amyloïde (Serrano-Pozo *et al.*, 2011). Cependant, les données génétiques (formes

généétiques de la MA initiées par une altération du métabolisme de l'APP et des peptides A β) ont montré qu'il était possible pour les peptides A β d'induire la pathologie tau et la perte neuronale sans colocalisation intrinsèque mise en évidence entre les plaques et la dégénérescence (Musiek and Holtzman, 2015).

Dans les formes sporadiques de la MA, la relation hiérarchique entre A β et Tau est plutôt complexe mais des études ont montré que la pathologie tau se propageait dans les régions néocorticales presque uniquement chez les individus présentant une pathologie amyloïde. Ces personnes finissaient généralement par développer une démence de type Alzheimer (Price and Morris, 1999; Knopman *et al.*, 2003). Plusieurs études ont montré que la pathologie tau corticale était souvent concomitante aux dépôts amyloïdes. Elle ne semble pas se développer dans ces régions sans la présence de plaques amyloïdes suggérant que l'agrégation de peptides A β est nécessaire pour le développement important de DNF au niveau cortical (Musiek and Holtzman, 2015). Cependant, c'est bien la pathologie tau qui apparaît avant la pathologie amyloïde (Braak and Del Tredici, 2011).

Cette discordance anatomique entre les dépôts amyloïdes, les DNF et la perte neuronale n'est pas encore élucidée mais semble être consistante entre les formes familiales et sporadiques de la MA et suggère finalement une interconnexion entre A β et Tau.

4.2. Existe-t-il un lien entre APP/A β et Tau ?

C'est en 2001 que deux études ont mis en évidence pour la première fois l'influence des peptides A β et/ou de l'APP sur la formation des DNF dans des modèles murins. Dans la première, il fut démontré que la double mutation APP_{swe}/Tau_{P301L} chez les souris transgéniques croisées entraînait une accumulation de plaques amyloïdes de la même façon que la souche parentale APP_{swe} mais surtout une formation de DNF beaucoup plus rapide comparée à la souche parentale Tau_{P301L} (Lewis *et al.*, 2001). Dans la seconde, l'injection de fibrilles de peptides A β ₄₂ dans le cerveau de souris transgéniques portant la mutation Tau_{P301L} a entraîné une augmentation 5 fois plus importante du nombre de DNF dans les neurones (Götz *et al.*, 2001). Ces deux études ont permis d'établir qu'il y avait bien une relation entre APP/A β et la protéine Tau mais également que les peptides A β influençaient positivement la formation de DNF dans ces modèles murins. Depuis, grâce au développement de modèles murins modélisant les pathologies amyloïde et/ou tau, d'autres résultats ont pu conforter le fait que les peptides A β favorisaient le développement de la pathologie tau (Terwel *et al.*, 2008; Bloom, 2014; Pooler *et al.*, 2015).

4.3. Potentialisation biologique

4.3.1. Composante génétique de l'APP sur Tau

La potentialisation biologique entre A β et Tau avait été déjà remarquée dans le cas de MA héréditaire. En effet, les études génétiques et de biomarqueurs avaient permis d'établir que les mutations dans les gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2* entraînaient des dépôts amyloïdes précoces (EOAD) suivis par l'apparition de DNF, démontrant que la pathologie amyloïde précédait la pathologie tau (Selkoe and Hardy, 2016). Récemment, grâce à la mise au point de cellules souches neuronales humaines, des études ont pu démontrer l'impact des formes mutantes de l'*APP* ou de *PSEN1* sur la pathologie tau (Choi *et al.*, 2014; Muratore *et al.*, 2014; Moore *et al.*, 2015). En effet, des mutations de l'*APP* associées ou non à des mutations de *PSEN1* dans ces modèles ont montré une augmentation de l'expression des protéines tau phosphorylées et tau totales.

4.3.2. Composante génétique de Tau sur le métabolisme de l'APP

L'influence réciproque de Tau sur le métabolisme de l'APP a également été rapportée dans la littérature. En effet, certaines mutations de *MAPT* peuvent entraîner des caractéristiques cliniques et pathologiques de la MA avec la présence de dépôts amyloïdes chez l'humain (Momeni *et al.*, 2009) ou non (Le Guennec *et al.*, 2017). De plus, certaines mutations ou des variants génétiques à risque du gène *MAPT* sont aussi fréquemment retrouvés dans des cas cliniques de MA que des mutations de l'*APP*, *PSEN1* ou *PSEN2* (Jin *et al.*, 2012). Enfin, il existe plusieurs études attribuant à des mutations de *MAPT* un rôle de facteur de risque de MA (Coppola *et al.*, 2012; Cruchaga *et al.*, 2012; Jun *et al.*, 2016).

Il apparaît clairement établi dans la littérature un lien réciproque entre le métabolisme de l'APP et Tau. Bien que ceux-ci puissent s'influencer mutuellement, les mécanismes et voies exacts restent encore indéterminés. Néanmoins, certaines études commencent à apporter des éléments de réponse aux mécanismes d'influence respective entre A β et Tau.

4.3.3. « Mécanismes » d'influence de Tau sur les peptides A β

Ce sont les études en culture primaire de neurones confirmées par des études *in vivo* qui ont permis d'apporter des éléments supplémentaires à la connexion A β -Tau. Des expériences en culture primaire ont démontré que la protéine Tau était essentielle à la cytotoxicité des peptides A β (Mairet-

Coello *et al.*, 2013). En effet, des neurones murins n'exprimant pas la protéine tau (*Knock-Out*) et traités avec des fibrilles de peptides A β ne développent pas de DNF suggérant une dépendance de la toxicité des peptides A β à la protéine tau (M. Rapoport *et al.*, 2002). Ces résultats ont été ensuite confirmés *in vivo* dans des modèles murins transgéniques APP et déficients pour la protéine tau (Roberson *et al.*, 2007; Ittner *et al.*, 2010b). Il semblerait que ce soit par sa fonction axonale au niveau des synapses que Tau favoriserait l'exotoxicité des peptides A β . Par exemple, Tau intervient dans l'adressage de la kinase Fyn qui stabilise des récepteurs synaptiques nécessaires à la toxicité des peptides A β .

Les peptides A β peuvent aussi causer un désassemblage des microtubules (MT) dépendant de Tau ainsi qu'une inhibition du transport mitochondrial le long des MT, une altération de la LTP, une coupure des MT dendritiques et un retour ectopique des neurones représentant une menace certaine pour les fonctions synaptiques (Bloom, 2014). Néanmoins, tous les effets néfastes des peptides A β ne dépendent pas de Tau. Leurs effets sur le cytosquelette et la viabilité neuronale démontrent comment A β et Tau agissent de manière interdépendante pour altérer les neurones et les synapses conduisant aux lésions pathologiques puis cliniques de la MA.

4.3.4. « Mécanismes » d'influence des peptides A β sur la pathologie tau

De façon réciproque, la pathologie amyloïde peut avoir un impact sur la pathologie tau comme nous l'avons décrit précédemment. Bien que les mécanismes ne soient pas bien élucidés, il a été montré récemment que les plaques amyloïdes permettaient la création d'un « environnement » propice à l'agrégation de tau *in vivo*. Cela suggérait que les peptides A β favoriseraient le développement de la pathologie tau par une mécanisme multi-systèmes (He *et al.*, 2018). En effet, les peptides A β provoqueraient, aux stades précoces de la maladie, une accumulation de Tau endogène dans les axones dystrophiques entourant les plaques amyloïdes pour créer un environnement unique facilitant le recrutement rapide de Tau dans les fibrilles par petites quantités de Tau pathologique. Ces agrégats de Tau deviendraient par la suite une source pour la formation de DNF à des stades plus avancés. Les plaques amyloïdes pourraient également améliorer et maintenir la pathologie Tau par des mécanismes supplémentaires, tels que l'altération des processus de dégradation intracellulaire. D'autre part, une étude a montré que des agrégats de peptides A β sont également capables d'induire l'association de Tau en fibrilles en lui servant de «matrice modèle», suggérant l'existence d'un « cross-seeding » entre A β et Tau (Vasconcelos *et al.*, 2016).

4.3.5. Synergie entre A β et Tau

Désormais, face aux « Baptistes » et aux « Tauistes », c'est plutôt l'idée d'une synergie entre A β et Tau qui semble émerger (Delacourte *et al.*, 2002; Duyckaerts, 2011). En effet, A β et Tau ciblent tous deux des composants appartenant au même système et ils amplifieraient ainsi les effets toxiques de l'autre (Ittner and Götz, 2011; Chabrier *et al.*, 2014). Récemment, une étude de cohorte a d'ailleurs montré un effet synergique entre les dépôts amyloïdes et les agrégats de protéines Tau hyperphosphorylées sur le déclin métabolique dans les régions limbiques (réseau cérébrale affecté précocement par les deux lésions de la MA) (Pascoal *et al.*, 2017).

De plus, l'APP, ses métabolites et Tau partagent des voies communes de dégradation avec lesquelles ils sont interconnectés. En effet, le protéasome et la voie autophagie-lysosomes sont décrits pour intervenir dans la dégradation de l'APP et ses métabolites (voir Chapitre 1. IV.) et aussi de la protéine Tau (Chesser, Pritchard and Johnson, 2013; Ciechanover and Kwon, 2015; Correia *et al.*, 2015). Ces mécanismes sont retrouvés dérégulés dans la MA et associés à l'accumulation de protéines mal conformées et/ou neurotoxiques dont les peptides A β et Tau (Pickford *et al.*, 2008; Khurana *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2018). De même, les peptides A β et Tau peuvent contribuer à l'altération de ces systèmes (Cecarini *et al.*, 2012; Abisambra *et al.*, 2013) Ainsi, en interférant avec les processus de dégradation, les peptides A β et Tau pourraient contribuer à la pathologie de l'autre et agir ensemble sur la dérégulation de l'homéostasie cellulaire (Tseng *et al.*, 2008; Piedrahita *et al.*, 2016; Farizatto *et al.*, 2017).

Ainsi, le métabolisme de l'APP et la protéine Tau sont tous les deux au cœur des mécanismes pathologiques de la MA, même si l'hypothèse de la cascade amyloïde ne voudrait retenir que les peptides A β comme initiateurs de la MA. L'altération de la fonctionnalité de ces deux éléments protéiques conduit à un dysfonctionnement neuronal et synaptique caractéristique de la MA. C'est pourquoi, aujourd'hui, les recherches scientifiques s'intéressent à ces deux aspects amyloïde et tau et développent des traitements thérapeutiques qui visent à réduire leurs agrégations pour prévenir de la MA et les autres altérations qui en résultent.

V. Stratégies thérapeutiques

A l'heure actuelle, il n'existe encore aucun traitement permettant de guérir la MA. Ainsi, la recherche d'un traitement efficace pour lutter contre cette maladie est d'une grande importance pour améliorer les conditions de vie des patients. Sur le marché, seuls 4 médicaments sont disponibles à la prescription dans le cadre de la MA et sont des traitements symptomatiques. Cependant, depuis mai 2018, la ministre française de la santé a annoncé un déremboursement des médicaments « anti-Alzheimer » dû à leur efficacité médicamenteuse modeste. Bien qu'aucun nouveau traitement novateur n'ait encore été validé en phase III d'essais cliniques, il existe de nombreux candidats médicaments prometteurs en cours de développement clinique (Nygaard, 2013).

1. Les traitements actuels

Actuellement, il n'y a que 4 médicaments commercialisés en France et indiqués dans le traitement symptomatique de la MA. Il s'agit soit des anticholinestérases : le Donépézil, la Rivastigmine et la Galantamine ou alors de l'antagoniste du récepteur NMDA : la Mémantine.

1.1. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Dans la MA, nous avons vu qu'il y avait une dégradation des fonctions synaptiques et des neurones, ces dernières conduisant à une altération de la neurotransmission. Le système cholinergique a été le premier associé à l'apparition des symptômes cliniques de la MA (Davies, 1976; Coyle, Price and DeLong, 1983). En effet, il y a une réduction de production d'acétylcholine et de l'activité choline acétyltransférase (enzyme principale de la synthèse de l'acétylcholine) chez les patients Alzheimer puisque les neurones cholinergiques dégénèrent avec la progression de la maladie (Davis, 1999). Etant donné l'implication de l'acétylcholine dans le maintien de la mémoire, des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (IACHÉ), enzyme de dégradation de ce neurotransmetteur, ont été développés afin d'améliorer la disponibilité en acétylcholine pour les neurones et de contrebalancer ces déficits.

1.1.1. La Tacrine

En France, le premier médicament approuvé pour le traitement contre la MA fut un IACHÉ en 1994. Il s'agit de la Tacrine, un inhibiteur compétitif et réversible de l'ACHÉ et de la

butylcholinestérase, enzyme hydrolysant l'acétylcholine. La Tacrine permet d'augmenter l'acétylcholine libre pouvant stimuler les récepteurs muscariniques et améliorer la cognition et les performances de mémoire (Crismon, 1994). Cependant, après 10 années de prescription, ce composé fut retiré du marché par cause d'hépatotoxicité (Pohanka, 2012).

1.1.2. Nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

A la suite de la Tacrine, une nouvelle génération d'IChE, plus maniable et moins toxique, a fait son apparition. Aujourd'hui, le Donépézil (inhibiteur spécifique et réversible, approuvé en 1996), la Rivastigmine (inhibiteur de l'AChE et de la butylcholinestérase, 1998) et la Galantamine (inhibiteur réversible, compétitif et sélectif, 2001) sont les trois IChE disponibles pouvant être prescrits dans le cas de MA (Bachurin, Bovina and Ustyugov, 2017). Ils sont bien mieux tolérés que la Tacrine et démontrent une efficacité aux stades précoces et modérés de la MA. Ces traitements ne ralentissent pas la progression de la démence, bien qu'ils puissent en faire varier l'aggravation selon les patients. Cependant, ils permettent de réduire temporairement et de manière significative la perte des fonctions cognitives durant quelques mois, quelques années (Nygaard, 2013; Hung and Fu, 2017).

1.2. L'antagoniste du récepteur NMDA : la Mémantine

L'acétylcholine n'est pas l'unique neurotransmetteur impliqué dans les fonctions cognitives. En effet, le glutamate et la voie glutamatergique agissent sur des récepteurs ionotropiques et métabotropiques dont le récepteur au N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA). Ce dernier est impliqué dans la plasticité synaptique, la LTP et ainsi que les processus de mémoire et d'apprentissage (Danysz and Parsons, 2003). Dans la MA, une activation excessive des récepteurs NMDA est retrouvée et elle est associée à un dysfonctionnement neuronale conduisant ultérieurement à la mort cellulaire. Ce phénomène est dénommé « excitotoxicité ».

Ainsi, des études précliniques de blocage pharmacologique de ces récepteurs ont démontré une réduction de la toxicité induite par les peptides A β et ont contribué au développement d'agents thérapeutiques anti-Alzheimer (Nygaard, 2013). De cela est née la Mémantine (2003), un antagoniste non-compétitif de faible affinité des récepteurs NDMA qui se fixe au sein de ces canaux ioniques pour les bloquer (Bachurin, Bovina and Ustyugov, 2017). Il s'agit du seul antagoniste des récepteurs NMDA utilisé en clinique contre la MA pour laquelle il est indiqué dans les formes modérées à sévères. Bien qu'elle n'empêche pas la perte neuronale, l'aggravation de la démence ou la progression de la MA, la

Mémantine protège ainsi de l'excitotoxicité du glutamate permettant d'améliorer temporairement les fonctions cognitives de la même façon que les IChE.

Les IChE et l'antagoniste du récepteur NMDA sont ainsi les seuls médicaments disponibles à ce jour pour traiter la MA. Certes, leur efficacité est modeste mais elle est réelle et statistiquement significative. Ils contribuent, par conséquent, à la prise en charge biologique mais aussi psychologique et sociale des personnes atteintes de la MA et de leur entourage. Malgré leurs bénéfices, de nouveaux traitements sont nécessaires pour prévenir, retarder et/ou traiter les symptômes de la MA.

2. Les nouvelles stratégies thérapeutiques

Depuis ces dernières années, les progrès dans la compréhension des mécanismes biologiques de la MA ont ainsi permis de réorienter les stratégies thérapeutiques pour se concentrer sur les mécanismes de formation des lésions et sur les moyens de les combattre. Désormais, les recherches se focalisent principalement sur des composés visant à bloquer la progression de la pathologie amyloïde et/ou de la pathologie tau.

2.1. Principales approches anti-amyloïdes

Actuellement, l'une des grandes théories pouvant expliquer le développement de la MA est celle de la cascade amyloïde selon laquelle la dérégulation du métabolisme de l'APP et des peptides A β sont à l'origine de la MA. A partir de ce postulat, des thérapies réduisant la charge amyloïde cérébrale parviendraient à atténuer les changements neuropathologiques et les déficits fonctionnels caractéristiques de la MA (Hampel *et al.*, 2015). Les principales approches anti-amyloïdes actuellement développées visent à diminuer les peptides A β et/ou à empêcher son agrégation par différents moyens : immunisation active ou passive, inhibition ou modulation des activités β - ou γ -sécrétases.

2.1.1. Immunothérapies anti-A β

La clairance des peptides A β par immunothérapie active ou passive, utilisant des anticorps anti-A β est l'approche anti-amyloïde la plus étudiée et la plus largement validée par les études précliniques. Cette stratégie thérapeutique repose sur l'utilisation de peptides A β ou d'analogues (immunisation

active) ; ou sur l'injection d'anticorps anti-A β humanisés ou d'immunoglobulines par intraveineuse (immunisation passive) afin d'entraîner une réponse immunitaire (Hampel *et al.*, 2015). Plusieurs études, principalement d'immunothérapie passive, ont conduit des composés en phase III d'essais cliniques dont le Solanezumab, le Bapineuzumab et le Crenezumab. Alors que le Bapineuzumab échoua par manque d'efficacité et de preuves bénéfiques chez les patients présentant des formes de MA moyennes à modérés, les autres sont encore en cours de test à l'heure actuelle (Bachurin, Bovina and Ustyugov, 2017; Hung and Fu, 2017). D'autres essais cliniques basés sur l'immunothérapie active : vaccin AN1792 ou CAD106, chez l'Homme ont pu démontrer des effets bénéfiques dans les phases I ou II mais des études à plus grandes échelles sont nécessaires pour valider l'efficacité de tels traitements (Nygaard, 2013). A ce jour, aucune immunothérapie basée sur les anticorps anti-A β n'a malheureusement pas encore réussi à atteindre le stade de la prescription. L'échec clinique de ces méthodes ne signifie pas que la stratégie n'est pas la bonne mais plutôt que le ciblage de l'A β seul n'est peut-être pas suffisant ou que le traitement n'est pas commencé suffisamment tôt dans la progression de la maladie. En effet, la MA se développe sur plusieurs années et il est possible qu'à des stades symptomatiques, les traitements anti-amyloïdes ne soient plus efficaces.

En outre, des études préventives sont aussi développées. Le Solanezumab devrait ainsi être testé dans une population préclinique Alzheimer identifiée grâce aux biomarqueurs. Actuellement, 6 immunothérapies ciblant l'A β sont en phase III d'essais cliniques sur lesquelles des nombreux espoirs sont fondés (Cummings *et al.*, 2018).

2.1.2. Modulateurs de l'activité des sécrétases

D'autre part, les nouvelles stratégies visent aussi les sécrétases du métabolisme de l'APP pour agir en amont et prévenir la production des peptides A β , de leur agrégation et ainsi, des dépôts amyloïdes. Plusieurs inhibiteurs ou modulateurs de l'activité γ -sécrétase ont été développés mais ont échoué pour cause d'effets secondaires indésirables, tels que le Semagacestat ou l'Avagacestat. En effet, la γ -sécrétase possède plus de 90 substrats et son inhibition/modulation altère ainsi d'autres voies métaboliques (Carroll and Li, 2016). Etant donné ces résultats, cibler la γ -sécrétase ne semble pas être une stratégie thérapeutique viable à long terme (Nygaard, 2013). Les recherches se sont aussi focalisées sur le développement d'inhibiteurs de BACE1 avec l'espoir d'effets indésirables moindre. Bien que le composé LY2886721 fut arrêté en phase II d'essais cliniques pour cause de fonctions hépatiques anormales, d'autres molécules avancent dans le développement clinique tout en démontrant une

réduction de la production de peptides A β . A ce jour, 5 composés ciblant la β -sécrétase sont en phase III d'essais cliniques (Cummings *et al.*, 2018).

2.2. Principales approches anti-Tau

En plus des plaques amyloïdes, la MA est également caractérisée par l'agrégation de la protéine Tau hyperphosphorylée et des DNF. La pathologie tau a ainsi émergé comme un élément clé de la MA au même titre que la pathologie amyloïde et non plus comme un simple produit de la dégénérescence causée par le peptide A β . Elle reçoit aujourd'hui plus d'attention dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques contre la MA puisque la pathologie tau corrèle mieux avec le degré de démence (Hampel *et al.*, 2015; Chong *et al.*, 2018). Les stratégies visant la protéine Tau consistent à prévenir ou réduire sa phosphorylation anormale, son oligomérisation et/ou son agrégation.

2.2.1. Modulation de la phosphorylation

Les premiers travaux thérapeutiques se sont orientés sur le ciblage de kinases (inhibiteurs) ou phosphatases (activateurs) régulant l'état de phosphorylation de Tau. Parmi eux, ce sont des inhibiteurs de la sérine-thréonine kinase glycogène synthase-3 β (GSK-3 β) qui ont été les plus étudiés, notamment parce que cette enzyme est impliquée dans la production de peptides A β (Eldar-Finkelman and Martinez, 2011). Cependant, la plupart des inhibiteurs de la GSK-3 β n'ont pas encore montré de réussite en essais cliniques, en raison d'un manque d'améliorations cliniques ou d'effets thérapeutiques. D'autres inhibiteurs de kinase sont également en cours de développement clinique (Lovestone *et al.*, 2015; Pandey and DeGrado, 2016).

2.2.2. Anti-agrégation

En outre le ciblage de la phosphorylation, l'inhibition de l'agrégation de Tau est également une stratégie développée en recherche thérapeutique. Les inhibiteurs de l'agrégation de Tau ont démontré leur efficacité dans des modèles cellulaires et de souris transgéniques telles que le méthylthioninium (bleu de méthylène) ou les dérivés d'antraquinones (Wischik *et al.*, 1996; Pickhardt *et al.*, 2007; Melis *et al.*, 2015). Seul le bleu de méthylène, un antiagrégant, a été testé chez l'homme et a atteint les essais cliniques de phase II au cours desquels il a montré un effet thérapeutique positif (Wischik *et al.*, 2015). Cependant, un retour récent d'un essai de phase III sur le leuco-méthylthioninium-bis-

(hydrométhanesulfonate) ne rapporte pas d'effet bénéfique sur la progression de la maladie chez les patients atteints de MA légère à modérée (Gauthier *et al.*, 2016).

2.2.3. Immunisation anti-Tau

Plus récemment, de nouvelles alternatives ont vu le jour comme l'immunisation utilisant des polypeptides ou anticorps dirigés contre Tau. Initialement, l'immunothérapie pour le traitement de la MA a été testée pour cibler principalement les peptides A β , comme mentionnée ci-dessus, et cette technique s'est montrée être également efficace sur la clairance des agrégats de Tau (Oddo *et al.*, 2004; Congdon and Sigurdsson, 2018). Les premières techniques d'immunisation ciblées contre Tau ont commencé à être testées sur des modèles murins, il y a environ 10 ans et ont démontré leur efficacité sur la clairance des agrégats et les déficits cognitifs (Ayodeji A Asuni *et al.*, 2007). Aujourd'hui, il s'agit du domaine de recherche le plus actif concernant Tau et 9 agents d'immunothérapie sont en phase d'essais clinique I ou II dont le RG-7345, le AADvac-1 et le ACI-35 (Hung and Fu, 2017; Cummings *et al.*, 2018).

3. L'état de la recherche anti-Alzheimer en 2018

Aujourd'hui, les nouvelles thérapies anti-Alzheimer sont représentées par des agents modulateurs de la MA ou des agents multi-cibles (Figure 15). Nous avons présenté ici les principales approches visant soit la pathologie amyloïde ou la pathologie tau mais il existe également des traitements ciblant ces deux pathologies conjointement, la cognition ou les symptômes neuropsychiatriques. En effet, il est possible d'agir sur d'autres neurotransmetteurs pour réguler la plasticité neuronale et la transduction du signal, sur l'inflammation ou sur d'autres processus caractéristiques de la MA (Bachurin, Bovina and Ustyugov, 2017). Beaucoup de ces composés sont encore dans les stades précoces d'essais cliniques ou en préclinique.

A noter que la recherche et le développement de nouveaux traitements sont des processus très longs, entre 10-15 ans, très coûteux et surtout très risqués. Ces dernières années de nombreux candidats médicaments ont réussi à passer la phase II d'essais cliniques mais ont échoué en phase III. 14 années se sont écoulées depuis la commercialisation du dernier traitement proposé pour la MA. Cependant, la recherche de nouveaux composés prometteurs est toujours en cours puisqu'il y a 114 agents en projet d'études cliniques actives à ce jour (clinicaltrials.gov). La prochaine décennie apparaît comme une période critique dans la recherche d'un traitement efficace contre la MA avec l'espoir qu'au moins un de ces nombreux composés en développement clinique réussisse.

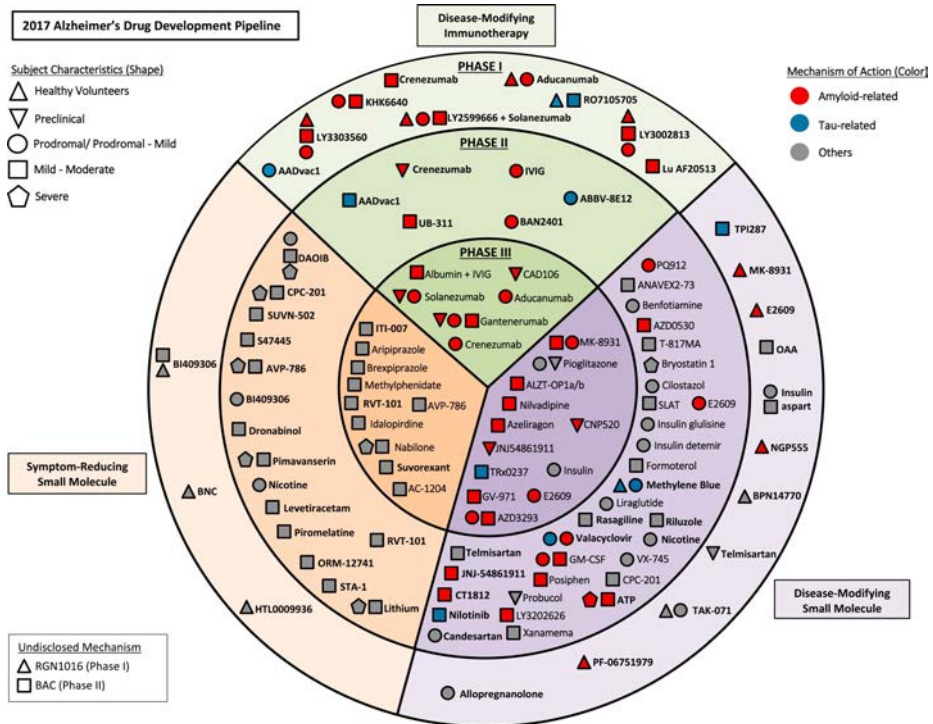


Figure 15 : Candidats médicaments en essais cliniques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer en 2018. Issue de (Cummings *et al.*, 2018)

Chapitre 3 : Des nouveaux composés anti-Alzheimer

A l'issue d'une collaboration initiée entre le Pr. Patricia Melnyk et le Dr. Nicolas Sergeant de l'équipe Inserm du Dr. Luc Buée, plusieurs composés furent développés dans le cadre d'un projet à visée thérapeutique ciblant la MA. En effet, le manque de traitements disponibles, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, justifie et encourage fortement la recherche et le développement de nouvelles thérapies.

I. Que sont ces nouveaux composés ?

Ces composés dénommés MSBD, pour *Melnyk Sergeant Buée Delacourte* en référence à leurs inventeurs, ont été brevetés en 2006 en tant qu'invention de « l'utilisation de dérivés de la 1,4-bis (3-aminoalkyl) pipérazine de formule (I) et (II) pour la fabrication de préparations pharmaceutiques devant servir au traitement de maladies neurodégénératives et de maladies associées, de troubles du développement et du cancer » (brevet de publication internationale numéro WO 2006/051489 A1). En effet, ils ont démontré des propriétés régulatrices du métabolisme de l'APP, diminuant la production des peptides A β tout en préservant la formation d'autres métabolites du clivage de l'APP et possèdent aussi des propriétés modulatrices de la protéine Tau, réduisant sa phosphorylation et favorisant sa dégradation, *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, les MSBD, ciblant les deux composantes de la MA, représentent une nouvelle source potentielle d'agents thérapeutiques à laquelle nous allons nous intéresser plus particulièrement.

II. Origine des MSBD

1. La chloroquine

Le design des MSBD s'est inspiré de la Chloroquine (CQ), le premier agent synthétique antipaludique développé au début du XX^{ème} siècle (Al-Bari, 2015). Cet agent possède de multiples propriétés thérapeutiques qui peuvent être « résumées » à des effets anti-inflammatoires, anti-infectieux, anti-thrombotiques, immuno-modulateurs et métaboliques (Plantone and Koudriavtseva, 2018). La CQ fut originellement utilisée pour prévenir ou guérir la malaria puis son usage fut

abandonné pour cause de résistance aux agents pathogènes : *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*. Cependant, de nombreux dérivés de la CQ furent développés et sont aujourd'hui utilisés pour le traitement prophylactique de la malaria mais également contre d'autres maladies infectieuses ainsi qu'une grande variété de maladies rhumatiques, dermatologiques, immunologiques et cancéreuses. En effet, les analogues de la CQ possèdent plusieurs mécanismes d'action dont l'effet majeur joue sur l'activité des lysosomes.

1.1. Mode d'action de la chloroquine

Le mode d'action principale de la CQ et de ses dérivés repose sur leurs propriétés acido-basiques. La CQ est une base diprotique faible qui peut exister sous forme protonée ou déprotonée. La CQ déprotonée peut diffuser librement à travers les membranes des organites intracellulaires jusqu'aux lysosomes et autres compartiments acides. Une fois protonée, la CQ se retrouve piégée dans ces compartiments où elle s'accumule, ne pouvant plus diffuser en dehors. Ainsi, la CQ et ses dérivés sont considérés comme des agents lysomotropiques ou alcalinisants. En s'accumulant de façon irréversible dans ces organelles acides, ils induisent une augmentation du pH due à la capture des ions H⁺ (Al-Bari, 2015). Cette interférence avec l'activité lysosomale conduit à son tour une altération de la protéolyse, la chimiotaxie, la phagocytose et la présentation de l'antigène réduisant alors la réponse inflammatoire.

1.2. La chloroquine et métabolisme de l'APP

Parmi toutes ses propriétés variées, la CQ a démontré des effets notables dans le cadre de la MA puisqu'elle agit au niveau des compartiments acides, lieu d'activité de plusieurs sécrétases de la voie amyloïde et de production des peptides Aβ (Tam, Seah and Pasternak, 2014). En effet, la CQ diminue la production de peptides Aβ par son action alcalinisante (Vingtdeux, Hamdane, Bégard, *et al.*, 2007).

Ainsi, à partir de ces données et en s'inspirant de la structure de la CQ, une série de composés possédant un noyau central de type pipérazine N,N'-bisubstituée fut développée et dénommée MSBD (Figure 16) (Melnyk, Vingtdeux, Burlet, Eddarkaoui, M.-E. Grosjean, *et al.*, 2015).

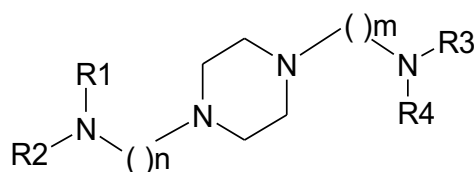


Figure 16 : Structure chimique des MSBD

III. Les MSBD

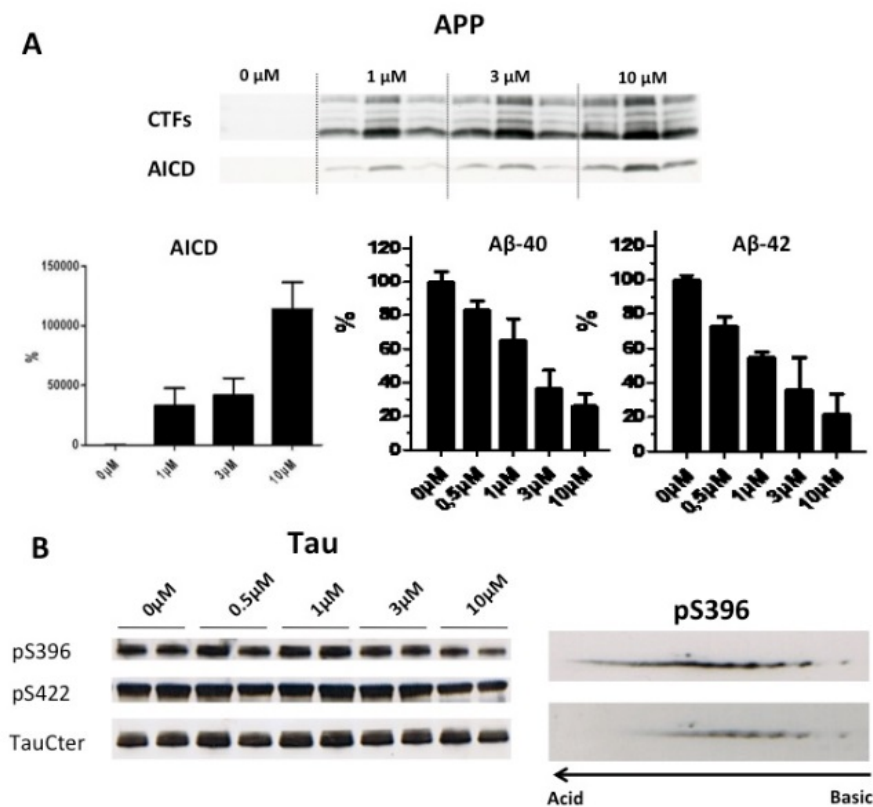
Les MSBD furent développés il y a plus de 10 ans et ils ont donné naissance au laboratoire à de nombreuses familles dérivées. En effet, l'équipe de chimie a cherché à améliorer ces composés tout en conservant leurs activités propres sur les pathologies amyloïde et tau.

1. Activité sur le métabolisme de l'APP et de Tau

1.1. Effets des MSBD *in vitro*

Ces composés sont capables d'agir sur les deux composantes de la MA. D'une part, ils sont capables de réduire la production des peptides A β , principalement les formes toxiques A β ₁₋₄₂ et A β ₁₋₄₀, et de favoriser la sécrétion des fragments sAPP α . D'autre part, ils peuvent aussi diminuer la phosphorylation de Tau et stimuler sa dégradation (Figure 17 + Annexe 2 – Figures 2 et 4).

Figure 17 : Activité des MSBD dans des lignées cellulaires sur-exprimant de manière stable l'APP (SY5Y-APP^{695WT}) ou la protéine Tau (SY5Y-hTau46).



(A) Des cellules SY5Y-APP^{695WT} ont été traitées avec des doses croissantes de MSBD pendant 24 h. Le métabolisme de l'APP a été analysé par immunoempreinte et la sécrétion de peptides A β par technique ELISA. (B) Les cellules SY5Y-hTau46 ont été traitées avec quatre doses de MSBD. La phosphorylation et l'expression de Tau ont été analysées par immunoblot 1D et 2D en utilisant des anticorps phospho-dépendants (pS396 : Tau phospho-sérine 396 ; pS422 : Tau phospho-sérine 422 et des anticorps pan-Tau (Tau-Cter contre la région C-terminale de la protéine Tau). Les MSBD à 10 μ M favorisent la libération d'AICD, réprime les productions A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ et réduit la phosphorylation de Tau.

1.2. Effets des MSBD *in vivo*

En plus des résultats probants dans les lignées cellulaires, des expériences furent également effectuées chez l'animal modélisant la pathologie amyloïde ou la pathologie tau. *In vivo*, dans le modèle transgénique APP/PS1 de formation de plaques amyloïdes, le traitement avec les molécules a montré une amélioration des fonctions cognitives et une diminution des plaques amyloïdes (Annexe 2 - Figure 7). D'autre part, une amélioration de la mémoire spatiale et une diminution de la pathologie Tau furent observées chez les souris transgéniques Thy-Tau22, modèle transgénique de DNF hippocampique (Annexe 2 - Figure 6).

Ainsi, les MSBD font partis des rares agents modulateurs des deux principaux processus pathologiques de la MA. Plusieurs des composés de cette famille ont fait preuve de propriétés pharmacologiques similaires dont l'AZP2006 (composé 29, (Melnik, Vingtdeux, Burlet, Eddarkaoui, M.-E. Grosjean, *et al.*, 2015), qui est actuellement en phase I d'essais cliniques.

2. AZP2006

L'AZP2006 (Figure 18) est un candidat médicament développé pour le traitement de la MA et des tauopathies associées telles que la paralysie supranucléaire progressive. En 2015, il fut administré, dans le cadre de la phase I, par voie orale pendant 10 jours chez le volontaire sain (homme âgé de 18 à 55 ans) chez lequel il fut bien toléré (alzprotect.com). Des études avec une durée d'exposition plus longue (28 jours) sont envisagées chez d'autres volontaires sains (homme et femme de plus de 65 ans).

L'AZP2006 n'est pas considéré comme un traitement symptomatique mais plutôt comme un agent modulateur de la pathologie puisqu'il vise plutôt à ralentir le développement de ces pathologies. Récemment, le statut de l'AZP2006 a été repositionné comme « Médicament Orphelin » pour le traitement de la PSP auprès de l'Agence Européenne du Médicament.

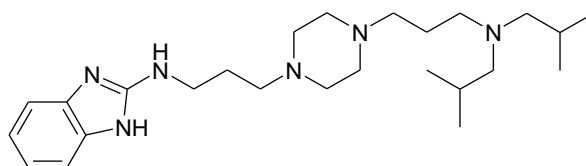


Figure 18 : Structure chimique de l'AZP2006

3. Mode d'action et cible des molécules

3.1. Comparaison avec la chloroquine

Bien qu'elles puissent moduler les métabolismes de l'APP et de Tau, leur mécanisme d'action au niveau cellulaire n'est pas encore déterminé. Ces molécules sont des dérivés de la CQ et malgré des similitudes d'activités entre celles-ci et la CQ, elles possèdent une structure chimique différente ne permettant pas d'analogies mécanistiques directes. D'ailleurs, contrairement à ces molécules, la CQ n'est pas connue pour avoir des effets bénéfiques sur la protéine Tau (phosphorylation et catabolisme), suggérant que l'activité lysomotropique de la CQ ne peut pas expliquer à elle seule l'activité pharmacologique des MSBD. En effet, le traitement *in vivo* de la CQ entraîne une accumulation des formes pathologiques de Tau dans le cerveau ou le muscle (Murakami *et al.*, 1998; Takeuchi and Takeuchi, 2001). Les données issues des résultats *in vivo* n'ont pas rapporté d'accumulation d'agrégats pathologiques mais plutôt une diminution ou un ralentissement de la pathologie Tau et une amélioration des fonctions cognitives.

3.2. Identification de la cible potentielle des molécules

Ainsi, dans l'objectif de comprendre le mécanisme biologique des MSBD, il apparut pertinent d'identifier la cible de ces molécules puisque leur activité est différente de celle de la CQ.

A partir d'une étude de relation structure/activité des sondes MSBD couplées de manière covalente à une résine de sépharose ou à un groupement benzophénone photo-réactif furent développées et associées à des expériences de chromatographies d'affinité ou de photo-couplage ultraviolet, respectivement. Après caractérisation par spectrométrie de masse, les résultats préliminaires ont permis d'identifier la protéine VCP pour *Valosin-Containing Protein* (VCP/p97/Cdc48), à laquelle le chapitre IV de cette thèse sera consacré, comme la cible principale de ces molécules (Figure 19). En effet, VCP fut co-purifiée avec les MSBD, observée par technique d'immunoempreinte (Figure 19-A). De plus, les résultats d'ELISA immuno-enzymatique ont montré une augmentation de l'association des MSBD avec des concentrations croissantes de VCP recombinante ainsi qu'une augmentation de la concentration de MSBD biotinylées (Figure 19-C).

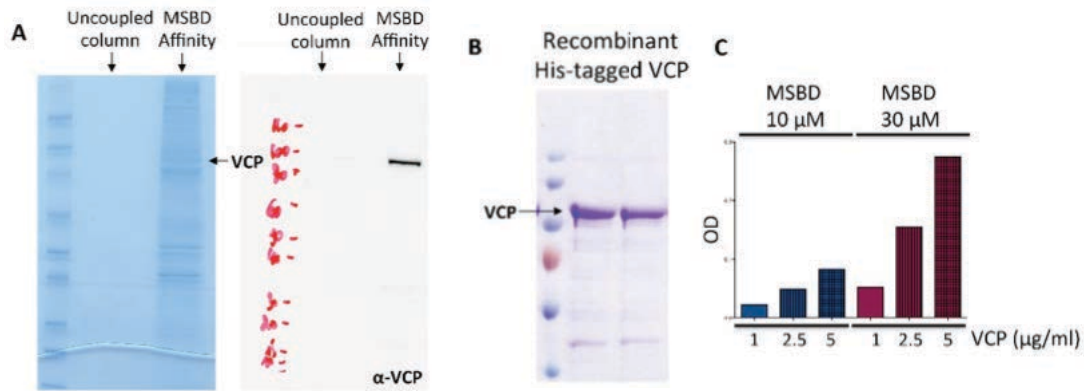


Figure 19 : Les sondes MSBD forment un complexe avec VCP. (A) Le lysat protéiques de cellules SY5Y a été incubé avec une MSBD couplée de manière covalente à une résine de sépharose. La matrice d'affinité a été lavée plusieurs fois et les ligands ont été élués en utilisant une MSBD biotinylée. Après élution, la protéine complexée à la MSBD a été récupérée avec des billes de streptavidine, précipitée et chargée sur SDS-PAGE (ligne MSBD d'affinité). La ligne de la colonne non couplée correspond au même protocole en utilisant une matrice d'agarose non couplée. La bande colorée au bleu de Coomassie a été analysée par spectrométrie de masse MALDI. En parallèle, les protéines éluées ont été chargées sur SDS-PAGE et une analyse western a été réalisée en utilisant un anticorps dirigé spécifiquement contre VCP (α -VCP). Notez que VCP est détectée dans la ligne d'affinité MSBD mais pas dans la colonne de colonne découplée. (B) VCP a été sous-clonée dans un plasmide pET15B et la protéine marquée par un tag Histidine (His-tag) a été exprimée dans des bactéries (*E. coli* BL21) et purifiée avec une colonne HisTrap suivie par une chromatographie d'échange d'anions HiTrap QP (G&E healthcare). La protéine recombinante est chargée (1 μ g) sur SDS-PAGE et colorée au bleu de Coomassie. (C) Des microplaques enrobées de nickel (Thermo-Fischer) ont été ajoutées avec trois concentrations de VCP His-tag (1 ; 2,5 ; 5 μ g/ml) lavées et incubées avec la même molécule de MSBD biotinylée qu'en (A). Les complexes VCP/MSBD ont été révélés avec de la streptavidine-peroxydase et TMB.

3.3. Caractérisation de la cible

Afin de caractériser cette potentielle liaison des MSDB à VCP, la méthode de spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) basée sur le ligand, à savoir, la RMN à différence de transfert de saturation (RMN-STD) fut utilisée. Brièvement, cette technique exploite les différences de paramètres RMN entre le ligand à l'état libre et le ligand lié de manière transitoire à sa cible et l'observation des signaux de résonances du ligand (Viegas *et al.*, 2011). Il est possible de détecter un événement de liaison en comparant le spectre ^1H du ligand en présence ou en l'absence de la protéine. Dans une expérience de RMN STD typique, la liaison du ligand est indiquée par l'apparition de pics dans le spectre de l'échantillon avec la protéine, contrastant avec un manque du signal dans le spectre du contrôle protéine-négatif. D'un point de vue expérimental, les composés MSBD ont été testés en présence de VCP. Des expériences de compétition ont été réalisées en utilisant un analogue de l'ATP

non hydrolysable (substrat de VCP). Les premiers résultats ont montré que l'AZP2006 se liait à VCP (Figure 20, spectre rouge) et que le site de liaison était différent des sites de liaison aux nucléotides de VCP (Figure 20, spectre vert). Cependant, ces résultats doivent encore être validés en utilisant d'autres techniques biophysiques.

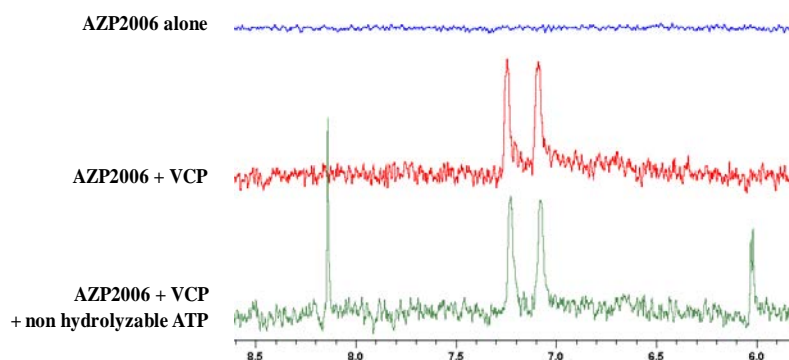


Figure 20 : Mise en évidence de la liaison de l'AZP2006 à VCP par RMN-STD. Spectre bleu : en l'absence de VCP, il n'y a pas de signal de l'AZP2006 seul ; spectre rouge : deux signaux correspondant aux protons aromatiques de l'AZP2006 et apparaissent en présence de VCP caractérisant un événement de liaison entre les deux partenaires ; spectre vert : l'addition d'analogues de l'ATP n'affecte pas les signaux de l'AZP2006.

Les données initiales *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo* présentées ici suggèrent ainsi un nouveau mécanisme d'action original des MSDB en relation avec la protéine VCP, modulant à la fois le métabolisme de l'APP et celui de Tau, *in vitro* et *in vivo*. L'hypothèse de départ, à partir de ces résultats et des données de la littérature, postule que les MSDB réprimeraient la production des peptides A β et promouvraient la dégradation de Tau par un mécanisme dépendant de VCP. Cependant, le mode d'action de ces molécules étant inconnu, il fera l'objet de la seconde partie des résultats de cette thèse.

Chapitre 4 : La protéine VCP

La protéine VCP pour *Valosin-Containing Protein* (VCP/p97/Cdc48), a été identifiée par les résultats préliminaires comme étant la cible de nos molécules d'intérêt. Pour comprendre comment les MSDB pourraient moduler l'activité de VCP pour avoir des effets sur les métabolismes de l'APP et de Tau, il est d'abord nécessaire d'en savoir plus sur la protéine VCP et ses activités au sein de la cellule. Cette protéine intervient d'ailleurs, dans le maintien de l'homéostasie cellulaire ou protéostasie et joue plusieurs rôles essentiels dans la cellule dont la dérégulation conduit à des maladies neurodégénératives et/ou musculaires.

I. La protéine contenant de la Valosine

1. Historique de VCP

C'est en 1990 que VCP fut véritablement mise en évidence chez les mammifères, dans plusieurs cellules et tissus de différentes espèces allant du xénope à l'homme, incluant des cellules hautement spécialisées telles que les érythrocytes humains et les spermatozoïdes bovins (Peters, Walsh and Franke, 1990). Cette étude permit d'identifier et de caractériser la protéine VCP, initialement proposée par Koller et Brownstein quelques années auparavant, comme un produit artéfactuel issu du clivage d'une protéine plus volumineuse contenant de la valosine (un peptide de 25 acides aminés) (Koller and Brownstein, 1987).

2. Nomenclature : VCP, p97, Cdc48 ou autre

VCP fut dénommée p97 pour la masse moléculaire à laquelle le polypeptide fut détecté et identifié par immunoempreinte après fractionnement par gradient de concentration de sucrose d'ovocytes de *Xenopus laevis*. Elle fut également décrite dans d'autres modèles comme la levure, chez laquelle VCP porte le nom de Cdc48 pour *Cell division cycle protein 48* et la drosophile en tant que TER94 pour *Transitional elements of the ER* de poids moléculaire apparent à 94 kDa en SDS-PAGE (Frohl *et al.*, 1991; Pintér *et al.*, 1998). En effet, VCP est une protéine hautement conservée chez les espèces au cours de l'évolution et peut être alors retrouvée sous plusieurs dénomination selon l'espèce (Franz, Ackermann and Hoppe, 2014).

3. Principales Caractéristiques

3.1. Le gène

La protéine VCP est codée par un gène unique, *VCP*, localisé sur le bras court du chromosome 9, chez l'homme, et dont l'expression conduit à la production d'une isoforme de 806 acides aminés (Peters, Walsh and Franke, 1990; Hoyle, Tan and Fisher, 1997). C'est l'assemblage de 6 monomères identiques de p97 qui permet de constituer le complexe protéique fonctionnel.

3.2. La protéine

VCP fait partie de la super famille des AAA-ATPases, les ATPases avec de multiples activités cellulaires, qui sont caractérisées par la présence d'un (type I) ou deux (type II) domaine(s) ATPase qui s'assemblent en polymères. VCP en possède 2 (Meyer and Weihl, 2014). Il s'agit d'une protéine soluble très active, essentielle à la croissance et la survie cellulaire. VCP est une « chaperonne » moléculaire qui utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour corriger une mauvaise structuration des protéines, extraire des protéines à partir de membranes ou pour désassembler des complexes multi-protéiques. Elle est exprimée de façon ubiquitaire, aussi bien dans le noyau que dans le cytosol, et est retrouvée abondamment chez les eucaryotes, représentant environ 1% des protéines cytosoliques (Peters, Walsh and Franke, 1990). Par ses localisations multiples, VCP est impliquée dans une myriade de processus cellulaires dans le noyau, le cytosol, la mitochondrie, le RE, le Golgi, les lysosomes et à la membrane plasmique (Baek *et al.*, 2013).

3.2.1. Les cofacteurs de VCP

C'est grâce à son association avec divers cofacteurs que VCP peut être ainsi adressée vers ces différents compartiments et réguler l'homéostasie protéique. En effet, VCP possède un large nombre de cofacteurs recruteurs de substrats ou catalytiques, dont environ 30 furent identifiés. Ils permettent de contrôler ses différentes activités (Buchberger, Schindelin and Hänzelmann, 2015; Hänzelmann and Schindelin, 2017). Nous traiterons des principaux cofacteurs de VCP lorsque nous aborderons ses fonctions, dans la suite de ce chapitre.

4. Organisation fonctionnelle

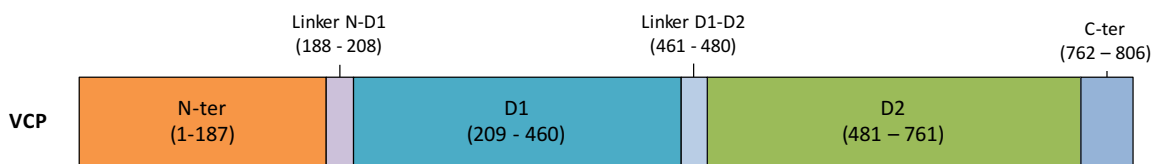
4.1. Un complexe hexamérique

VCP s'organise en complexe hexamérique très stable de forme circulaire d'un diamètre d'environ 12nm, dans lequel tous les monomères possèdent la même structure (Peters, Walsh and Franke, 1990; Peters *et al.*, 1992). Chaque monomère n'interagit qu'avec ses voisins adjacents ce qui permet de former un pore central au sein du complexe VCP.

4.2. Structures et organisation des monomères

Les monomères possèdent tous trois domaines principaux : un domaine N-terminal flexible (1-187) qui permet l'interaction avec les cofacteurs de VCP, deux domaines ATPase D1 (209-460) et D2 (481-761) ainsi qu'un court segment C-terminal désordonné (762-806) (Figure 21). Les régions N-ter/D1 (188-208) et D1/D2 (461-480) sont reliés par un segment dénommé *linker* (Zhang *et al.*, 2000; DeLaBarre and Brunger, 2003).

Au sein de l'hexamère, les deux domaines ATPase s'empilent les uns sur les autres et forment deux anneaux concentriques : un anneau N-D1 et un anneau D2 (Xia, Tang and Ye, 2016). Chaque hexamère contient ainsi 12 domaines ATPase et 6 domaines N-ter. Malgré ses capacités, VCP ne posséderait que 2 ou 3 sites ATPasiques fonctionnels contrairement aux enzymes recombinantes *in vitro* comme l'a montré une étude *in vivo* (Zalk and Shoshan-Barmatz, 2003).



Complexe hexamérique

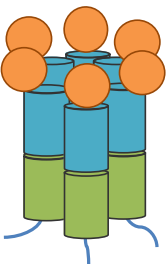


Figure 21 : Représentation schématique de la structure et du complexe l'hexamérique VCP/p97. Chaque sous-unité est constituée d'un domaine N-terminal globulaire (orange), de deux domaines ATPase D1 (cyan) et D2 (vert) et d'une queue C-terminale (grise). Les domaines D1 et D2 forment deux anneaux hexamériques empilés l'un au-dessus de l'autre. Le domaine globulaire N-terminal est positionné à la périphérie de l'anneau D1. Inspiré de (Meyer, Bug and Bremer, 2012).

4.3. Extrémités de VCP

4.3.1. Extrémité N-ter de VCP

La principale fonction du domaine N-ter de VCP est de permettre la liaison avec les cofacteurs ou les substrats de l'enzyme, à laquelle il apparaît indispensable pour l'interaction avec certaines protéines (Dai and Li, 2001). En effet, un domaine N-ter intact et non masqué est critique pour la capacité de VCP à lier ses partenaires.

Bien que le domaine N-ter de VCP ne soit pas indispensable pour son activité ATPase ou son hexamérisation, il a été montré que ce domaine pouvait aussi moduler l'activité ATPasique de l'enzyme en changeant de conformation par rapport au domaine D1 ou en jouant sur la flexibilité de l'ensemble du complexe. En effet, l'activité ATPase est supprimée lorsque le domaine N-ter est en conformation coplanaire à D1 alors que l'activité est restaurée si le domaine N-ter est libre du plan D1 et flexible. Par conséquent, les changements de conformation du domaine N-ter pourraient induire des transitions entre une forme active et une forme inactive de VCP participant au cycle d'hydrolyse de l'ATP. De telles transitions pourraient fournir la force nécessaire au remodelage des protéines cibles par interaction avec les cofacteurs (Rothballer, Tzvetkov and Zwickl, 2007; Niwa *et al.*, 2012).

4.3.2. Extrémité C-ter de VCP

De la même façon, la queue C-terminale de VCP flexible peut, elle aussi, interagir avec des partenaires protéiques mais n'affecte pas directement l'activité enzymatique de VCP. Elle jouerait plutôt un rôle dans la maintenance de la conformation de l'anneau D2 (Niwa *et al.*, 2012).

D'autre part, cette extension C-ter, comme les autres domaines de VCP, est aussi soumise aux modifications post-traductionnelles. Certaines de ces MPT au niveau du C-ter sont d'ailleurs utiles pour la localisation de VCP par exemple, attribuant à cette partie de VCP un autre rôle dans la régulation des fonctions biologiques de VCP (Madeo *et al.*, 1998; Livingstone *et al.*, 2005; Song, Wang, Song, Lockett, *et al.*, 2015; Hänzelmann and Schindelin, 2017).

4.4. Domaines ATPasiques

Les domaines D1 et D2 portent l'activité ATPase de VCP, qui est d'ailleurs sa seule activité enzymatique. Ils possèdent chacun un motif Walker A et un motif Walker B pour la liaison et l'hydrolyse de l'ATP respectivement (Baek *et al.*, 2013). Bien qu'ils soient responsables de fonctions

différentes au sein du complexe hexamérique, ils possèdent une forte homologie de séquence, communiquent de façon importante et sont interdépendants (Wang, Song and Li, 2004) .

4.4.1. Le domaine D1

Le domaine D1 est le responsable majeur de l'hexamérisation de VCP sur laquelle reposent l'activité enzymatique et ses fonctions biologiques (Wang *et al.*, 2003; Wang, Song and Li, 2003). VCP a une grande propension s'associer en hexamère et ne dépend pas de la présence de nucléotides pour cela. Elle requière seulement un domaine D1 intact. En effet, D1 étant plus stable, sert probablement de site initial d'oligomérisation. Toutefois, la liaison d'ATP ou d'ADP au niveau de D1 permet à VCP de se repositionner et de s'assembler plus rapidement en hexamère. D'autre part, il a également été montré que la liaison d'ATP au domaine D1 régulerait de manière sélective l'interaction entre son domaine N-ter et les cofacteurs, suggérant un nouveau rôle indirect pour D1 dans le recrutement de cofacteurs (Tang *et al.*, 2010; Chia *et al.*, 2012).

Enfin, le domaine D1 semble également capable de réguler l'activité ATPase du domaine D2 (Tang and Xia, 2013). Toutes ces données suggèrent que l'anneau D1 est le centre de communication de l'hexamère VCP.

4.4.2. Le domaine D2

Le domaine D2, quant à lui, est le responsable majeur de l'activité ATPasique de VCP (Song, Wang and Li, 2003). En effet, bien que D1 et D2 soient similaires en structure et en fonctions, des mutations identiques entre ces deux domaines n'affectent pas l'activité ATPasique de l'enzyme de la même façon. L'absence seule du domaine D2 réduit fortement les capacités enzymatiques de VCP. Bien que le domaine D1 ne soit pas responsable de l'activité ATPase majeure, il arrive à compenser la perte d'activité de D2 à fortes chaleurs, notamment au-delà de 50°C.

5. Activité ATPasique de VCP

L'activité ATPasique de VCP est sa seule fonction enzymatique et celle-ci dépend de tous ses domaines et de son hexamérisation pour être fonctionnelle. C'est grâce à l'hydrolyse de l'ATP que VCP est capable de changer de conformation lui permettant ainsi de générer une force mécanique qu'elle applique à ses substrats pour influencer leur stabilité et/ou leurs fonctions. Ce sont les études cristallographiques qui ont permis de mieux comprendre le fonctionnement de VCP, ou plutôt ses

changements conformationnels. La structure a révélé que la liaison d'ATP au domaine D2 permet l'ouverture de l'anneau D2 entraînant un mouvement rotationnel entre les deux anneaux de l'hexamère via le linker D1/D2. Ceci permet la liaison d'ATP au domaine D1, ce qui entraîne un changement de conformation de la région N-terminale effectrice (Banerjee *et al.*, 2016; Hänzelmann and Schindelin, 2016). Il est encore assez difficile d'expliquer et comprendre la communication qui s'effectue entre les différents domaines de VCP mais un schéma séquentiel semble se dessiner.

Lorsque VCP est liée à de l'ADP, le pore de liaison au substrat putatif central est dans une conformation fermée qui empêche la liaison du substrat. La liaison de l'ATP induit alors des changements conformationnels, conduisant à une ouverture du pore D2. Par la suite, l'hydrolyse de l'ATP conduit à une fermeture du pore D2 accompagnée de la libération du substrat. Cependant, les études de la structure de VCP en fonction du cycle ATPase n'ont pas encore établi le lien existant avec le domaine N-ter. En effet, comme nous l'avons vu plus haut, ce domaine peut aussi moduler l'activité ATPase en fonction de sa position. Ainsi, nous pourrions nous attendre à ce que la fixation de cofacteurs/adaptateurs en N-ter régule, via son interaction avec D1, à son tour l'ouverture du pore D2. Bien que cela puisse être suggéré dans la littérature, le fonctionnement précis de VCP n'est encore bien établi (Xia, Tang and Ye, 2016).

Ainsi, l'hydrolyse de l'ATP permet à VCP de générer des forces mécaniques pour mobiliser sélectivement les substrats à partir de complexes protéiques. En outre, VCP agit sur la séparation de protéines à partir de complexes multi-mériques ou à partir de structures immobiles. Bien que l'exigence mécanique exacte pour VCP ne soit pas claire et pourrait même être spécifique au contexte biologique, le dépliement des protéines au moins partiellement pourrait être un mécanisme commun et est retrouvé dans plusieurs fonctions cellulaires de VCP.

II. Les fonctions cellulaires de VCP

C'est grâce à l'activité ATPasique de VCP que nous avons précédemment décrite ainsi que par sa capacité à interagir avec différents cofacteurs, via ses domaines N-ter et C-ter, que cette enzyme est impliquée dans une large variété de processus cellulaires que nous allons présenter ici.

1. VCP et les processus de dégradation intracellulaire

Une des fonctions les plus reconnues et les plus décrites de VCP est l'adressage des protéines polyubiquitinylées au protéasome pour leur dégradation (Ghislain *et al.*, 1996; Dai and Li, 2001; Van Den Boom and Meyer, 2017). En effet, VCP est grandement impliquée dans le système ubiquitine-protéasome (UPS pour *Ubiquitin-Proteasome System*), dans lequel les protéines sont d'abord ciblées pour la dégradation par la machinerie d'ubiquitylation (liaison d'ubiquitine sur au moins 4 résidus lysine des protéines à dégrader) et sont ensuite reconnues, dépliées et dégradées par le protéasome (Figure 22) (Vilchez, Saez and Dillin, 2014).

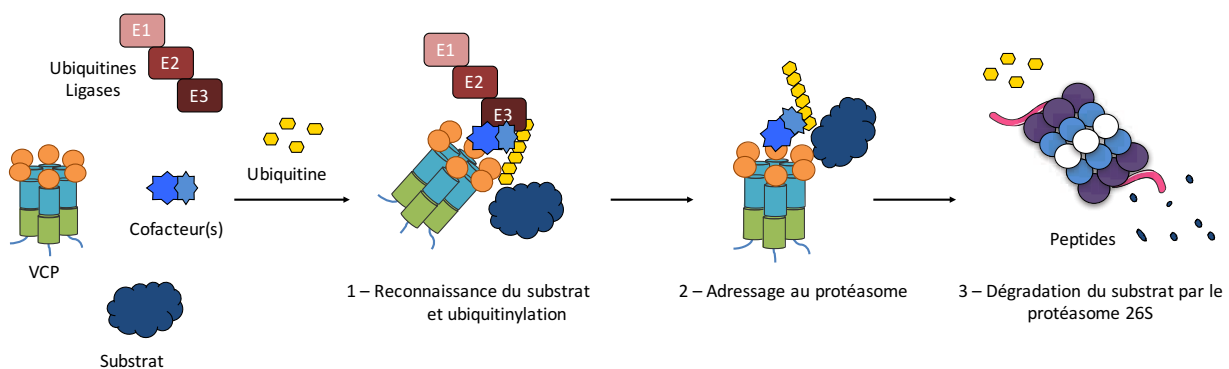


Figure 22 : Modèle mécanistique du rôle de VCP dans le système ubiquitine-protéasome. VCP coopère avec des cofacteurs dédiés (bleu) dans la reconnaissance du substrat (bleu foncé) et avec les enzymes E1, E2 et E3 (rouge). VCP assiste l'ubiquitylation (jaune) de ce dernier (1). Ensuite, VCP favorise le transfert du substrat polyubiquitylé vers le protéasome pour qu'il y soit dégradé en peptides (2/3). Inspiré de (Franz, Ackermann and Hoppe, 2014)

1.1. Rôles de VCP dans le système ubiquitine-protéasome

VCP joue plusieurs rôles dans l'UPS. D'abord, VCP assiste l'ubiquitylation du substrat en aidant à la reconnaissance entre le substrat et les ubiquitines ligases Ufd1, Ufd2 et Ufd3 (Meyer *et al.*, 2000; Richly *et al.*, 2005; Ye, 2006; Baek, Kim and Rao, 2011). En effet, VCP possède un domaine intrinsèque de liaison à l'ubiquitine dans son domaine N-ter et interagit aussi avec des cofacteurs liant l'ubiquitine. Ensuite, VCP favorise le transfert des substrats polyubiquitylés vers le protéasome pour qu'ils y soient dégradés. Pour cela, VCP, en association avec les cofacteurs Ufd1 et Npl4, désassemble ou déplie les protéines polyubiquitylées ou encore les extrait de structures cellulaires, facilitant la prise en charge par le protéasome (Meyer, Bug and Bremer, 2012; Defenouillere *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2013). Ces activités de dépliement des protéines sont portées par les domaines ATPases de VCP

(Song, Wang, Song and Rogers, 2015). Cependant, le fonctionnement de ses rôles et les mécanismes moléculaires de l'adressage des substrats du protéasome via VCP ne sont pas encore bien établis.

A travers ses activités dans l'UPS, VCP permet également de protéger la cellule contre les effets cytotoxiques causés par les protéines non-conformes ou endommagées qui peuvent s'accumuler ou pour répondre à une adaptation dans les conditions de stress cellulaire (Van Den Boom and Meyer, 2017).

1.2. Rôle de VCP dans la dégradation associée au réticulum endoplasmique

Parmi les processus d'UPS, la dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD pour *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*) est l'un des principaux processus dépendant de VCP (Wolf and Stolz, 2012). Ce processus sert de contrôle qualité des protéines qui entrent dans la voie sécrétoire (RE/Golgi), notamment pour y subir des modifications post-traductionnelles. Les protéines mal repliées ou mal-conformées sont extraites du RE vers le cytosol pour être adressées au protéasome et y être dégradées. Le rôle de VCP dans l'ERAD est de rétrotransloquer les protéines non conformes, ne passant pas le contrôle qualité, du RE vers le cytosol, en association avec les cofacteurs Ufd1-Npl4 (Figure 23) (Meyer *et al.*, 2000; Meyer, Wang and Warren, 2002; Ye, Meyer and Rapoport, 2003).

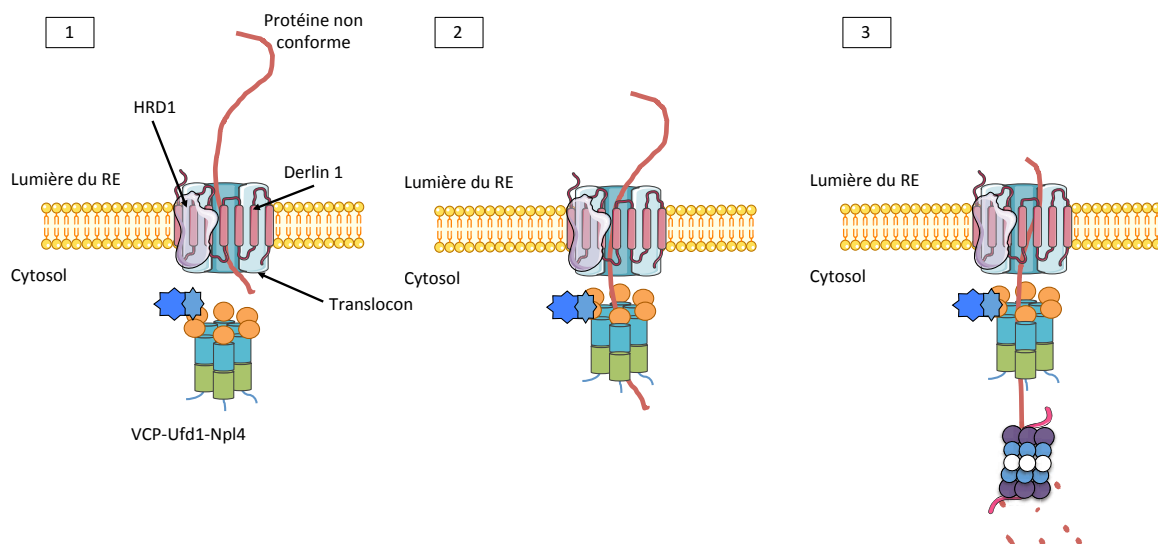


Figure 23 : Implication de VCP dans la dégradation associée au réticulum endoplasmique. (1) VCP est recrutée au niveau du complexe de translocation ou translocon de la membrane du RE grâce et avec ses cofacteurs Ufd1-Npl4. (2) VCP coordonne la rétrotranslocation de la protéine non conforme en dehors du RE et permet son adressage au protéasome pour qu'elle y soit dégradée (3). Inspiré de (Byun *et al.*, 2014).

Plusieurs cofacteurs catalytiques sont impliqués dans le recrutement du complexe VCP-Ufd1-Npl4 à la membrane du RE dont Derlin-1, Hrd1 et des protéines possédant des motifs VIMP (pour *VCP-interacting motif*) comme gp78, chez les mammifères (Lilley and Ploegh, 2004; Ye *et al.*, 2004, 2005; Ballar *et al.*, 2006).

Ainsi, le complexe VCP-Ufd1-Npl4, en interagissant avec ses cofacteurs ubiquitines ligases et déubiquitinases, lie le substrat, polyubiquitinylé ou non, émergeant de la membrane du RE. En effet, avant le recrutement de VCP, une petite portion du substrat traverse déjà de la membrane du RE grâce à un canal formé par les complexes protéines d'ubiquitines ligases dont le mécanisme n'est pas encore connu (Carvalho, Stanley and Rapoport, 2010). Bien que VCP et ses cofacteurs Ufd1-Npl4 ne soient pas requis pour l'initiation de la rétrotranslocation, le complexe VCP-Ufd1-Npl4 coordonne la polyubiquitinylation en maintenant les chaînes de polyubiquitine. Puis, ce complexe déloge le substrat polyubiquitinylé du RE grâce à la force mécanique générée par l'hydrolyse de l'ATP et le déplie pour faciliter sa dégradation (Rabinovich *et al.*, 2002; Flierman *et al.*, 2003; Beskow *et al.*, 2009; Byun *et al.*, 2014). Enfin, VCP transporte le substrat pour le délivrer au protéasome (Ye, Meyer and Rapoport, 2001; Meyer, Bug and Bremer, 2012; Zhang and Ye, 2014; Ye *et al.*, 2017).

Par conséquent, VCP agit dans ce processus pour maintenir l'homéostasie du RE et pour réduire le stress du RE lequel, entraînant l'accumulation de protéines, est souvent retrouvé en conditions pathologiques. A noter que même si VCP est nécessaire pour l'ERAD, cette enzyme n'est pas indispensable pour la dégradation de certains substrats.

1.3. Dégradation associée à la mitochondrie

Par un mécanisme similaire à l'ERAD, VCP peut également extraire des protéines polyubiquitinyllées de la membrane externe de la mitochondrie, intervenant ainsi dans un processus dénommé OMMAD pour *Outer Mitochondrial Membrane-Associated Degradation* (Heo *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2015). Encore une fois, c'est le complexe VCP-Ufd1-Npl4 qui intervient dans ce processus, recruté par Doa1, un homologue de la protéine humaine PLAA chez la levure, au niveau de la membrane mitochondriale (Wu, Li and Jiang, 2016; Zhang and Ye, 2016).

Le rôle de VCP dans l'OMMAD est crucial pour l'homéostasie cellulaire puisque la mitochondrie est le support énergétique de la cellule et intervient de nombreuses voies de signalisation dont l'apoptose. En effet, VCP permet ainsi de contribuer au maintien de l'intégrité de la mitochondrie en éliminant les protéines mitochondriales dysfonctionnelles ou en surnombre, qui pourraient influencer de manière négative son bon fonctionnement.

1.4. VCP et la voie autophagie-lysosome

Outre les voies menant au protéasome, VCP a aussi un impact sur le système autophagie/lysosome. C'est grâce à la découverte de VCP en tant que facteur causatif de la maladie osseuse de Paget, dans laquelle le gène *VCP* est muté et l'autophagie compromise, que VCP fut associée à l'autophagie (Kimonis *et al.*, 2000; Watts *et al.*, 2004).

1.4.1. L'autophagie

L'autophagie est le système de dégradation des grandes structures telles que des agrégats protéiques ou des organelles qui ne peuvent pas être dégradés par le protéasome. C'est un processus qui implique de nombreuses protéines et qui est finement régulé. Il débute par une étape d'initiation lors de laquelle une vésicule, appelée phagophore, est formée à partir de l'isolation d'une membrane provenant d'une bicouche lipidique (RE, mitochondrie, membrane plasmique). De manière concomitante à la fermeture du phagophore conduisant à la formation d'un autophagosome, du matériel cytoplasmique à dégrader est englouti par cette vésicule. L'autophagosome va ensuite fusionner avec des lysosomes pour donner un autophagolysosome ou autolysosome pour entraîner la dégradation de son contenu (Figure 24) (Rubinsztein, Mariño and Kroemer, 2011).

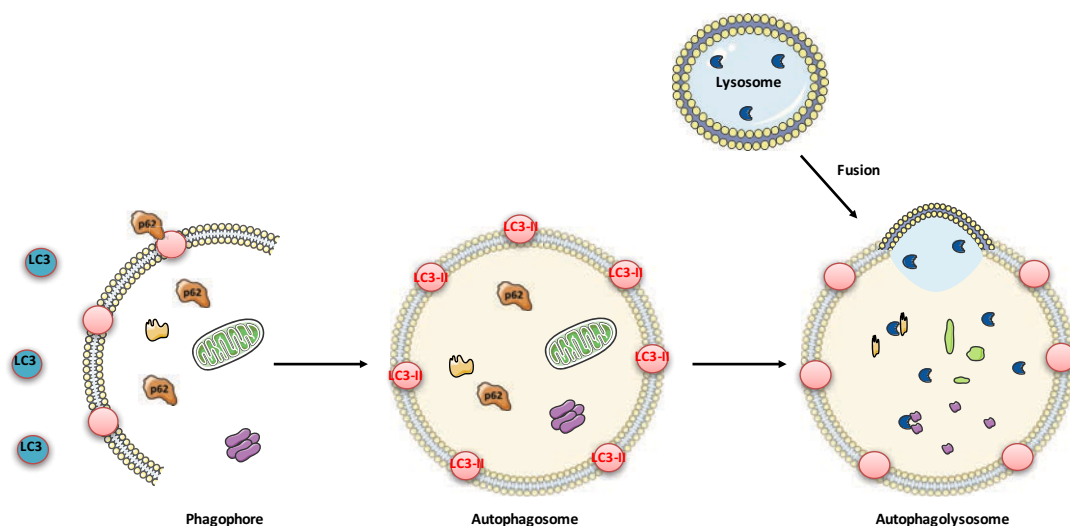


Figure 24 : Vue d'ensemble du processus d'autophagie. Le phagophore, décoré par la forme lipidée de la protéine LC3 (LC3-II), englobe des composants cellulaires pour former des autophagosomes. L'adaptateur spécifique de ce processus : p62 permet le recrutement de substrats à dégrader au niveau des vésicules en formation (Katsuragi, Ichimura and Komatsu, 2015). Une altération de l'autophagie est d'ailleurs caractérisée par l'accumulation de LC3-II et de p62.

En fonction du matériel à dégrader, plusieurs sous-types d'autophagie peuvent être distingués dont la macro-autophagie (matériel cytoplasmique), la ribophagie (ribosomes) ou la mitophagie (mitochondrie). Généralement, les substrats sont conjugués à l'ubiquitine, qui via les protéines adaptatrices spécifiques, est liée à LC3-II sur la membrane autophagique. Les autophagosomes résultants finissent par fusionner avec les lysosomes pour former les autophagolysosomes et le matériel englouti est dégradé (Rubinsztein, Mariño and Kroemer, 2011; Bug and Meyer, 2012).

1.4.2. Rôles de VCP dans l'autophagie

Peu de choses sont encore connues sur le mécanisme exact de régulation de l'autophagie par VCP mais son implication se situe à plusieurs étapes de l'autophagie dont la biogénèse, la fusion et la maturation des autophagosomes. En effet, les mutations de *VCP* sont caractérisées d'une part par l'accumulation de vésicules d'autophagie immatures et d'inclusions d'ubiquitines ainsi que des défauts de morphologie des lysosomes et par la formation aberrante d'autophagosomes (Ju *et al.*, 2009; Ju and Wehl, 2010; Tresse *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2015). D'autre part, VCP interagit avec de nombreux régulateurs de l'autophagie dont LC3/Atg8, p62 et la déacétylase HDAC6 (Boyault *et al.*, 2006; Dargemont and Ossareh-Nazari, 2012). Il semblerait que Ubx1 soit le cofacteur de VCP dans l'autophagie grâce auquel VCP peut interagir avec LC3/Atg8, ce qui a, du moins, été démontré chez la levure (Krick *et al.*, 2010). Cependant, les cofacteurs de VCP ne sont pas encore clairement identifiés pour le moment.

Il existe plusieurs hypothèses concernant le rôle de VCP dans l'autophagie. VCP pourrait être impliquée dans la localisation membranaire, l'extraction ou l'oligomérisation de facteurs particuliers intervenant dans la formation, la fusion ou la maturation de l'autophagosome (Franz, Ackermann and Hoppe, 2014).

1.4.3. VCP et l'autophagie des organites intracellulaires

Néanmoins, l'implication de VCP dans la dégradation des organites défectueux dont la mitophagie, la ribophagie et la lysophagie : dégradation des mitochondries, ribosomes et lysosomes respectivement, est mieux comprise. Pendant la mitophagie, VCP extrait les mitofusines de la membrane mitochondriale en association avec Parkin pour les adresser au protéasome, empêcher la refusion mitochondriale et faciliter la prise en charge des autophagosomes (Tanaka *et al.*, 2010). VCP est aussi impliquée dans la clairance des ribosomes en partenariat avec Ubp3–Bre5–Ufd3 chez la levure, où le complexe participe à la déubiquitinylation des substrats cibles avant la dégradation

vacuolaire (Ossareh-Nazari *et al.*, 2010). Enfin, VCP est transloquée vers les lysosomes quand ils sont endommagés et coopère avec un ensemble de cofacteurs : Ubx1, PLAA, et la déubiquitinylyase YOD1 dans la lysophagie. VCP et ses cofacteurs agissent, ici, en aval de l'ubiquitinylation et du recrutement de p62, et participent à la déubiquitinylation d'une sous-population de lysosomes endommagés pour favoriser la formation d'autophagosomes (Papadopoulos *et al.*, 2017).

En dernier lieu, bien qu'elles ne soient pas considérées comme des organelles car elles ne possèdent pas de membranes, les granules de stress sont aussi dégradées par un processus dénommé granulophagie dans lequel VCP est impliquée (Buchan *et al.*, 2013; Seguin *et al.*, 2014).

Finalement, VCP apparaît être impliquée dans toutes sortes de processus de dégradation cellulaire aussi bien pour des protéines, des agrégats que pour des organelles, soit avec le protéasome ou avec la voie autophagie-lysosome.

2. VCP dans le noyau

En dehors de ses rôles dans le cytosol, VCP exerce également des fonctions de régulation au niveau de la chromatine et du noyau. En effet, VCP participe à la dégradation associée à la chromatine (Dantuma, Acs and Luijsterburg, 2014; Franz, Ackermann and Hoppe, 2016). Plusieurs substrats nucléaires de VCP ont été clairement identifiés et parmi lesquels sont retrouvés : des ADN et ARN polymérase dont l'ARN polymérase II (Verma *et al.*, 2011), la kinase de la mitose Aurora B (Ramadan *et al.*, 2007), des protéines de réparation des cassures doubles brins dont Ku70/80 (van den Boom *et al.*, 2016), des hélicases, des facteurs de réplication principalement. La dégradation de ces substrats grâce à VCP permet entre autres la transcription, la progression du cycle cellulaire, la réplication de l'ADN et la réparation de l'ADN (Meerang *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2017). C'est l'ubiquitinylation des substrats qui entraîne le recrutement de VCP et ses cofacteurs notamment Ufd1-Npl4, à la chromatine. Dans le noyau, le rôle de chaperonne de VCP prend tout son sens puisque l'extraction d'éléments à partir de l'ADN requière usuellement des réarrangement structuraux (Van Den Boom and Meyer, 2017). A travers sa contribution à ces activités, VCP contribue à la maintenance et la stabilité du génome.

3. VCP et la voie de signalisation NF- κ B

VCP est également impliquée dans la voie de signalisation NF- κ B. La protéine NF- κ B est un facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire, la réponse inflammatoire et le stress

cellulaire principalement. A l'état basal, NF- κ B est un dimère classiquement composé des sous-unités p50 et p65, séquestrés dans le cytoplasme grâce à un complexe de protéines inhibitrices dont I κ B α pour *NF- κ B inhibitor α* . Pour l'activation de ce facteur de transcription, I κ B α doit être dégradée pour libérer NF- κ B. Cette dégradation se fait par le protéasome de manière dépendante de VCP (Dai *et al.*, 1998; Schweitzer, Pralow and Naumann, 2016). En effet, c'est en partenariat avec Ufd1 et Npl4 que VCP interagit avec I κ B α ubiquitinylée et délivre cette protéine au protéasome (Li *et al.*, 2014). Cependant, le mécanisme de livraison au protéasome n'est pas encore identifié mais il est certain que VCP intervient dans la régulation post-ubiquitylation de I κ B α . De plus, le complexe VCP-Ufd1-Npl4 prend aussi part à la régulation de la voie NF- κ B en dégradant partiellement la sous-unité p100 générant la sous-unité p52, nécessaire au dimère NF- κ B (Zhao Zhang *et al.*, 2015). Par cette activité, VCP gouverne des voies de signalisation cruciales pour la cellule.

4. VCP et la fusion membranaire

Une des dernières grandes fonctions de VCP que nous allons aborder est la régulation de la fusion membranaire. VCP intervient dans la biogénèse du RE, du Golgi, dans l'assemblage de la membrane nucléaire, dans l'endocytose et la fusion des lysosomes.

4.1. VCP et la fusion vésiculaire

D'un côté, VCP intervient au niveau de la formation des vésicules d'endocytose, qui vont par la suite être dégradées en suivant la voie d'autophagie en fusionnant avec les lysosomes (Bug and Meyer, 2012). Il a tout d'abord été montré que VCP interagissait avec la clathrine, protéine permettant la formation de vésicule d'endocytose, mais sans comprendre son implication fonctionnelle (Pleasure, Black and Keen, 1993). Puis, VCP fut associée à EEA1 pour *Early Endosomal Autoantigen 1*, facteur permettant la fusion entre les vésicules d'endocytose et les endosomes précoces ; et la cavéoline-1 (CAV1), impliquée dans l'invagination membranaire pour former des vésicules d'endocytose (Ritz *et al.*, 2011; Ramanathan and Ye, 2012). Chacune de ces études ont d'ailleurs montré une altération de la voie d'endocytose quand VCP était inhibée : soit en entraînant un gonflement des endosomes causés par une oligomérisation accrue de EEA1 et en retardant l'adressage des endosomes aux lysosomes ; ou soit par un grossissement des endosomes et inhibition de la formation des cavéoles, respectivement. Dans ce processus, les fonctions de VCP ne sont toujours pas bien déterminées. En effet, il semblerait que VCP régule l'état d'oligomérisation de EEA1 et l'ubiquitylation de CAV1 permettant la dissociation des complexes pour favoriser la fusion membranaire de manière générale (Ramanathan

and Ye, 2012; Kirchner, Bug and Meyer, 2013). Ainsi, VCP intervient dans l'endocytose ce qui la relie d'une autre façon encore à l'autophagie et la voie de dégradation par les lysosomes.

4.2. Rôle de VCP dans la reformation du RE et du Golgi

D'autre part, VCP permet la reformation du RE et du Golgi en fin de mitose. Il s'agit d'ailleurs d'une des premières fonctions assignées à Cdc48 chez la levure (Latterich, Fröhlich and Schekman, 1995). Jusqu'ici, trois cofacteurs de VCP : p47, p37 et VCIP135 furent identifiés dans ce processus (Kondo *et al.*, 1997; Uchiyama *et al.*, 2002, 2006; Uchiyama and Kondo, 2005). Il semblerait que le complexe VCP-p47-VCIP135 entraîne la déubiquitinylation de la protéine t-SNARE syntaxine 5 (Syn5) grâce à l'activité ATPase de VCP, ce qui permet à cette dernière de pouvoir interagir avec une protéine SNARE complémentaire pour la fusion membranaire (Huang, Tang and Wang, 2016). Bien que les rôles de p37 et p47 ne soient pas encore bien compris dans ce mécanisme, ils jouent des rôles tout aussi essentiels dans la fusion membranaire. Leurs effets apparaissent être opposés puisque p47 inhibe VCP alors que p37 serait plutôt activateur de l'enzyme (X. Zhang *et al.*, 2015). De plus, l'activité hydrolase de VCP serait différente ici de celle impliquée dans les processus d'extraction membranaire mais cela reste encore à déterminer (Stach and Freemont, 2017).

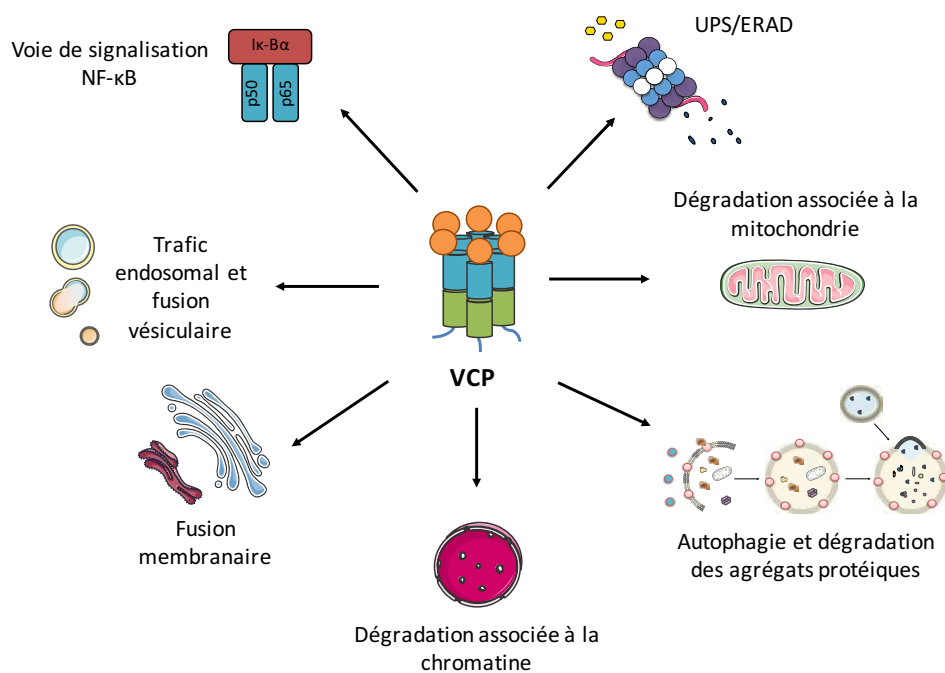


Figure 25: Principales fonctions de VCP dans la cellule. Représentation schématique des différentes fonctions dans lesquelles VCP est impliquée qui sont présentées dans ce chapitre.

En résumé, VCP est impliquée dans de nombreux processus cellulaires dont les processus de dégradation cellulaire (protéasome et voie autophagie/lysosome), la dégradation associée à la chromatine, l'inflammation et la voie de signalisation NF- κ B ainsi que la fusion membranaire, ce que nous avons présenté ici (Figure 25). VCP se présente ainsi comme un régulateur clé de l'homéostasie cellulaire. De ce fait, il n'apparaît pas étonnant que des mutations de VCP et/ou des dérégulations de ses activités conduisent à des pathologies caractéristiques.

III. Les mutations de VCP et maladies associées

L'implication de VCP dans une myriade de processus cellulaires suggère que cette protéine est relativement importante pour le bon fonctionnement de l'organisme. En effet, les dérégulations VCP, notamment par son rôle dans l'intégrité du génome et la signalisation NF- κ B, conduisent à des cancers (Asai *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2003; Y. Liu *et al.*, 2012). Des inhibiteurs de VCP sont d'ailleurs développés pour le traitement de cellules cancéreuses (Haines, 2010; Magnaghi *et al.*, 2013; Vekaria *et al.*, 2016; Gugliotta *et al.*, 2017).

1. Mutation de VCP

Les mutations du gène VCP sont principalement associées à des désordres neurodégénératifs rares impliquant plusieurs systèmes dont la myopathie à corps d'inclusions (IBM pour *Inclusion body myopathy*) associée à la maladie osseuse de Paget (PDB pour *Paget's disease of the bone*) et/ou à la démence frontotemporale (FTD pour *Frontotemporal dementia*) ainsi que la sclérose latérale amyotrophique (ALS pour *Amyotrophic lateral sclerosis*) (Kimonis *et al.*, 2000; Watts *et al.*, 2004). Les patients portant une mutation pathogénique de VCP peuvent posséder n'importe quelle combinaison de ces phénotypes dont les quatre phénotypes ou seulement un phénotype isolé (Meyer and Weihl, 2014). Au fur et à mesure de l'identification des mutations de VCP, le spectre des phénotypes associés s'élargit et il est désormais possible de retrouver des symptômes de type parkinsonien ou ataxie par exemple. Ainsi, le terme « Protéinopathie Multi-système » a été proposé pour une nouvelle famille de troubles génétiques associés par cette variation caractéristique de la pénétrance des phénotypes dégénératifs musculaires, osseux et cérébraux avec l'accumulation d'inclusions protéiques particulières.

1.1. IBMPFD

1.1.1. Caractéristiques cliniques

La myopathie à corps d'inclusions associée à la maladie osseuse de Paget et/ou à la démence frontotemporale (IBMPFD) est un désordre génétique autosomale dominant et d'origine héréditaire dans 80% des cas (genereviews.org). C'est une pathologie qui affecte principalement les muscles, le cerveau et le tissu osseux (Kimonis *et al.*, 2000; Ju and Weihl, 2010). Une des manifestations cliniques les plus fréquentes de l'IBMPFD est la myopathie chez 90% des patients atteints qui est caractérisée par une faiblesse et une atrophie des muscles apparaissant chez l'adulte généralement. La PDB et de la FTD sont également développées par ces patients dans 50% et 30% des cas respectivement (Franz, Ackermann and Hoppe, 2014; Tang and Xia, 2016). Les données scientifiques montrent également que 10% des patients atteints d'IBMPFD avait déjà été diagnostiqués pour l'ALS. Cependant, bien que des patients d'une même famille puissent porter la même mutation, ils peuvent montrer des symptômes radicalement différents, à des âges différents (Kovach *et al.*, 2001).

1.1.2. Mutations dans VCP et IBMPFD

Plus d'une vingtaine de mutations (substitutions faux sens) dans VCP entraînant l'IBMPFD ont été identifiées à travers le monde et représentent 3,5% des cas (Baek *et al.*, 2013; Mehta *et al.*, 2013; Saracino *et al.*, 2018). La majorité de ces mutations sont localisées au niveau ou proche des domaines N-ter et D1 et sont généralement associées à des défauts d'autophagie et/ou de dégradation protéasomale (Ju and Weihl, 2010; Nalbandian *et al.*, 2011) Ainsi, l'IBMPFD est principalement caractérisée par l'accumulation cytoplasmique et/ou nucléaire d'agrégats ou inclusions d'ubiquitine associée avec VCP ainsi que des inclusions de TDP-43 pour *TAR DNA binding protein-43* dans les tissus affectés (Forman *et al.*, 2006; Weihl *et al.*, 2008; Gitcho *et al.*, 2009; Nalbandian *et al.*, 2011).

1.2. ALS

1.2.1. Caractéristiques cliniques

La sclérose latérale amyotrophique ou Maladie de Charcot ou Maladie de Lou Gehrig est une atteinte neurodégénérative lente et progressive qui affecte inexorablement les neurones moteurs du cerveau ainsi que la moelle épinière conduisant à une paralysie complète dans les stades tardifs (Ye *et al.*, 2017). L'ALS est une maladie d'origine majoritairement sporadique alors que seulement 10% des cas sont d'origine familiale.

1.2.2. Mutations dans *VCP* et ALS

18 mutations génétiques ont été identifiées à l'origine des formes héréditaires d'ALS dont des mutations dans le gène *VCP* qui représentent environ 1 à 2% de ces formes (Johnson *et al.*, 2010; Koppers *et al.*, 2012; Kwok *et al.*, 2015). Cependant, les effets de ces mutations sur l'altération des fonctions de *VCP* ne sont pas encore bien compris. Les caractéristiques pathologiques de l'ALS étant la perte des neurones moteurs souvent associée au développement d'inclusions d'ubiquitines et/ou de dépôts d'agrégats de TDP-43, il semble qu'un défaut de l'homéostasie protéique peut résulter en partie, des altérations de *VCP*.

2. Les effets des mutations sur les activités de *VCP*

2.1. *VCP* dans le développement

Les mutations pathogéniques de *VCP* semblent être bien tolérées par l'organisme puisqu'il n'y a aucune évidence d'anomalies du développement avant l'apparition des atteintes à l'âge adulte (Badadani *et al.*, 2010). Les patients, qui se développent normalement, ne semblent porter qu'un seul allèle muté conduisant au développement tardif de la maladie (Kimonis *et al.*, 2000, 2008). En effet, des études chez la souris ont montré que la déficience de protéine *VCP* (*VCP*^{-/-}) entraîne une létalité embryonnaire précoce (Müller *et al.*, 2007).

2.2. Caractéristiques associées aux mutations

Les pathologies causées par les mutations de *VCP* possèdent des caractéristiques communes dont l'accumulation d'inclusions d'ubiquitine affectant les systèmes de dégradation (Ju and Weihl, 2010). En fonction de la localisation dans le gène, les mutations de *VCP* affectent différemment la conformation et/ou l'activité ATPasique de la protéine ainsi que ses fonctions par extension. Des études structurales ont d'ailleurs montré que la majeure partie des mutations était localisée à l'interface dans des domaines N-ter et D1 et qu'aucune n'est retrouvée dans le domaine d'hydrolyse de l'ATP, du moins dans l'IBMPFD (Tang *et al.*, 2010).

2.2.1. La mutation R155H

Par exemple, la mutation R155H, la plus fréquente causant l'IBMPFD, n'altère pas l'hexamérisation de *VCP* ni son activité ATPasique alors qu'elle entraîne une dysfonction de l'ERAD et l'accumulation d'agrégats d'ubiquitine et de *VCP* dans le cytosol et au niveau de la membrane du

RE (Weihl *et al.*, 2006). La détérioration de l'ERAD engendrée par cette mutation précise de VCP n'est pas encore explicite aux yeux des scientifiques mais plusieurs suggestions sont possibles : impossibilité d'interagir avec ses cofacteurs essentiels pour délivrer les substrats au protéasome, de changer de conformation suite à l'hydrolyse de l'ATP ou alors, propension à l'agrégation.

2.2.2. Effets sur la conformation de l'hexamère

Certaines mutations provoquent des changements structurels de VCP, notamment au niveau de la partie N-ter, qui impactent l'interaction de VCP avec ses cofacteurs en favorisant fortement certaines interactions plutôt que d'autres, les bloquant dans un complexe non productif; en empêchant leur reconnaissance/liaison ou en entraînant des interactions anormales provoquant une activité ATPase dérégulée (Fernández-Sáiz and Buchberger, 2010; Ritz *et al.*, 2011; Erzurumlu *et al.*, 2013; X. Zhang *et al.*, 2015). Par exemple, la mutation P137L abolit la liaison de VCP avec Ufd1-Npl4 et p47 alors que l'interaction avec gp78 et VIM est conservée. Cette mutation aboutit à une accumulation des substrats polyubiquitinés qui pourrait être due, selon les chercheurs au non-transfert de ces substrats de l'ubiquitine ligase vers VCP, ce qui empêche leur dégradation (Erzurumlu *et al.*, 2013).

2.2.3. Effets sur l'activité ATPase

Ces changements conformationnels peuvent aussi affecter l'activité ATPasique de VCP (Tang *et al.*, 2010; Schuetz and Kay, 2016). C'est le cas notamment des mutations R155P et A232E qui entraînent des défauts de structure et une déstabilisation de l'anneau D2 augmentant l'activité ATPasique basale de VCP (Halawani *et al.*, 2009). Cette augmentation d'activité peut ainsi être délétère en déstabilisant les interactions protéiques médiées par p97 ou en générant un nouveau gain de fonction toxique mais des expériences plus approfondies sont encore nécessaires pour comprendre les conséquences réelles de ces mutations sur les fonctions de VCP. D'autres études démontrent également une augmentation de l'activité ATPasique de VCP et une plus grande affinité pour certains cofacteurs, soit un gain de fonction toxique mais sans pour autant l'expliquer au niveau structurel (Manno *et al.*, 2010; Rijal *et al.*, 2016).

2.2.4. Effets doubles

De nombreuses études, particulièrement *in vitro*, s'intéressent à la compréhension des effets des mutations sur VCP au niveau moléculaire et cellulaire. Il a par ailleurs été montré que certaines

mutations dont R155H et A232E modulaient négativement l'affinité du domaine D1 pour l'ADP ce qui altérerait les changements de conformations induits par les nucléotides et la communication entre les sous-unités. La résultante de cela est une augmentation de l'activité ATPasique ainsi que de l'affinité pour certains cofacteurs (Tang and Xia, 2013; Bulfer, Chou and Arkin, 2016).

Pour résumer, les mutations de *VCP* peuvent avoir plusieurs conséquences : modification de la structure, altération des changements de conformation, modification de la liaison aux cofacteurs et/ou modifications de l'activité ATPasique. Les effets varient en fonction de la localisation dans la séquence du gène et peuvent être conjoints ou non. Elles ne semblent pas toutes avoir un effet global sur les fonctions de *VCP* mais elles altèrent plutôt un sous-ensemble de fonctions distinctes (Tang and Xia, 2012; Meyer and Weihl, 2014).

Malgré la progression dans la compréhension des effets des mutations de *VCP*, de nombreuses questions fondamentales restent sans réponse concernant la mécanistique de *VCP* mutée auxquelles la communauté scientifique se heurte encore à ce jour.

IV. *VCP* et la maladie d'Alzheimer

Finalement, après avoir vu l'étendue des fonctions de *VCP* et son implication dans les maladies neurodégénératives, la question concernant l'existence d'un lien entre *VCP* et la MA se pose.

1. *VCP* et la MA

Très peu de données dans la littérature relatent le lien entre la protéine *VCP* et la pathologie Alzheimer. Seuls 21 résultats sortent lorsque les mots clés « p97 and Alzheimer's disease » sont tapés dans PubMed et 56 pour « *VCP* and Alzheimer's disease » (résultats au 30/07/18), et encore, ils ne traitent pas tous directement de la MA et de *VCP*. Les articles référencés par rapport à ces recherches relient souvent la MA et *VCP* par la démence frontotemporale ou l'altération des systèmes de dégradation. En effet, *VCP* se situe au carrefour des mécanismes altérés dans la MA et a des effets pertinents dans la neurodégénérescence (Hirabayashi *et al.*, 2001; Ciechanover and Kwon, 2015).

A ce jour, aucune mutation de *VCP* n'a encore été associée à la MA cependant une étude a montré que les taux protéiques de *VCP* étaient retrouvés diminués dans le cortex des patients atteints

de la MA (Dolan *et al.*, 2011). De plus, VCP a été identifiée comme un substrat de la caspase 6. L'activation de cette caspase est associée à la neurodégénérescence de la MA suggérant que la protéolyse de VCP joue un rôle dans ce processus (Halawani *et al.*, 2010). À part les études mentionnées précédemment, il ne semble pas y avoir d'autres éléments plus précis ou directs unissant VCP et la MA en elle-même. Semblablement, les données concernant la relation entre VCP et l'APP ou VCP et Tau ne sont pas beaucoup plus développées mais nous allons nous y intéresser de plus près.

2. APP et VCP

À ce jour, il ne semble exister aucune relation entre VCP et l'APP dans la littérature scientifique ou du moins, une interaction directe entre ces deux protéines. Un seul article fait mention d'une interaction par co-immunoprécipitation entre VCP et une construction C99 (fragment β -CTF de l'APP) surexprimée et mutée, dans la dégradation par l'ERAD dépendante de la sélénoprotéine S (Jang *et al.*, 2017a). En relation avec le métabolisme de l'APP, il a également été montré que la γ -sécrétase pouvait interagir avec VCP (Wakabayashi *et al.*, 2009). Cependant, aucune autre donnée bibliographique n'est disponible à ce sujet. Ainsi, il serait très intéressant d'étudier la relation pouvant exister entre l'APP et VCP.

3. Tau et VCP

De la même façon que pour l'APP, il existe peu de travaux s'intéressant à la relation existante entre Tau et VCP. Une interaction directe entre VCP et Tau a été établie dans un modèle murin de tauopathie dans le cadre d'une étude sur l'impact de l'accumulation tau sur l'ERAD (Abisambra *et al.*, 2013). En culture primaire de neurones de rat, la réduction d'expression de VCP a aussi démontré une augmentation de la forme soluble de la protéine tau phosphorylée en position 262/356 ainsi qu'une diminution des niveaux solubles de tau total, suggérant un rôle de VCP dans la dégradation de cette forme phosphorylée et dans la stabilisation de certaines formes de tau (Dolan *et al.*, 2011). Cependant, les mécanismes par lesquels VCP régule la stabilité et/ou le catabolisme de Tau restent encore à déterminer. Récemment, des travaux sur la propagation de tau ont montré que des formes agrégées cytosoliques de protéines tau pouvaient être reconnues par des anticorps et neutralisés par TRIM21 (pour *Receptor Tripartite motif protein 21*) en association avec VCP qui désagrègerait ces formes agrégées de tau pour empêcher l'agrégation (McEwan *et al.*, 2017).

Ainsi, ces différentes études suggèrent un rôle de VCP sur la phosphorylation, la stabilisation et/ou la dégradation de Tau. Bien que l'implication de VCP dans le métabolisme de Tau semble évidente, des recherches plus poussées sont requises pour déterminer par quels mécanismes VCP régule Tau.

Objectifs

Objectifs scientifiques

A travers cette introduction, nous avons constaté que malgré les grandes avancées scientifiques, il existe encore de nombreuses zones d'ombres dans la physiopathologie de la MA et du métabolisme de l'APP. Sans compter que la MA manque cruellement de solutions thérapeutiques et de traitements puisqu'il s'agit encore d'une maladie incurable à ce jour.

Le métabolisme de l'APP et la MA sont essentiellement associés à la production de peptides A β et aux dépôts amyloïdes. Bien que ces derniers fassent partie des principales caractéristiques de la MA, les clivages de l'APP donnent également naissance à d'autres métabolites, jouant eux-aussi un rôle important dans le développement de la pathologie. Certains de ces métabolites dont les β -CTFs, intermédiaires entre l'APP et les peptides A β , sont d'ailleurs retrouvés accumulés dans les neurones où ils induisent une toxicité. La dérégulation du métabolisme de l'APP et l'accumulation de ses métabolites observées dans la MA se développeraient, en partie, suite à un dysfonctionnement des processus de dégradation dans les neurones (Nixon, 2017). Ces processus de dégradation font intervenir les systèmes ubiquitine-protéasome et autophagie-lysosome, qui sont importants pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, notamment pour les cellules post-mitotiques comme les neurones. Par conséquent, leur dysfonctionnement contribue au développement de maladies neurodégénératives dont la MA (Ghavami *et al.*, 2014).

Afin de mieux comprendre le rôle des processus de dégradation dans le métabolisme de l'APP, **le premier objectif de cette thèse fut d'étudier de façon plus approfondie l'implication respective des voies de dégradation de l'APP et de ses métabolites : γ -sécrétase, protéasome et voie endo-lysosomale.** Cette première étude nous a permis de montrer que l'APP et ses fragments carboxy-terminaux (APP-CTFs) étaient principalement dégradés par deux voies : la γ -sécrétase et la voie endo-lysosomale.

A la suite de ces résultats, nous nous sommes intéressés à des dérivés de la chloroquine : les MSBD, développés par l'équipe de chimie du centre de recherche. La chloroquine est un agent capable de réduire la production de peptides A β par alcalinisation des lysosomes (fonctionnant à pH acide) altérant par conséquent la voie endo-lysosome. Ces composés MSBD sont également capables de réduire la sécrétion des peptides A β mais possèdent des propriétés différentes de la chloroquine. Leur mécanisme d'action restait encore à déterminer, notamment leur effet sur la voie endo-lysosome. Dans cet objectif, des études préliminaires ont conduit à l'identification de la protéine VCP comme un ligand potentiel de ces molécules. Etant donné que les effets principaux des MSBD sont une modification de

la dégradation de l'APP et de la phosphorylation de Tau, un faisceau d'arguments nous a amenés à émettre l'hypothèse que l'action des MSBD ferait intervenir une ou plusieurs voies de dégradation protéique au carrefour desquelles se trouve la protéine VCP, dont la voie endo-lysosome.

Ainsi, **le second objectif de cette thèse fut de déterminer quel était le degré d'implication de VCP dans l'effet de ces molécules et comment celles-ci modulaient le métabolisme de l'APP en relation avec VCP.** Pour comprendre le rôle potentiel de ces composés via VCP, nous avons d'abord cherché à comprendre le rôle de VCP sur le métabolisme de l'APP puisqu'il s'agit d'informations peu ou pas renseignées dans la littérature scientifique. Puis, nous avons étudié les effets des meilleurs composés issus de la dernière famille de molécules développées par l'équipe du Pr. Patricia Melnyk, sur le métabolisme de l'APP dans des modèles cellulaires de neurones surexprimant l'APP dans lesquels nous avons réprimé l'expression de VCP ou inhibé son activité.

Les objectifs de ces travaux de thèse sont alors résumés dans les points suivants et seront présentés dans la partie résultats sous forme d'articles scientifiques publiés ou en cours de publication :

- 1) Etude de la contribution de la voie endo-lysosomale et du système protéasomal à la dégradation de l'APP et de ses fragments carboxy-terminaux

- 2) Détermination des effets biologiques des MSBD et leurs dérivés sur les processus pathologiques de la MA
 - I. Etude du rôle de VCP sur le métabolisme de l'APP
 - II. Implication de VCP dans l'effet des meilleurs composés
 - III. Mode d'action des MSBD et dérivés

Résultats

Partie 1 : Contribution de la voie endo-lysosomale et du système protéasomal à la dégradation de l'APP et de ses fragments carboxy-terminaux

I. Objectif de l'étude

Depuis plusieurs années, la littérature a bien établi que le métabolisme de l'APP faisait intervenir différentes sécrétases mais que cette protéine pouvait être aussi dégradée de manière alternative à ces clivages enzymatiques. La compréhension des processus intervenant dans la dégradation de l'APP et de ses fragments est importante pour prévenir leur accumulation, notamment dans des conditions pathologiques comme la MA. En effet, certains métabolites de l'APP dont les β -CTFs et les peptides A β , sont retrouvés accumulés dans le cerveau de patients Alzheimer (Pera *et al.*, 2013). Les fragments β -CTFs sont particulièrement intéressants dans ce cas puisqu'ils sont les premiers à s'accumuler, avant les peptides A β , dans le modèle transgénique murin 3xTgAD (portant les mutations PS1M146V, APP^{swe} et TauP301L) (Lauritzen *et al.*, 2012). Bien que les conséquences précises de cette accumulation sur la progression de la MA ne soient pas complètement élucidées, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la dégradation de l'APP et ses métabolites, notamment les β -CTFs, pourrait éventuellement contribuer au développement de stratégies thérapeutiques qui viseraient à prévenir ces accumulations.

Alternativement à la dégradation des métabolites de l'APP par la γ -sécrétase, le protéasome et les voies endo-lysosomales sont impliqués dans la dégradation de l'APP et des fragments APP-CTFs. D'une part, ces derniers peuvent se retrouver dégradés par les lysosomes puisque l'APP peut rejoindre les compartiments acides à partir de l'appareil de Golgi ou par la voie d'endocytose (Chapitre I-II-1/Figure 2). D'autre part, des études ont montré que l'APP et des APP-CTFs, plus particulièrement le fragment β -CTF, pouvaient être dégradés par le protéasome et que l'inhibition du protéasome entraînait une accumulation de ces derniers (Skovronsky *et al.*, 2000; Nunan *et al.*, 2001, 2003; Kaneko *et al.*, 2010; Jang *et al.*, 2017b). Cependant, ces résultats ont toujours été obtenus de manière indépendante et l'implication mutuelle de chacune de ces voies reste encore à déterminer. Par conséquent, nous avons décidé de consacrer la première partie de notre travail à la comparaison de l'implication du protéasome et des lysosomes dans la dégradation de l'APP et des β -CTFs vis-à-vis de la γ -sécrétase. Pour cela, nous avons étudié les effets de ces trois voies sur le métabolisme de l'APP grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques propres à chacune d'elle avec lesquels nous avons traité

des cellules HEK et des cultures primaires de rat exprimant ou non la forme entière de l'APP (full length APP^{WT}) ou le fragment β -CTF (C99).

II. Résultats

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article suivant, publié le 22 novembre 2018 dans le journal *Frontiers in Cellular Neuroscience* (doi : 10.3389/fncel.2018.00435) :

Contribution of the endosomal-lysosomal and proteasomal systems in Amyloid- β precursor protein derived fragments processing

Caroline Evrard, Pascal Kienlen-Campard, Mathilde Coevoet, Rémi Opsomer, Bernadette Tasiaux, Patricia Melnyk, Jean-Noël Octave, Luc Buée, Nicolas Sergeant[¶], Valérie Vingtdeux[¶]

¹ Université de Lille, Inserm, Centre Hospitalo-Universitaire de Lille, UMR-S1172, Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT, Lille, France

² Alzheimer Research Group, Institute of Neuroscience, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium

***Correspondence:**

Dr. Nicolas Sergeant

nicolas.sergeant@inserm.fr

Dr. Valérie Vingtdeux

valerie.vingtdeux@inserm.fr

[¶]These authors contributed equally to this work

Abstract

A β peptides, the major components of Alzheimer's disease amyloid deposits, are released following sequential cleavages by secretases of its precursor named the amyloid precursor protein (APP). In addition to secretases, degradation pathways, in particular the endosomal/lysosomal and proteasomal systems have been reported to contribute to APP processing. However, the respective role of each of these pathways towards APP metabolism remains to be established. To address this, we used HEK 293 cells and primary neurons expressing full-length wild type APP or the β -secretase-derived C99 fragment (β -CTF) in which degradation pathways were selectively blocked using pharmacological drugs. APP metabolites, including carboxy-terminal fragments (CTFs), soluble APP (sAPP) and A β peptides were studied. In this report, we show that APP-CTFs produced from endogenous or overexpressed full-length APP are mainly processed by γ -secretase and the endosomal/lysosomal pathway, while in sharp contrast, overexpressed C99 is mainly degraded by the proteasome and to a lesser extent by γ -secretase.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid precursor protein, amyloid beta peptide, APP-CTF, C99.

III. Discussion

A travers cette étude, nous avons montré que l'APP et les APP-CTFs endogènes ou issus de la surexpression de la forme entière de l'APP sauvage étaient principalement clivés par la γ -sécrétase ou alors dégradés par la voie endo-lysosomale. Nos résultats, en accord avec les données de la littérature, permettent ainsi de renforcer la pertinence de la voie endo-lysosomale vis-à-vis du protéasome dans le métabolisme de l'APP.

1. Voies de dégradation des formes mutées de l'APP

D'ailleurs, il serait intéressant d'étudier l'implication de ces voies sur des formes mutées de l'APP. En effet, les mutations de l'APP sont connues pour interférer avec les clivages de l'APP d'une part. D'autre part, les processus de dégradation sont également retrouvés altérés dans la MA qu'elle soit d'origine génétique ou sporadique (Colacurcio *et al.*, 2018). Il est possible que des mutations pathogéniques de l'APP altèrent aussi l'adressage et/ou la dégradation de l'APP elle-même ou de ses métabolites. L'implication respective de chacune de ces voies de dégradation pourrait être différente pour les formes mutées de l'APP étant donné que le clivage γ -sécrétase est lui-même déjà altéré par certaines mutations (M. Dai *et al.*, 2018). Cette étude pourrait être envisagée en transfectant de manière stable des cellules HEK avec des vecteurs codant pour l'APP avec la mutation londonienne V717I (la plus fréquente) par exemple. A partir de ce modèle, des expériences similaires à nos travaux pourraient ainsi être conduites pour déterminer si les formes mutées de l'APP suivent les mêmes voies d'adressage et de dégradation que l'APP sauvage. Cela permettrait aussi de mieux comprendre la relation existante entre les mutations et les dérégulations du métabolisme de l'APP, notamment dans le cas de MA d'origine génétique.

2. Intérêt de l'activation de la voie autophagie-lysosome

Nous avons montré la contribution importante de la voie endo-lysosome à la dégradation de l'APP et des APP-CTFs par inhibition de cette voie. Ces résultats suggèrent alors que son activation pourrait réduire l'expression de l'APP et des APP-CTFs ainsi que la production de peptides A β . La voie autophagie-lysosome peut être activée par carence en facteurs nutritionnels ou de croissance dans le milieu cellulaire ou encore par utilisation d'agents activateurs de la voie d'autophagie comme la Rapamycine (inhibiteur de mTOR). D'ailleurs, la rapamycine a déjà fait ses preuves *in vivo* dans des

modèles de souris Alzheimer. En effet, la rapamycine peut réduire *in vivo* la formation de plaques amyloïdes et de dégénérescences neurofibrillaires améliorant les déficits cognitifs (Majumder *et al.*, 2011; Cai and Yan, 2013). Bien qu'elle puisse avoir des effets bénéfiques, certaines études ont rapporté *a contrario* des altérations du métabolisme de l'APP induit par la rapamycine dont une augmentation de la production de peptides A β (Lafay-Chebassier *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). La balance bénéfiques/risques de la rapamycine n'est cependant pas encore bien établie.

Néanmoins, la modulation de cette voie pourrait prévenir l'accumulation des fragments de l'APP et de leurs effets néfastes. En effet, il existe une dysfonction progressive de l'autophagie et des endosomes au cours de la MA qui semble être un facteur fondamental dans la genèse de la pathologie. Elle apparaît interconnectée avec le métabolisme de l'APP puisque la défaillance lysosomale entraîne l'accumulation des fragments de l'APP et que ces mêmes produits, notamment les β -CTFs, impactent négativement les fonctions endosomales et lysosomales (Colacurcio *et al.*, 2018). Des études ont déjà montré l'intérêt de l'activation de cette voie pour réduire la pathologie amyloïde et améliorer les déficits cognitifs *in vivo* (Yang *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2015). De même, la chloroquine (CQ), composé lysomotropique, et des dérivés sont capables d'inhiber la production de peptides A β en agissant sur cette voie (Melnyk, Vingtdoux, Burlet, Eddarkaoui, M.-E. Grosjean, *et al.*, 2015). Cependant, les propriétés alcalinisantes de la CQ conduisent également à l'inhibition des voies de dégradation par les lysosomes, entraînant l'accumulation des APP-CTFs et des AICD (Vingtdoux, Hamdane, Loyens, *et al.*, 2007; González *et al.*, 2017) et la perturbation du flux autophagique (Klionsky *et al.*, 2016). De ce fait, des composés dérivés de CQ qui maintiendraient leurs effets sur les peptides A β sans perturber les fonctions lysosomales et le métabolisme de l'APP seraient plus intéressants. Toutefois, il faudrait que l'effet alcalinisant soit dissociable de l'effet sur la production de peptides A β . Ainsi, la voie endo-lysosomale se positionne comme un cible thérapeutique intéressante pour favoriser la dégradation de l'APP et de ses métabolites.

Partie 2 : Détermination des effets biologiques des MSBD et leurs dérivés sur les processus pathologiques de la MA

Les MSBD sont des composés organiques issus de la collaboration entre les équipes *Alzheimer & Tauopathies* (Dr. Nicolas Sergeant) et *Onco et Neurochimie* (Pr. Patricia Melnyk), présentés dans le chapitre III. Il s'agit de molécules dérivées de la chloroquine et dotées d'un mécanisme d'action original ayant un effet sur les deux composantes de la MA (amyloïde et Tau). Les résultats préliminaires du laboratoire avaient montré que les MSBD diminuaient la production des peptides A β et favorisent la protéolyse de Tau, *in vitro* et *in vivo*, par un mécanisme qui dépendrait de VCP. Par conséquent, l'hypothèse émise fut que l'action des MSBD faisait intervenir une ou plusieurs voies de régulation de l'homéostasie protéique impliquant la protéine VCP et entraînant alors une diminution des peptides A β et des formes phosphorylées de Tau. Alors que des effets de VCP sur la protéine Tau ont déjà été rapportés, il n'existe encore aucune littérature relatant d'une relation directe entre l'APP et VCP ou de l'intervention de VCP dans le métabolisme de l'APP. Pourtant, VCP régule des processus impliqués dans le métabolisme de l'APP tels que l'UPS, l'autophagie, la voie endo-lysosomale, l'endocytose et la fusion vésiculaire par exemple. L'objectif suivant a donc été de définir s'il existait une relation directe entre l'APP et VCP, avant de déterminer si ces molécules pouvaient réguler le métabolisme de l'APP via VCP.

I. Etude du rôle de VCP sur le métabolisme de l'APP

1. Objectifs de l'étude

Nous avons d'abord cherché à comprendre la relation entre l'APP et VCP pour pouvoir comprendre par la suite comment la modulation de VCP par les molécules pourrait affecter le métabolisme de l'APP. Pour cela, nous avons mis au point l'utilisation de siRNA dirigé contre VCP pour réprimer son expression et d'un inhibiteur sélectif et allostérique de l'activité ATPase de VCP : le NMS-873, dans des cellules de neuroblastome humain qui surexpriment l'APP (SY5Y-APP695^{WT}) afin d'étudier les effets de VCP sur le métabolisme de l'APP.

2. Résultats

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article suivant actuellement en préparation. Il s'agit d'une version préliminaire à laquelle d'autres résultats seront ajoutés par la suite pour la soumission.

VCP/p97 regulates APP trafficking and degradation within neuronal cells

Caroline Evrard¹, Luc Buée¹, Nicolas Sergeant^{1¶*}, Valérie Vingtdeux^{1¶*}

¹ Université de Lille, Inserm, Centre Hospitalo-Universitaire de Lille, UMR-S1172, Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT, Lille, France

***Correspondence:**

Dr. Nicolas Sergeant

nicolas.sergeant@inserm.fr

Dr. Valérie Vingtdeux

valerie.vingtdeux@inserm.fr

¶These authors contributed equally to this work

Abstract

Deregulations of the amyloid precursor protein (APP) metabolism are responsible for the generation and accumulation of A β peptides into amyloid plaques, one of the two histopathological lesions of Alzheimer's disease (AD). AD is also characterized by the accumulation of misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and alterations of degradation systems including the proteasome and the autophagy-lysosome pathway. One key actor involved in the regulation of these processes altered in AD is the Valosin-Containing Protein (VCP/p97). Here, we examined the possible contribution of VCP to APP metabolism. Downregulation of VCP expression induced the accumulation of total APP into cells, reduced routing of APP to the cell surface and APP degradation. Our results demonstrated for the first time that VCP is involved in APP metabolism and controls its processing and cellular trafficking, suggesting a role for VCP in APP deregulations observed in AD.

Key words: Alzheimer's disease, amyloid precursor protein, valosin-containing protein, protein homeostasis

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD), the most common form of dementia in elderly people, is a slow and progressive neurodegenerative disorder mainly characterized by protein aggregates inside and outside neurons, dysfunctional organelles, alteration of degradation systems, neuro-inflammation and neuronal loss leading to cognitive decline and memory loss (Bart De Strooper, 2010; Ciechanover and Kwon, 2015; Scheltens *et al.*, 2016). There are two neuropathological lesions found in AD brains: neurofibrillary tangles formed by the intraneuronal accumulation and aggregation of abnormally and hyperphosphorylated Tau proteins; and extracellular amyloid- β ($A\beta$) deposits deriving from the processing of the amyloid precursor protein (APP). APP is a major effector of AD as *APP* mutations are at the origin of familial forms of AD. In addition, imbalance between production and clearance of $A\beta$ peptides in neurons is considered as the initiating factor of AD according to the amyloid hypothesis (Selkoe and Hardy, 2016; Zhu *et al.*, 2017).

$A\beta$ peptides are produced by the amyloidogenic pathway, in which APP is successively cleaved by two enzymes: the β - and the γ -secretases mainly along the endosome-lysosome pathway. APP can also undergo a non-amyloidogenic processing being cleaved at the plasma membrane by the α -secretase within the $A\beta$ sequence, thus precluding $A\beta$ generation.

Subcellular localization and trafficking of APP are critical for its processing as they control APP availability to secretases and $A\beta$ peptides generation (X. Wang *et al.*, 2017). Indeed, APP is a type I transmembrane protein that can be found along secretory, endo-lysosome or recycling pathways. After synthesis, APP trafficking requires maturation through the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus (or trans-Golgi network TNG) before being transported to the cell surface along the secretory pathway (Koo *et al.*, 1990; Groemer *et al.*, 2011). When APP is not cleaved by secretases at the cell surface, it is internalized by endocytosis and addressed to early endosomes where it can be degraded by the endosome-lysosome pathway or recycled back to the cell surface (T Yamazaki, Koo and Selkoe, 1996). APP can also be directly sorted to endosomes or lysosomes from the TGN in an Arf-like small G protein (Arl5b)- and AP-4-dependant pathway or via the adaptor protein 3 (AP-3), respectively (Tam, Seah and Pasternak, 2014; Toh *et al.*, 2017).

However, APP trafficking and processing are found altered in AD along with its degradation processes resulting in the accumulation of APP- β -carboxy terminal fragments (β -CTF) and $A\beta$ peptides. One mechanism explaining these alterations is the deregulation of protein homeostasis and degradation systems including the unfolded-protein response (UPR), autophagy-lysosome pathway and clearance of protein aggregates (Nixon, 2017; Ji *et al.*, 2018). At the crossroads of these processes, the Valosin-

Containing Protein (VCP, also called p97) was reported to be a key regulator of protein homeostasis (Franz, Ackermann and Hoppe, 2014; Xia, Tang and Ye, 2016). VCP is a hexameric AAA-ATPase ubiquitously expressed which, in association with different cofactors, is mainly implicated in ER-associated protein degradation (ERAD), autophagy, membrane fusion, vesicular trafficking and chromatin associated degradation. Briefly, VCP recognizes ubiquitinated proteins and uses ATP hydrolysis to segregate them from organelles, complexes or aggregates to address them for degradation by the proteasome or the autophagy-lysosome pathway. Interestingly, VCP mutations and dysfunctions have been associated with neurodegenerative diseases including inclusion body myopathy (IBM), Paget's disease of the bone (PDB), frontotemporal dementia (FTD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Meyer and Wehl, 2014). While there is no evidence for VCP dysfunctions in AD, lower VCP expression levels have been observed in AD brain cortex (Dolan *et al.*, 2011).

Here, we investigated the involvement of VCP in APP metabolism using neuroblastoma cells expressing the human APP695 isoform.

2. Materials and methods

2.1. Antibodies and reagents

APP-Cter-C17 (1/5,000) is a homemade rabbit antiserum directed against the last 17 amino acids of APP (Sergeant *et al.* 2002; Vingtdeux *et al.* 2007). Anti- β -actin (1/10,000) was obtained from Sigma. Anti-calnexin (1/2,000) and anti-p62/SQSTM1 (1/2,000) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology. Anti-poly-ubiquitinated conjugates (1/1,000) was obtained from Enzo Life Sciences. Anti-VCP (1/5,000) was purchased from Abcam. Secondary antibodies (peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG, 1/5,000 or peroxidase-labeled horse anti-mouse IgG, 1/50,000) were obtained from Vector Laboratories. Secondary antibody peroxidase μ -chain specific produced in goat was purchased from Sigma-Aldrich.

NMS-873, the allosteric and specific VCP ATPase inhibitor was purchased from Sigma-Adlrich and was used at the indicated concentrations. Cycloheximide (CHX) was purchased from Tocris Bioscience.

2.2. Cell culture

The human neuroblastoma cell line SKNSH-SY5Y (SY5Y) stably expressing the human isoform of APP695 (SY5Y-APP^{695WT}) was previously described (Vingtdeux, Hamdane, Bégard, *et al.*, 2007).

Briefly, SY5Y cells stably expressing the APP695 were selected using Geneticin G418 (Invitrogen) and were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, high glucose, pyruvate – GIBCO by Life Technologies) supplemented with 10% foetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM non-essential amino acids and penicillin/streptomycin (GIBCO by Life Technologies) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. SY5Y-APP^{695WT} cells were maintained in 75 cm² culture flasks (T75) (Falcon) with supplemented DMEM medium until they reached 80% of confluence 24 hours (h) before transfection or treatments.

2.3. siRNA transfection

SY5Y-APP^{695WT} cells were maintained in T75 flasks (Falcon) until they reached 80% of confluency 24 h before transfection. They were detached with Trypsin-EDTA, split, counted and plated on 12-well plates (Falcon) at a rate of 3.10⁵ cells per well. The next day, cells were transfected with the ON-TARGETplus Non-targeting Pool (siRNA Negative Control) or the ON-TARGETplus Human VCP (7415) siRNA obtained from Dharmacon at 50nM final using LipofectamineTM RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions in DMEM medium supplemented with 10% foetal bovine serum, 2 mM L-glutamine and 1 mM non-essential amino acids (GIBCO by Life Technologies). After 72 h, transfected cells were treated or directly collected for analysis.

2.4. Drug treatments

Cells were plated at a rate of 5.10⁵ cells per well into 12-well plates (Falcon) and cultured in 1 mL supplemented DMEM cell medium the day before drug exposure. The next day, cell medium was replaced with fresh medium containing drugs diluted at the indicated concentrations and cells were treated as long as indicated times. At the end of treatments, the culture medium was collected and kept at -80°C until use. Cells were rinsed once with phosphate buffered saline (PBS) and extracted in 100 µL of Laemmli buffer (10 mM Tris; 20% glycerol and 2% sodium dodecyl sulfate). Cell lysate was sonicated (30 pulses of 0.5 s, 60 Hz) for 5 minutes (min). Total protein concentration was determined using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific) according to the manufacturer's instructions. Samples were stored at -80°C until analysis.

2.5. Cell surface biotinylation

SY5Y-APP^{695WT} cells were plated at a rate of 59.10^5 cells into 100 mm dishes and cultured with 10 mL supplemented DMEM cell medium 24 h before siRNA transfection or at a rate of 98.10^5 cells before drug exposure. At the end of treatments, cell surface proteins were biotinylated using Sulfo-NHS-SS-Biotin, as recommended by the manufacturer using the Pierce Cell Surface Protein Isolation Kit (Thermo Scientific). Briefly, cells were incubated for 30 min at 4°C with Sulfo-NHS-SS-Biotin on a rocking platform. Cells were lysed and labelled proteins were isolated with NeutrAvidin agarose beads. Precipitated proteins were eluted from the beads with NuPAGE® lithium dodecyl sulfate (LDS) 2X sample buffer and 50 mM dithiothreitol, heated for 5 min at 95°C and analysed by western-blot.

2.6. Co-immunoprecipitation assays

SY5Y-APP^{695WT} cells from 1 T75 flask were washed with PBS and re-suspended in ice-cold lysis buffer (10 mM HEPES pH 7.4; 140 mM NaCl; 0.5% NP-40; 1 tablet of complete protease inhibitor cocktail, Roche). After centrifugation at 16,000 g for 10 min at 4°C, cell lysates were precleared with PierceTM protein A/G Plus agarose (Thermo Scientific) for 2 h at 4°C on a rocking platform. At the end of incubation, cell lysates were centrifuged for 30 seconds (s) at 1,500 g to remove beads. Total protein concentration was determined using the Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific) according to the manufacturer's instructions. 1 mg of total proteins were incubated overnight at 4°C on a rocking platform with the indicated antibodies. The following day, antibodies were precipitated by incubation with protein A/G for 2 h at 4°C. Precipitates were washed three times with lysis buffer and re-suspended in 80 µL loading buffer (NuPAGE® lithium dodecyl sulfate (LDS) 2X sample buffer supplemented with 20% NuPAGE® sample reducing agents (Invitrogen)) before western-blot analysis.

2.7. Immunofluorescence

SY5Y-APP^{695WT} cells were plated at 3.10^5 cells per well on poly-D- lysine coated glass coverslip with 1 mL of DMEM supplemented medium. The following day, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS during 15 min and rinsed 3 times with PBS. Then, cells were permeabilized using 0.25% Triton X-100 during 15 min and rinsed with PBS 3 times before blocking in 1% BSA in PBS for 1 h. After 3 washes with PBS, cells were incubated with primary antibodies directed against APP-Cter-C17 (1/1,000) and VCP (1/500) at 4 °C overnight in a PBS solution containing 1% BSA and 0.02% Triton X-100. The next day, coveslips were rinsed with PBS and incubated with anti-IgG

secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 488 and 568 (1/500) (Invitrogen). Nuclei were visualized using DAPI (Thermo Scientific). Images were acquired on a Zeiss Axio Imager Z2 microscope (Carl Zeiss, Germany) equipped with a Hamamatsu ORCA-Flash4.0 digital camera (Hamamatsu Photonics, Japan) and ApoTome.2 system (Carl Zeiss, Germany). For Apotome image acquisition, the Axio Imager was used with optical plan-apochromat 63x/1.4 oil M27.

2.8. Western-blot analysis

Cell protein samples were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes as described previously (Evrard *et al.*, 2018). Membranes were probed with the antibodies listed above and revealed by enhanced chemiluminescence detection. Image acquisitions were performed with the Amersham Imager 600 (G&E Healthcare). Quantifications of protein expression levels were performed with ImageJ Software (NIH).

2.9. Quantification of A β _{1-40/1-42} by ELISA

Conditioned media of SY5Y-APP^{695WT} collected at the end of treatments were centrifuged at 1000 g for 5 min to eliminate cells debris. A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ peptide concentrations in pg/mL were determined using amyloid-beta 40 and 42 Human ELISA kits (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions after 1:10 and 1:2 dilution of supernatants in ELISA buffer, respectively.

2.10. Statistical Analysis

Significant differences among results were determined using the unpaired *t*-test on GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) and statistical significance was set at **p*<0.05, ***p*<0.001, ****p*<0.001 and *****p*<0,0001. All data are presented as mean \pm SEM.

3. Results

3.1. VCP is involved in APP maturation and processing

Because VCP levels have been shown to be reduced in AD brains (Dolan *et al.*, 2011), we first evaluated the effects of VCP silencing on APP and its metabolites produced from the amyloidogenic and the non-amyloidogenic pathways. We transfected four small interfering RNA (siRNA) directed against VCP as a pool into SY5Y cells stably expressing the human wild-type APP695 (SY5Y-

APP^{695WT}) and we analysed the effect of VCP silencing after 72h hours (Figure 1). Following VCP silencing, VCP expression was reduced by 75% compared to VCP endogenous expression. In addition, VCP silencing led to the accumulation of poly-ubiquitinated proteins and of the autophagy marker p62 as expected (Figure 1A and 1B). Indeed, VCP silencing is characterized by a strong stabilisation of VCP client proteins which are mainly poly-ubiquitinated proteins, and by an alteration of autophagy (Magnaghi *et al.*, 2013). Next, we analysed the effects of VCP downregulation on APP maturation and processing.

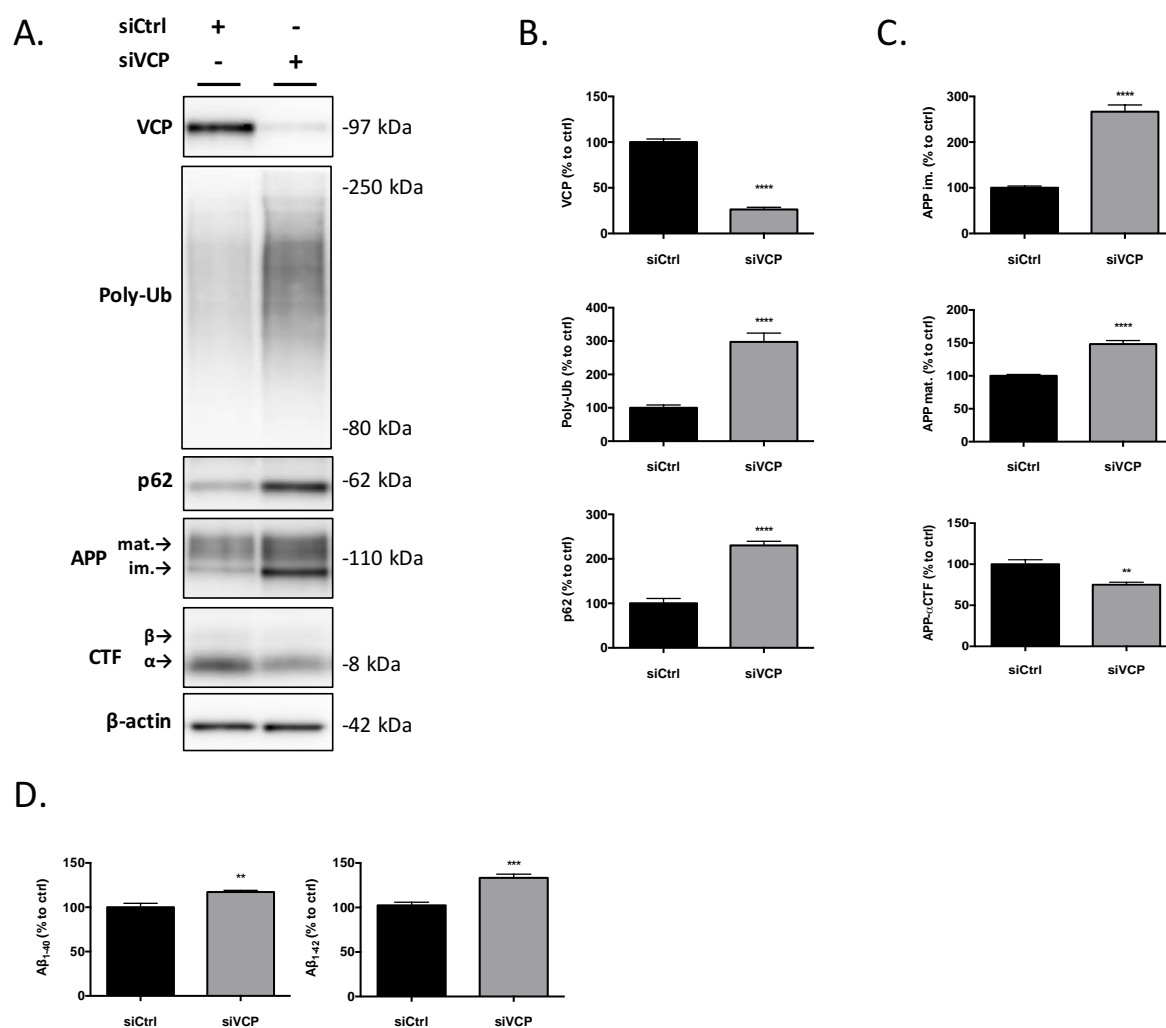


Figure 1: Effect of VCP siRNA on APP metabolism in SY5Y-APP^{695WT} cells. SY5Y-APP^{695WT} cells were transfected with negative control siRNA (siCtrl) or with VCP siRNA (siVCP) for 72h. Cell lysates were immunolabeled with antibodies targeting VCP, Poly-ubiquitinated proteins (Poly-Ub), p62, APP-Cter-C17 and β-actin as loading control (A). Densitometric analysis and quantification of VCP, Poly-Ub proteins, p62, immature and mature APP levels and APP α-carboxy-terminal fragments (B and C). Conditioned medium was analysed by ELISA to measure secreted Aβ₁₋₄₀ and Aβ₁₋₄₂ peptides (D). Histograms indicate the mean ± SD. n=6 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.001 Unpaired *t*-test.

First, we assessed the impact of VCP silencing on full-length APP protein. Full-length APP can be detected as two bands at 110 kDa and 115 kDa corresponding to the neosynthesized or immature form and the glycosylated mature form of APP respectively. VCP silencing resulted in a significant increase of both immature and mature APP levels when compared to control conditions (Figure 1A and 1C). Full-length APP can be further cleaved by the α - or β -secretase and the γ -secretase to generate soluble APP and APP-carboxy-terminal fragments (α CTF/C83 or β CTF/C99), which then release APP intracellular domain (AICD) and p3 or A β peptide. VCP silencing led to an important decrease of APP-CTFs (Figure 1A). Indeed, α CTFs expression was reduced by 25% (Figure 1C). While β CTFs cannot be quantified in control and siVCP transfected conditions, we observed a similar reduction of β CTFs following VCP silencing compared to control condition by western blot analysis (Figure 1A). However, AICD and p3 were not detected in both conditions. Secretion of A β ₁₋₄₀ and A β ₁₁₋₄₂ peptides was measured by ELISA. Both A β ₁₋₄₀ and A β ₁₁₋₄₂ peptides secretion in culture medium were increased by 17% and 33% respectively, following VCP silencing compared to control condition (Figure 1D). These results demonstrated that both the amyloidogenic and the non-amyloidogenic pathway were affected by VCP silencing in SY5Y-APP^{695WT}. However, the increase of A β peptides secretion suggested that γ -secretase cleavage or activity was up regulated by VCP silencing.

To confirm the effect of VCP silencing on APP metabolism, we next inhibited VCP ATPase activity using increasing concentration of NMS-873, the most potent allosteric and specific VCP ATPase inhibitor described to date (Magnaghi *et al.*, 2013). VCP inhibition was validated by the progressive accumulation of poly-ubiquitinated proteins and p62, in agreement with literature, following increasing concentration of NMS-873 for 24 h (Figure 2A and 2B). VCP inhibition did not impact VCP expression (data not shown) as previously described (Her *et al.*, 2016).

Then, we studied the effect of VCP inhibition on APP metabolism. As observed with VCP silencing, VCP inhibition using NMS-873 increased both immature and mature APP levels in a concentration-dependant manner ranging from 0,5 to 1,5 μ M. In the same time, NMS-873 also induced a slow but significant decrease of APP-CTFs from 0,5 μ M. Indeed, α CTFs were reduced from 15 to 20% by NMS-873 treatment (Figure 2A and 2C). VCP inhibition induced an increase of both A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ peptides secretion in culture medium (Figure 2D) as observed previously with VCP silencing. A β ₁₋₄₀ secretion was increased from 20 to 60% and A β ₁₋₄₂ secretion was increased from 16 to 40% with increasing concentration of NMS-873. These data obtained with VCP inhibition by NMS-873 demonstrated the same effects on APP metabolism as VCP silencing by siRNA, confirming the effects of VCP alterations on APP and its metabolites.

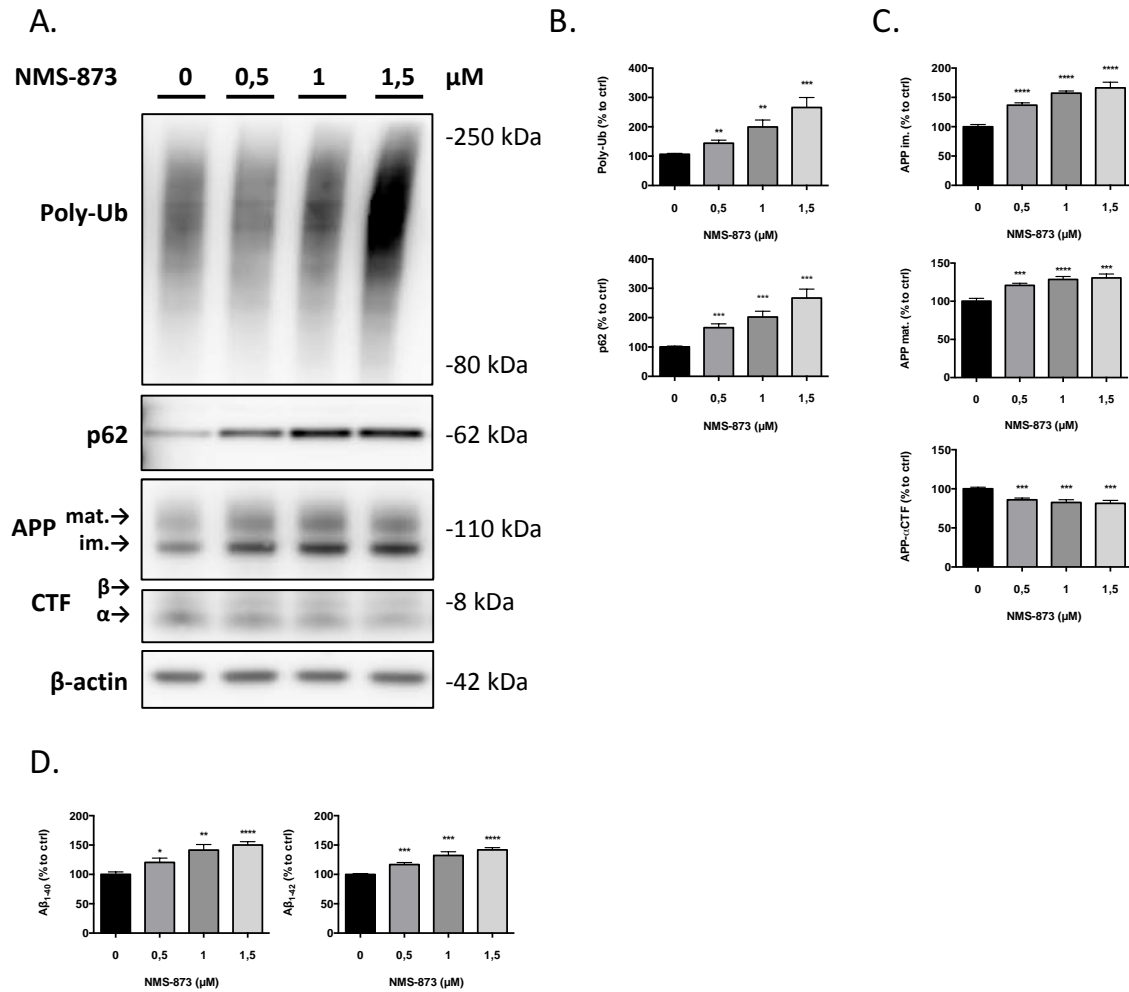


Figure 2: Effect of VCP ATPase activity inhibition by NMS-873 on APP metabolism in SY5Y-APP^{695WT} cells. SY5Y-APP_{wt} cells were treated for 24h with increasing concentrations of the allosteric VCP ATPase inhibitor: NMS-873 as indicated. Cell lysates were immunolabeled with the following antibodies: Poly-ubiquitinated proteins (Poly-Ub), p62, APP-Cter-C17 and β-actin as loading control (A). Densitometric analysis and quantification of VCP, Poly-Ub proteins, p62, immature and mature APP levels and APP α-carboxy-terminal fragments (B and C). Conditioned medium was analysed by ELISA to measure secreted Aβ₁₋₄₀ and Aβ₁₋₄₂ peptides (D). Histograms indicate the mean ± SD. n=6 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.001 Unpaired *t*-test.

Altogether, these results demonstrated VCP involvement in APP metabolism and suggested that VCP could interfere with APP processing by secretases.

3.2. Downregulation of VCP delays APP degradation

To go further into the understanding of VCP implication in APP metabolism, we studied the effect of VCP silencing on APP degradation fate. Indeed, VCP silencing and inhibition demonstrated an accumulation of both immature and mature APP suggesting that APP degradation may be altered in

these conditions. The rate of APP turnover was assessed by treating SY5Y-APP^{695WT} cells with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) for different durations. APP expression was analyzed at the indicated times to follow its degradation fate as APP was no longer synthesized following CHX treatment. We observed a rapid turnover of APP in control cells. Indeed, APP expression started to decrease from 15 min CHX treatment and was almost abolished after 3 h CHX treatment in control conditions (Figure 3A). Whereas APP turnover was significantly slowed down by VCP silencing as APP was still expressed at 3 h CHX treatment (Figure 3A). VCP silencing increased immature APP half-life by 50% (Figure 3B). While there is no significant difference for mature APP half-life between control and siVCP transfected cells, mature APP degradation appeared to be slow down between 30 min and 1 h of CHX treatment (Figure 3B).

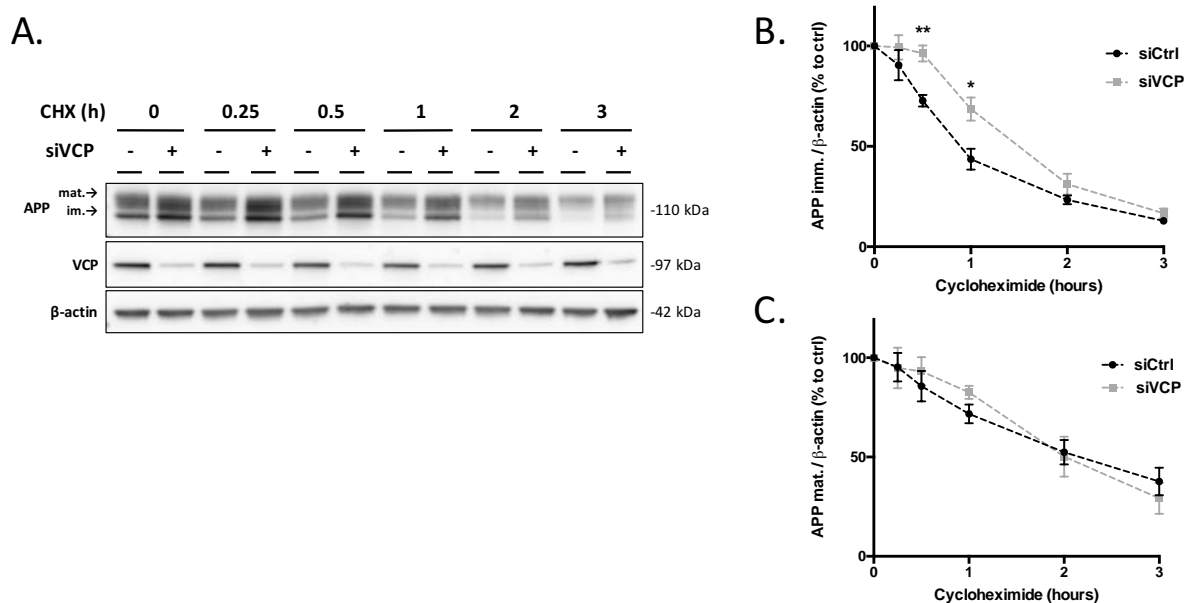


Figure 3: VCP siRNA decreases APP degradation in SY5Y-APP^{695WT} cells. SY5Y-APP^{695WT} cells were transfected with negative control siRNA (-) or with VCP siRNA (+) for 72h and then, treated with 40μg/mL of cycloheximide (CHX) for the indicated times. Cell lysates were immunolabeled with the following antibodies: APP-Cter-C17, VCP and β-actin as loading control (A). Densitometric analysis and quantification of immature and mature APP levels (B and C). Graph indicate the mean ± SD. n=4 *p<0.05, **p<0.01 Unpaired *t*-test

These results showed that VCP silencing increased the stability of immature APP and delayed APP turnover suggesting that VCP might play a role in APP maturation and/or degradation processes.

3.3. VCP regulates APP trafficking to the cell surface

Our previous results demonstrated that VCP silencing induced an accumulation of immature and mature APP and decreased APP cleavages by the non-amyloidogenic pathway. Altogether, these data

suggest that APP trafficking to the cell surface, which mainly occurs at the plasma membrane, might be altered. Therefore, we next performed extracellular biotinylation experiments in SY5Y-APP^{695WT} cells to evaluate APP trafficking to the cell surface.

Results showed that both immature and mature APP were found biotinylated at the cell surface in control cells (Figure 4A). VCP silencing induced a strong and significant decrease of APP levels at the cell surface (Figure 4B). While there was an accumulation of total APP levels induced by VCP downregulation as observed previously (flow-through Figure 4A), APP expression at the cell surface was reduced by 34% in transfected cells.

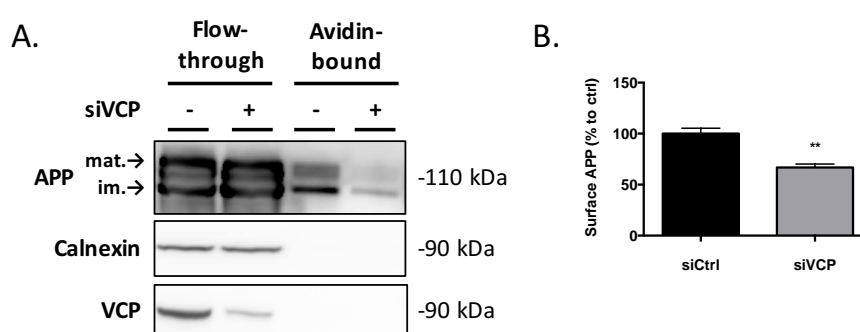


Figure 4: VCP siRNA reduces cell surface APP levels in SY5Y-APP^{695WT} cells. SY5Y-APP^{695WT} cells were transfected with negative control siRNA (-) or with VCP siRNA (+) for 72h. Cell-surface proteins were biotinylated and precipitated with immobilized avidin. Flow through and avidin bound proteins were detected by western-blot using antibodies directed against APP-Cter-C17, VCP and calnexin (cytosol marker) (A). Densitometric analysis and quantification of total APP levels (B). Graph indicate the mean \pm SD. n=4 *p<0.05, **p<0.01 Unpaired *t*-test

These results showed that VCP silencing decreased cell surface levels of APP and suggested that VCP can regulate APP trafficking within cells.

3.4. VCP interacts with APP

To gain further insights into the relationships between VCP and APP metabolism, we asked whether VCP can interact with APP or form a complex with APP inside cells. First, subcellular localization of APP and VCP was assessed in SY5Y-APP^{695WT} cells. Immunofluorescence staining showed co-localization between APP and VCP (Figure 5A). Indeed, APP and VCP staining seemed to co-localized at some points in the cytosol. Then, to validate that APP and VCP form a complex, we performed immunoprecipitation in SY5Y-APP^{695WT} cells extracts with an antibody directed against the C-terminal region of APP. Our results demonstrated that VCP co-immunoprecipitated with APP in

SY5Y-APP^{695WT} cells compared to our irrelevant immunoglobulin (IP IR) in which, no protein was retained (Figure 4B). Altogether, these data demonstrated that VCP and APP can form a complex within cells.

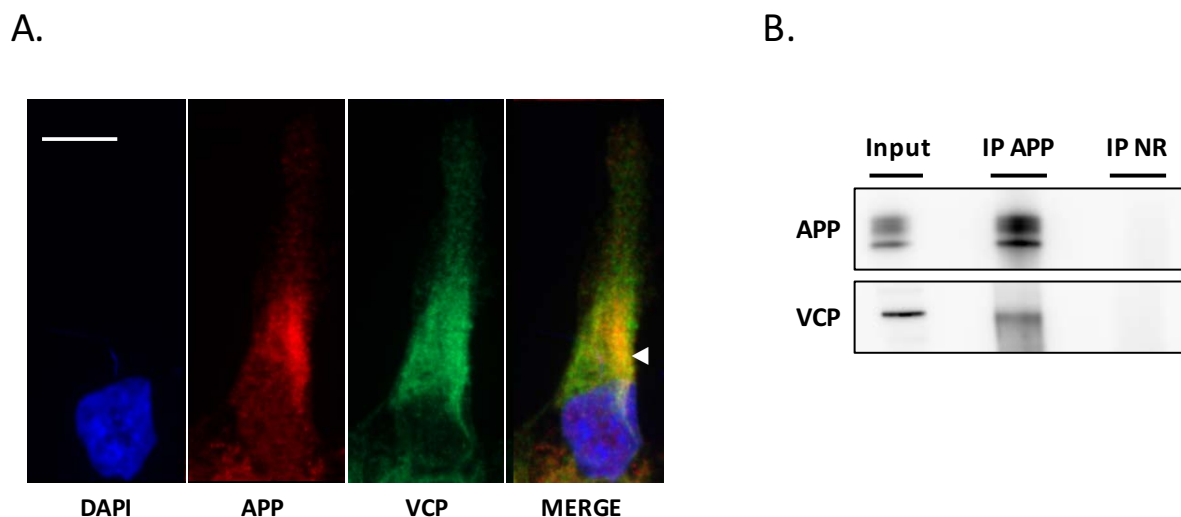


Figure 5: VCP interacts with APP in SY5Y-APP^{695WT} cells. Immunofluorescence staining of APP (red) and VCP (green) in SY5Y-APP^{695WT} cells (A). Scale bar = 20 μ M. Total extracts from SY5Y-APP^{695WT} cells (input) and precipitated proteins were analysed by western-blot using antibodies targeting APP-Cter-C17, VCP and an irrelevant immunoglobulin (NR) as control (B).

4. Discussion

Understanding APP metabolism is an important stake to prevent its deregulation and the accumulation of its toxic metabolites such as A β peptides or APP β -CTFs that are involved in the pathogenesis of AD (Lauritzen *et al.*, 2012; Reiss *et al.*, 2018). Importantly, the investigation of APP trafficking and maturation is of importance as they both influence APP processing by secretases. Indeed, deregulations of APP trafficking and sorting within cells are associated with changes in APP metabolism by modifying its processing by secretases and its degradation (Lee *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2014; Joshi and Wang, 2015; X. Wang *et al.*, 2017). Here, we report for the first time the involvement of VCP in the regulation of APP trafficking and processing. As VCP is known to regulate protein homeostasis through the regulation of autophagy, endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD), membrane fusion, endocytosis (Stach and Freemont, 2017) and as APP processing requires these different processes in which VCP is found, we wondered whether VCP could impact APP metabolism or not. Indeed, VCP may be involved in APP processing since VCP has been demonstrated to take part in the degradation of overexpressed β -CTF (C99) through the ERAD (Jang *et al.*, 2017a) and VCP has been found to interact with the γ -secretase (Wakabayashi *et al.*, 2009).

In this work, we have demonstrated that VCP silencing and VCP ATPase inhibition was associated with an alteration of APP processing in neuroblastoma cells. VCP downregulation induced an accumulation of immature and mature APP isoforms and a decrease of APP-CTFs suggesting that APP cleavages, notably by α - or β -secretase, and/or APP degradation must be altered. Thus, we studied APP degradation fate and our results showed that APP silencing delayed APP degradation suggesting that VCP is involved in APP degradation processes. As VCP regulates both unfolded protein response and autophagy-lysosome pathway, VCP could take part in APP degradation by these processes. VCP involvement in APP degradation will need further investigations. We have previously reported that γ -secretase and the endosome/lysosome pathway are the main degradation routes for both APP and APP-CTFs (Evrard *et al.*, 2018). It could be speculated that VCP can play a role in sorting APP to endosomes or lysosomes for degradation, facilitating APP degradation by lysosomes.

However, VCP silencing was also associated with an increase in A β peptides secretion suggesting an increase of APP-CTFs processing by γ -secretase. Interestingly, γ -secretase has been demonstrated to form a complex with VCP (Wakabayashi *et al.*, 2009) and according to VCP main functions, it could be suggested that γ -secretase may be targeted by VCP for degradation. Thus, following this assumption, VCP silencing may decrease γ -secretase degradation which could result in an increase of γ -secretase cleavage of APP-CTFs. Further work will be required to assess the effects of VCP downregulation on γ -secretase expression and activity to validate this hypothesis. We may suggest that decrease of APP-CTFs induced by VCP silencing may result from both the decrease of APP degradation/processing and the increase of γ -secretase cleavage.

Moreover, we demonstrated that VCP silencing reduced APP sorting to the cell surface suggesting that VCP regulates APP trafficking within cells. APP sorting to the cell surface is required for APP functions at the plasma membrane but also for its processing by secretases. As VCP is involved in maturation processes in the ER/Golgi (i.e quality control via ERAD) and membrane fusion (Huang, Tang and Wang, 2016; Stach and Freemont, 2017), VCP may interfere with APP along the secretory pathway. In this case, the precise location of APP/VCP interaction and regulation might provide insight to improve the understanding of VCP involvement in APP metabolism.

Finally, we have shown that APP and VCP can co-localized and can be co-immunoprecipitated together in SY5Y-APP^{695WT} cells. While APP and VCP interaction is not fully characterised yet, our results demonstrated that they were able to form a complex. Following the demonstration of VCP and APP co-immunoprecipitation, it would be interesting to determine if this is a direct or an indirect interaction between these two proteins. It is possible that VCP can directly recognized and interact

with APP or that they form a complex using an intermediate which would remain to determine. Indeed, APP and VCP share common partners like Hrd1 (Kaneko *et al.*, 2010; Ballar, Pabuccuoglu and Kose, 2011) or the γ -secretase (Gu *et al.*, 2001; Wakabayashi *et al.*, 2009) for example.

In summary, this study demonstrated that VCP represents a new protein involved in APP metabolism. We found that VCP can interact with APP and control its processing and trafficking in neuroblastoma cells. Indeed, VCP downregulation reduced both APP processing, cell surface sorting and degradation. While the interaction between VCP and APP it not fully understood, it is the first demonstration of VCP involvement in APP metabolism. This work brings new insights into APP metabolism and VCP functions and suggests that VCP could represent a new potent target to regulate APP dysfunctions.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

This work was supported by the ANR VIDALZ (ANR-15-CE18-0002) and the Labex DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary Approach to Alzheimer's disease). Caroline Evrard holds a doctoral scholarship from Lille 2 University

References

- Ballar, P., Pabuccuoglu, A., and Kose, F. A. (2011). Different p97/VCP complexes function in retrotranslocation step of mammalian Er-associated degradation (ERAD). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 613–621. doi:10.1016/j.biocel.2010.12.021.
- Ciechanover, A., and Kwon, Y. T. (2015). Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp. Mol. Med.* 47, e147. doi:10.1038/emmm.2014.117.
- De Strooper, B. (2010). Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol. Rev.* 90, 465–494. doi:10.1152/physrev.00023.2009.
- Dolan, P. J., Jin, Y. N., Hwang, W., and Johnson, G. V. W. (2011). Decreases in valosin-containing protein result in increased levels of tau phosphorylated at Ser262/356. *FEBS Lett.* 585, 3424–3429. doi:10.1016/j.febslet.2011.09.032.
- Evrard, C., Kienlen-Campard, P., Opsomer, R., Tasiaux, B., Octave, J.-N., Buée, L., et al. (2018). Contribution of the endosomal-lysosomal and proteasomal systems in Amyloid- β Precursor Protein derived fragments processing. doi:https://doi.org/10.1101/300921.
- Franz, A., Ackermann, L., and Hoppe, T. (2014). Create and preserve: Proteostasis in development and aging is governed by Cdc48/p97/VCP. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843, 205–215.

doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.031.

Groemer, T. W., Thiel, C. S., Holt, M., Riedel, D., Hua, Y., Hüve, J., et al. (2011). Amyloid precursor protein is trafficked and secreted via synaptic vesicles. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0018754.

Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., and Ihara, Y. (2001). Distinct Intramembrane Cleavage of the β -Amyloid Precursor Protein Family Resembling γ -Secretase-like Cleavage of Notch. *J. Biol. Chem.* 276, 35235–35238. doi:10.1074/jbc.C100357200.

Her, N. G., Toth, J. I., Ma, C. T., Wei, Y., Motamedchaboki, K., Sergienko, E., et al. (2016). p97 Composition Changes Caused by Allosteric Inhibition Are Suppressed by an On-Target Mechanism that Increases the Enzyme's ATPase Activity. *Cell Chem. Biol.* 23, 517–528. doi:10.1016/j.chembiol.2016.03.012.

Jang, J. K., Park, K. J., Lee, J. H., Ko, K. Y., Kang, S., and Kim, I. Y. (2017). Selenoprotein S is required for clearance of C99 through endoplasmic reticulum-associated degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 486, 444–450. doi:10.1016/j.bbrc.2017.03.060.

Ji, X. R., Cheng, K. C., Chen, Y. R., Lin, T. Y., Cheung, C. H. A., Wu, C. L., et al. (2018). Dysfunction of different cellular degradation pathways contributes to specific β -amyloid42-induced pathologies. *FASEB J.* 32, 1375–1387. doi:10.1096/fj.201700199RR.

Joshi, G., and Wang, Y. (2015). Golgi defects enhance APP amyloidogenic processing in Alzheimer's disease. *BioEssays* 37, 240–247. doi:10.1002/bies.201400116.

Kaneko, M., Koike, H., Saito, R., Kitamura, Y., Okuma, Y., and Nomura, Y. (2010). Loss of HRD1-Mediated Protein Degradation Causes Amyloid Precursor Protein Accumulation and Amyloid-Generation. *J. Neurosci.* 30, 3924–3932. doi:10.1523/JNEUROSCI.2422-09.2010.

Koo, E. H., Sisodia, S. S., Archer, D. R., Martin, L. ., Weidemann, A., Beyreuther, K., et al. (1990). Precursor of Amyloid Protein in Alzheimer Disease Undergoes Fast Anterograde Axonal Transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 1561–1565. doi:10.1073/pnas.87.4.1561.

Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bauer, C., Brigham, E., Abraham, J.-D., Ranaldi, S., et al. (2012). The γ -Secretase-Derived C-Terminal Fragment of APP, C99, But Not A, Is a Key Contributor to Early Intraneuronal Lesions in Triple-Transgenic Mouse Hippocampus. *J. Neurosci.* 32, 16243–16255. doi:10.1523/JNEUROSCI.2775-12.2012.

Lee, M. S., Kao, S. C., Lemere, C. A., Xia, W., Tseng, H. C., Zhou, Y., et al. (2003). APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *J. Cell Biol.* 163, 83–95. doi:10.1083/jcb.200301115.

Magnaghi, P., D'Alessio, R., Valsasina, B., Avanzi, N., Rizzi, S., Asa, D., et al. (2013). Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death. *Nat. Chem. Biol.* 9, 548–56. doi:10.1038/nchembio.1313.

Meyer, H., and Weihl, C. C. (2014). The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis. *J. Cell Sci.*, 1–7. doi:10.1242/jcs.093831.

Nixon, R. A. (2017). Amyloid precursor protein & endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: Inseparable partners in a multifactorial disease. *FASEB J.* 31, 2729–2743. doi:10.1096/fj.201700359.

Reiss, A. B., Arain, H. A., Stecker, M. M., Siegart, N. M., and Kasselmann, L. J. (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease.

Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S., et al. (2016). Alzheimer's disease. *Lancet* 388, 505–517. doi:10.1016/S0140-6736(15)01124-1.

- Selkoe, D. J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* 8, 595–608. doi:10.15252/emmm.201606210.
- Stach, L., and Freemont, P. S. (2017). The AAA+ ATPase p97, a cellular multitool. *Biochem. J.* 474, 2953–2976. doi:10.1042/BCJ20160783.
- Tam, J. H. K., Seah, C., and Pasternak, S. H. (2014). The Amyloid Precursor Protein is rapidly transported from the Golgi apparatus to the lysosome and where it is processed into beta-amyloid. *Mol. Brain* 7, 54. doi:10.1186/s13041-014-0054-1.
- Toh, W. H., Tan, J. Z. A., Zulkefli, K. L., Houghton, F. J., and Gleeson, P. A. (2017). Amyloid precursor protein traffics from the Golgi directly to early endosomes in an Arl5b- and AP4-dependent pathway. *Traffic* 18, 159–175. doi:10.1111/tra.12465.
- Vingtdeux, V., Hamdane, M., Bégard, S., Loyens, A., Delacourte, A., Beauvillain, J. C., et al. (2007). Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation. *Neurobiol. Dis.* 25, 686–696. doi:10.1016/j.nbd.2006.09.019.
- Wakabayashi, T., Craessaerts, K., Bammens, L., Bentahir, M., Borgions, F., Herdewijn, P., et al. (2009). Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains. *Nat. Cell Biol.* 11, 1340–1346. doi:10.1038/ncb1978.
- Wang, X., Huang, T., Bu, G., and Xu, H. (2014). Dysregulation of protein trafficking in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 9, 31. doi:10.1186/1750-1326-9-31.
- Wang, X., Zhou, X., Li, G., Zhang, Y., Wu, Y., and Song, W. (2017). Modifications and Trafficking of APP in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 294. doi:10.3389/fnmol.2017.00294.
- Xia, D., Tang, W. K., and Ye, Y. (2016). Structure and function of the AAA+ ATPase p97/Cdc48p. *Gene* 583, 64–77. doi:10.1016/j.gene.2016.02.042.
- Yamazaki, T., Koo, E. H. and, and Selkoe, D. J. (1996). Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 5, 999–1008. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8743946>.
- Zhu, J.-B., Tan, C.-C., Tan, L., and Yu, J.-T. (2017). State of Play in Alzheimer's Disease Genetics. *J. Alzheimer's Dis.* 58, 631–659. doi:10.3233/JAD-170062.

3. Discussion

La localisation de l'APP est un facteur crucial pour son devenir intracellulaire et influence particulièrement ses clivages par les sécrétases. Ces travaux préliminaires ont permis de montrer que VCP intervenait dans le métabolisme de l'APP et semblent suggérer que cette protéine régulerait notamment son trafic intracellulaire. Il s'agit à ce jour des premières données décrivant la relation existante entre les protéines VCP et APP.

3.1. Interaction VCP/APP

D'une part, nous avons montré que l'APP et VCP pouvaient être immunoprécipitées ensemble. Il serait alors intéressant de déterminer s'il s'agit d'une interaction directe ou non entre ces deux protéines. En effet, l'APP et VCP possèdent des partenaires communs tels que Hrd1 par exemple (Gauss, Sommer and Jarosch, 2006; Kaneko *et al.*, 2010). Il se pourrait que VCP interagisse directement avec l'APP ou alors que VCP joue un rôle d'intermédiaire entre l'APP et une autre protéine. Il existe des méthodes comme la fluorescence *bi-complementation* (BiFC) ou la *proximity ligation assay* (PLA) par exemple, qui permettent de mettre en évidence des interactions protéiques. La BiFC est basée sur la formation d'un complexe fluorescent lorsque deux protéines fusionnées à des fragments non fluorescents interagissent entre elles (Kerppola, 2008). La PLA utilise une paire d'anticorps associés chacun à un brin d'ADN se liant à proximité immédiate (à une distance de 30 à 40 nm) à différents épitopes de la même protéine ou de deux protéines dans un complexe. La liaison des brins d'ADN permet la formation d'une boucle d'ADN dont la synthèse peut être amplifiée lorsque des substrats et des enzymes appropriés sont ajoutés. Enfin, des sondes oligonucléotidiques complémentaires marquées par fluorescence sont ajoutées et elles se lient à l'ADN amplifié afin de détecter la liaison d'intérêt (Fredriksson *et al.*, 2002). Ainsi, l'utilisation de ces méthodes permettraient de déterminer si l'interaction entre VCP et l'APP *in cellulo* est directe ou non mais également de localiser la formation de ce complexe dans la cellule.

Bien que nous ayons validé l'interaction entre l'APP et VCP, il reste encore à déterminer par quel fragment ou motif ces protéines interagissent entre elles. En effet, VCP est capable d'interagir avec des cofacteurs par ses domaines N-ter et C-ter. De même, l'APP possède plusieurs domaines et la caractérisation du fragment interagissant avec VCP permettrait de déterminer comment VCP intervient dans le métabolisme de l'APP mais également si VCP peut également interagir avec ces métabolites. En effet, si VCP interagit avec la queue C-ter de l'APP, VCP pourrait se lier sur le motif YENPTY et jouer un rôle dans l'internalisation de l'APP. Aussi, VCP pourrait reconnaître des sites

précis comme la thréonine 668, dont la phosphorylation régule les clivages de l'APP et des APP-CTFs (Vingtdeux *et al.*, 2005) et ainsi VCP interviendrait dans la régulation des clivages de l'APP. Notre hypothèse actuelle est que VCP interagit avec l'APP au niveau de son domaine C-ter puisqu'il s'agit de son domaine cytosolique et que VCP est une protéine principalement cytosolique. Cette étude pourrait s'effectuer par l'utilisation de constructions plasmidiques de nos deux protéines délétées de certaines régions ou de sites spécifiques : N-ter ou C-ter pour VCP et C-ter, pour l'APP. La perte des domaines de liaison respectifs permettra d'établir les sites nécessaires à leur interaction et également de mieux la caractériser.

3.2. VCP et le métabolisme de l'APP

D'autre part, nous avons montré qu'en l'absence de VCP, le transport de l'APP à la surface cellulaire était diminué et que sa dégradation était par la même occasion retardée. Nos résultats suggèrent que VCP est impliquée dans le trafic intracellulaire de l'APP ainsi que dans ses processus de dégradation. Il faudrait alors déterminer quel est le rôle exact de VCP dans le métabolisme de l'APP. En effet, plusieurs hypothèses peuvent être émises : VCP pourrait jouer un rôle dans la maturation de l'APP au niveau du RE/Golgi, VCP pourrait favoriser l'adressage de l'APP vers un compartiment plutôt qu'un autre (surface cellulaire versus endosomes) ou VCP pourrait encore favoriser la dégradation de l'APP. L'implication exacte de VCP dans le métabolisme de l'APP pourrait être élucidée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques en co-traitement avec la répression de VCP. En effet, la comparaison des effets du siRNA seul face à des co-traitements devraient montrer des effets additifs ou non en fonction du rôle de VCP. A savoir que nous avons étudié l'effet de la surexpression de VCP grâce à la transfection de constructions plasmidiques (VCP sauvage et VCP mutée R155H) dans les SY5Y-APP695^{WT}. Cependant, ces expériences n'ont pas permis de montrer des effets de la surexpression de VCP sauvage ou mutée dans notre modèle cellulaire. Nous avons également étudié les effets de la surexpression de VCP sauvage ou mutée avec des inhibiteurs du transport RE-Golgi (Brefeldine A), du protéasome (MG132) ou encore de la voie endo-lysosome (Bafilomycine). Nous pensions que la surexpression de VCP aurait pu avoir l'effet contraire aux inhibiteurs ou qu'elle aurait pu compenser les défauts induits sur le métabolisme de l'APP par les inhibiteurs. Néanmoins, nous n'avons pas observé d'effet de la surexpression de VCP seule ou en co-traitement. Ainsi, des expériences d'inhibitions après répression de l'expression de VCP pourraient être envisagées dans notre modèle puisque cela a déjà été mise au point.

Alors que nos modèles de surexpression de VCP n'ont pas permis d'apporter des éléments de réponse concernant les effets de la mutation R155H sur le métabolisme de l'APP, il apparaîtrait intéressant d'étudier directement le métabolisme de l'APP dans des cerveaux de patients portant une mutation de VCP. En effet, l'analyse post-mortem de tissus humains et notamment de coupes cérébrales serait pertinente pour la démonstration de l'effet des mutations de VCP sur le métabolisme de l'APP.

La compréhension du rôle de VCP dans le métabolisme de l'APP pourrait permettre de faire un lien entre les dérégulations du métabolisme de l'APP et de l'homéostasie cellulaire retrouvées dans la MA. En effet, les taux de VCP sont diminués dans les cerveaux de patients Alzheimer (Dolan *et al.*, 2011) et nous avons montré dans cette étude que la répression de l'expression de VCP altérait le métabolisme de l'APP et retardait notamment sa dégradation. De même les mutations de VCP sont notamment caractérisées par l'accumulation d'agrégats de protéines mal conformées et une altération des systèmes de dégradation se traduisant par le développement de maladies neurodégénératives. Par conséquent, VCP se positionne comme une cible protéique intéressante dans le cas de la MA puisqu'elle permet de moduler les processus d'homéostasie et de dégradation cellulaire. Des composés modulant ces processus, tels que la rapamycine et la chloroquine à des doses pharmacologiques, ont précédemment été suggérés pour avoir des effets sur les maladies multi-systémiques associées à VCP (Nalbandian *et al.*, 2015). Ainsi, il semble possible que nos molécules puissent avoir des effets sur le métabolisme de l'APP en régulant des voies de l'homéostasie protéique impliquant la protéine VCP.

II. Implication de VCP dans l'effet des molécules

Après avoir établi l'implication de VCP dans le métabolisme de l'APP, la dernière partie de ces travaux de thèse avait pour but de déterminer le degré d'implication de VCP dans l'effet des MSBD sur le métabolisme de l'APP. Dès lors, nous avons choisi d'utiliser pour nos travaux une des dernières molécules développées par l'équipe et représentative des MSBD : le MAG-S (Figure 26). En effet, il possède des propriétés régulatrices semblables à celle de l'AZP2006 (Composé 30 de la figure 4 de l'article suivant) et il s'agit d'un des composés démontrant, à l'heure actuelle, la meilleure efficacité sur le métabolisme de l'APP (screening des molécules basé sur la production de peptides A β).

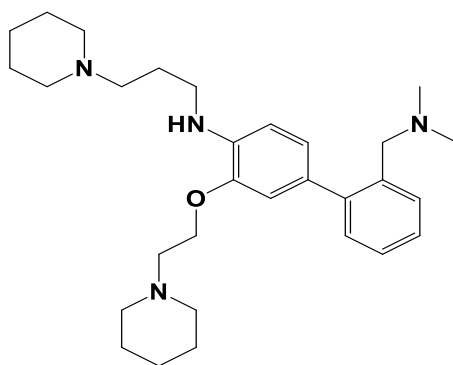


Figure 26 : Structure chimique de MAG-S

1. Objectifs de l'étude

Les résultats préliminaires du laboratoire ont permis d'identifier VCP comme étant la cible potentielle des MSBD et suggèrent que les MSBD moduleraient les pathologies amyloïde et tau par un mécanisme dépendant de VCP, comme nous l'avons vu dans le chapitre III. Ainsi, l'objectif de cette partie fut de déterminer au niveau biologique le degré d'implication de VCP dans l'effet des MSBD, en particulier du composé MAG-S.

Pour cela, les conditions d'utilisation de siRNA dirigés contre VCP pour réprimer son expression et de l'inhibiteur ATPasique de VCP : le NMS-873, mises au point et validées précédemment, furent utilisées dans la lignée stable de neuroblastomes humains exprimant l'APP sauvage (SY5Y-APP695^{WT}). D'ailleurs, ce modèle cellulaire fut celui utilisé pour la sélection des molécules ainsi que pour les études de SAR (relation structure/activité).

La répression de l'expression de VCP et/ou de son activité enzymatique ont donc pour but d'établir la perte d'efficacité ou non de notre molécule sur la régulation du métabolisme de l'APP.

2. Résultats et conclusion

Les cellules SH-SY5Y-APP695^{WT} furent traitées avec des concentrations croissantes de MAG-S pendant 24h après avoir réprimé l'expression de VCP par siRNA ou en co-traitement avec l'inhibiteur NMS-873. Les effets de ces deux combinaisons (MAG-S + siVCP ou MAG-S + NMS-873) furent étudiés sur l'expression des APP-CTFs et des AICDs par technique d'immunoempreinte ainsi que sur la sécrétion des peptides A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ par méthode ELISA (méthodes validées dans la partie 2 des résultats) (Figure 27). En effet, nous avons testé MAG-S sur ses effets connus sur le métabolisme de l'APP en l'absence de VCP ou lors de son inhibition.

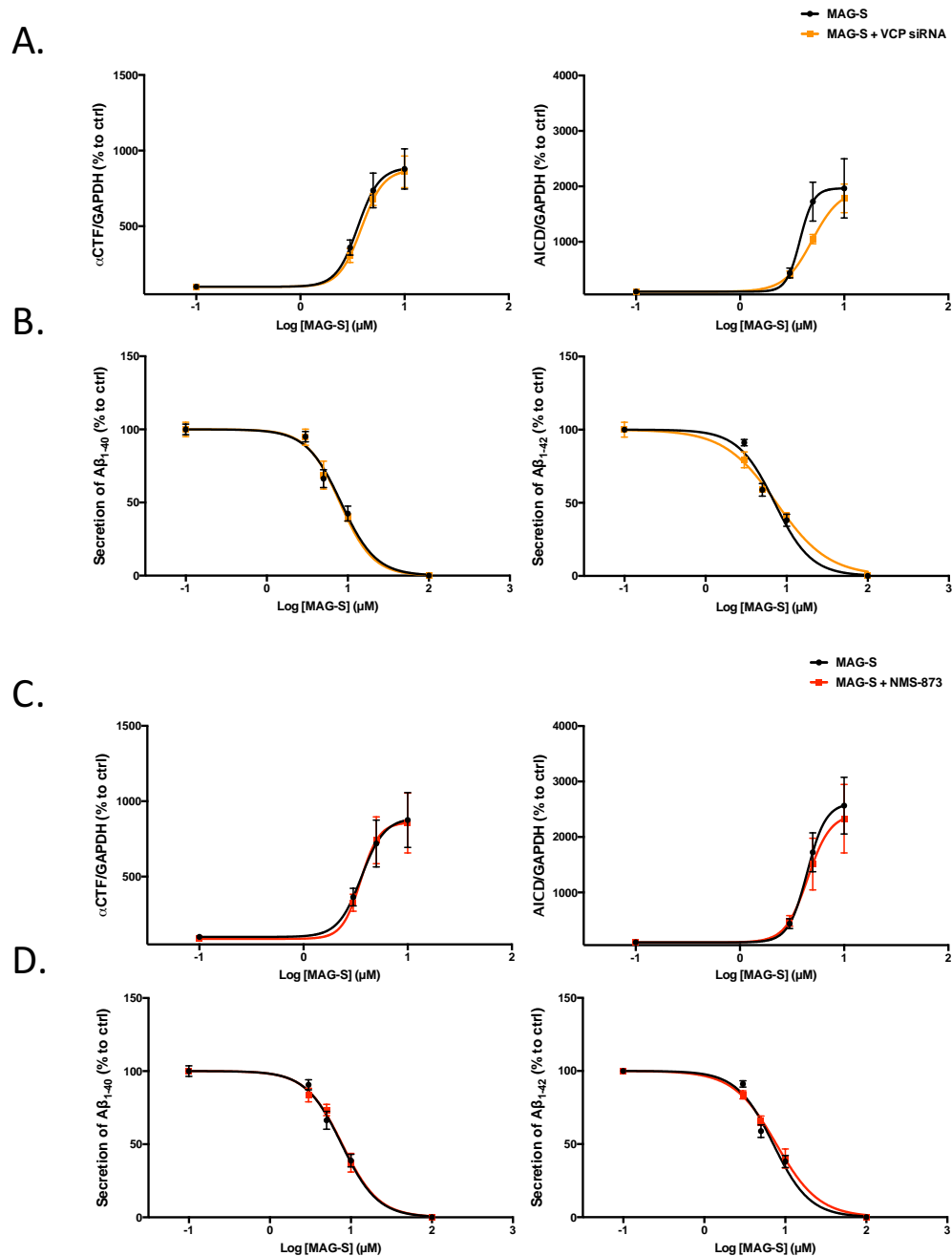


Figure 27 : Etude de l'efficacité de MAG-S sur le métabolisme de l'APP après répression de l'expression de VCP ou inhibition de l'activité ATPasique de VCP par le NMS-873. Les cellules SH-SY5Y-APP695^{WT} ont été traitées pendant 24h avec MAG-S aux concentrations indiquées soit après 48h de transfection siRNA d'une séquence non-ciblante ou dirigée contre VCP (courbes noires et oranges respectivement) soit en co-traitement avec le NMS-873 à 1 μ M (inhibiteur spécifique de VCP) ou non (courbes rouges et noires respectivement). (A) et (C) Représentation graphique des analyses densitométriques par immunoprecipitation de l'expression des APP- α -CTFs et AICD exprimées en unité arbitraire. La GAPDH est utilisée comme contrôle de charge et les résultats sont normalisés par rapport à la condition contrôle (concentration de MAG-S = 0 μ M). (B) et (D) Quantification de la concentration de peptides amyloïdes $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ par méthode ELISA du milieu de culture des cellules traitées dans ces mêmes conditions. Résultats normalisés par rapport à la condition contrôle (concentration de MAG-S = 0 μ M). n=4 expériences indépendantes

Nous avons pu voir précédemment que les effets de la répression et de l'inhibition de VCP sur le métabolisme de l'APP étaient une diminution des APP-CTFs (et donc probablement des AICDS car non détectés) et une augmentation de la sécrétion des peptides $A\beta$. Ainsi, nous avons normalisé nos résultats par rapport la condition contrôle sans MAG-S où VCP est soit réprimée soit inhibée ce qui résulte en une même efficacité de notre molécule (Figure 27). En effet, MAG-S conduit à une augmentation des APP-CTFs et des AICDs et à une réduction de la sécrétion des peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ de façon presque identique que VCP soit réprimée/inhibée ou non. En effet, les courbes suivent la même progression bien qu'il semblerait y avoir un petit effet de VCP sur la production d'AICD (Figure 27 A et C).

Ces résultats suggèrent que MAG-S ne dépend pas de la présence (expression) ni de l'activité ATPasique de VCP pour avoir ses effets sur les APP-CTFs, les AICD et les peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$. D'autre part, il n'a pas été possible de reproduire et donc de confirmer les résultats préliminaires qui avaient permis d'identifier VCP en tant que cible de nos molécules. En effet, de son côté, l'équipe de chimie du Pr. Melnyk a tenté de reproduire ces résultats par les méthodes utilisées initialement (Figures 19 et 20) ainsi que par de nouvelles méthodes, notamment par la synthèse de sondes photoactivables couplées à MAG-S. Ces nouvelles tentatives n'ont pas permis de confirmer que VCP était bien la cible des molécules.

Ainsi, l'ensemble de ces données nous ont amené à conclure que VCP n'était pas la cible de nos molécules. A la suite de cela, nous avons décidé d'une part de continuer à chercher la cible de ces molécules et d'autre part de s'intéresser plus en détails aux effets des composés sur le métabolisme de l'APP afin de déterminer leur mode d'action.

III. Mode d'action des MBSD et dérivés

VCP n'apparaissant pas être la cible des molécules, nous avons décidé d'étudier plus en détails les effets de la nouvelle série de molécules sur le métabolisme de l'APP. En effet, la diminution de sécrétion des peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ associée à une augmentation des APP-CTFs, principalement α -CTFs, suggèrent une redirection de l'APP vers la voie non-amyloïdogénique. Certains composés avaient d'ailleurs montré une augmentation des sAPP α par immunoempreinte renforçant cette idée (Melnyk, Vingtdoux, Burlet, Eddarkaoui, M.-E. Grosjean, *et al.*, 2015).

La redirection de l'APP vers la voie non amyloïdogénique peut être obtenue soit en bloquant la voie amyloïde ou en favorisant la voie non amyloïdogénique. Du fait que les molécules sont des dérivés de la chloroquine, que celle-ci inhibe la production des peptides $A\beta$ et entraîne une accumulation des APP-CTFs et AICD via une altération de la voie endo-lysosomale, il apparut finalement possible que les molécules agissent également sur cette voie. En effet, les molécules pourraient agir par un mécanisme similaire pour bloquer les clivages de la voie amyloïdogénique de l'APP. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux effets des molécules sur la voie autophagie-lysosome.

1. Objectifs de l'étude

Nous avons étudié les effets du composé MAG-S (composé 30) et d'un autre composé le PEL (composé 31) afin de comparer leurs effets sur le flux autophagique. PEL possède une structure chimique proche de celle de MAG-S mais ne démontre pas les mêmes effets que MAG-S sur le métabolisme de l'APP. En effet, PEL est capable de réduire la production de peptides $A\beta$ sans affecter l'expression des APP-CTFs et AICD (Figure 4 de l'article suivant) contrairement à MAG-S. Ainsi, nous avons confronté les effets de ces deux composés sur le métabolisme de l'APP et le flux autophagique dans les SH-SY5Y-APP695^{WT} et dans des cultures primaires de souris.

2. Résultats

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article suivant, publié le 22 septembre 2018 dans le journal *European Journal of Medicinal Chemistry* (doi : 10.1016/j.ejmech.2018.08.092) :

A Phenotypic Approach to the Discovery of Compounds that Promote Non-Amyloidogenic Processing of the Amyloid Precursor Protein: Toward a New Profile of Indirect β -Secretase Inhibitors

Marion Gay,^{a§} Caroline Evrard,^{a§} Florian Descamps,^{a§} Pascal Carato,^{a#} Nicolas Renault,^b Mathilde Coevoet,^a Sabiha Eddarkaoui,^a Catherine Baud,^a Paul-Emmanuel Larchanché,^a Luc Buée,^a Jamal El Bakali,^{a*} Valérie Vingtdeux,^{a*} Nicolas Sergeant,^a Patricia Melnyk^a

^a Université de Lille, Inserm, CHU Lille, UMR-S 1172 - JPArc - Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT Neurosciences et Cancer, F-59000 Lille, France

^b Université de Lille, Inserm, CHU Lille, U995 - LIRIC - Lille Inflammation Research International Center, F-59000 Lille, France

§ These authors contributed equally to this work

Present address: Univ. Poitiers, CIC INSERM 1402, F-86073 Poitiers, France.

Abstract

Dysregulation of the Amyloid Precursor Protein (APP) processing leading to toxic species of amyloid β peptides ($A\beta$) is central to Alzheimer's disease (AD) etiology. $A\beta$ peptides are produced by sequential cleavage of APP by β -secretase (BACE-1) and γ -secretase. Lysosomotropic agent, chloroquine (CQ), has been reported to inhibit $A\beta$ peptide production. However, this effect is accompanied by an inhibition of lysosome-mediated degradation pathways. Following on from the promising activity of two series of APP metabolism modulators derived from CQ, we sought to develop new series of compounds that would retain the inhibitory effects on $A\beta$ production without altering lysosome functions. Herein, we applied a ligand-based pharmacophore modeling approach coupled with de novo design that led to the discovery of a series of biaryl compounds. Structure-activity relationship studies revealed that minor modifications like replacing a piperidine moiety of compound **30** by a cyclohexyl (compound **31**) allowed for the identification of compounds with the desired profile. Further studies have demonstrated that compounds **30** and **31** act through an indirect mechanism to inhibit β -secretase activity. This work shows that it is possible to dissociate the inhibitory effect on $A\beta$ peptide secretion of CQ-derived compounds from the lysosome-mediated degradation effect, providing a new profile of indirect β -secretase inhibitors.

Keywords:

Alzheimer's disease, Amyloid Precursor Protein, chloroquine, lysosome, autophagy, β -secretase, BACE-1, indirect inhibitor, phenotypic

3. Discussion

Ces travaux ont permis de démontrer que toutes les molécules retenues pour cette étude, notamment les composés 30 et 31, pouvaient réduire la sécrétion des peptides A β sans pour autant avoir exactement le même mode d'action sur le métabolisme de l'APP. En effet, ces composés n'exercent pas le même effet sur l'expression des APP-CTFs et de l'AICD.

3.1. MAG-S : un inhibiteur du flux autophagique

Dans un premier temps, nos résultats ont montré que MAG-S (composé 30) exerçait son activité sur le métabolisme de l'APP en altérant la voie autophagie-lysosome. Ces données sont traduites par une accumulation des marqueurs et vésicules d'autophagie de manière dépendante de la concentration. Bien que le mécanisme par lequel MAG-S effectue cette activité ne fut pas clairement identifié, il est possible que MAG-S agisse d'une façon similaire à la chloroquine. En effet, MAG-S possède un pKa proche du pH physiologique 7,4. Il s'agit donc d'une base faible telle que la chloroquine dont le pKa est de 10,1 (CID 2719 PubChem). Il a d'ailleurs été montré que des composés avec un pKa basique compris entre 6,5 et 11 altéraient la fonction des lysosomes (Nadanaciva *et al.*, 2011). Il serait possible que MAG-S soit un agent lysomotropique comme la chloroquine et que par conséquent, ce composé induise une inhibition du flux d'autophagie. MAG-S pourrait diffuser librement jusqu'aux compartiments acides dans lesquels il se retrouverait piégé et s'accumulerait. Cette accumulation changerait alors le pH en captant des protons. L'hypothèse suggérée pourrait être vérifiée par l'utilisation d'agents LysoTracker, s'accumulant dans les compartiments acides ou Lysosensor, sondes changeant de couleur selon le pH des compartiments. Si l'hypothèse se vérifiait, le traitement de cellules avec MAG-S devrait engendrer une accumulation spécifique des lysosomes au cours du temps visible par fluorescence du LysoTracker. En effet, une altération de cette voie ne permettrait plus de dégrader correctement les lysosomes. De plus, l'utilisation de Lysosensor permettrait de valider ou non le changement de pH induit par le MAG-S. En effet, cette sonde change de fluorescence en fonction du pH des organelles dans lesquelles elle s'accumule. A pH acide, la sonde émet une fluorescence jaune alors qu'à pH plus neutre, elle émet une fluorescence bleue. Si MAG-S induisait un changement de pH, nous devrions voir s'accumuler des petites vésicules plutôt bleues. Ainsi, cela permettrait d'expliquer le mécanisme d'action de MAG-S sur la voie autophagie-lysosome.

3.2. PEL : un inhibiteur indirect de BACE1

Nos résultats ont également mis en avant un nouveau composé le PEL (composé 31) ayant la capacité de réduire la sécrétion de peptides A β sans affecter la voie d'autophagie contrairement à MAG-S. Nous avons montré que PEL favorisait la voie non-amyloïdogénique en affectant plus particulièrement le clivage β -sécrétase de l'APP. Cependant, nos travaux ont aussi montré que PEL n'était pas un inhibiteur direct de BACE1, enzyme principalement responsable de ce clivage. Ce composé serait un modulateur indirect de cette enzyme (Figure 28).

PEL pourrait, de par son origine et l'analogie faite avec MAG-S précédemment, lui-aussi avoir un effet sur le pH de certains compartiments sans nuire au flux d'autophagie malgré cela. BACE1 possède un pH optimal acide (Vassar *et al.*, 1999) et un changement d'acidité de certains compartiments par PEL pourrait possiblement changer sa capacité catalytique sans perturber le flux autophagique. Les sécrétions des peptides A β et des fragments sAPP β sont très réduites par PEL mais elles ne sont pas nulles suggérant que le clivage reste effectif. Des méthodes par LysoTracker et/ou LysoSensor, comme discuté précédemment, peuvent être envisagées afin de répondre à cette question. Il serait également intéressant d'étudier l'effet de PEL sur la fonctionnalité des endosomes, compartiments dans lesquels s'effectue principalement le clivage de l'APP par BACE1 (Das *et al.*, 2013). Bien que l'étude du pH des endosomes indépendamment de celui des lysosomes apparaisse délicate, il existe des méthodes qui permettent de suivre les vésicules d'endocytose, notamment grâce à des conjugués fluorescents de dextrane sensibles au pH, dont la fluorescence augmente avec l'acidification des vésicules.

D'autre part, puisque le clivage de l'APP par BACE1 repose sur la convergence de ces deux protéines, nous pourrions nous interroger sur la localisation de l'APP et de BACE1 dans nos modèles cellulaires. En effet, il se pourrait que PEL altère l'adressage de l'APP et/ou de BACE1 aux endosomes, notamment par altération de l'endocytose pour poursuivre sur l'hypothèse précédente. La localisation de l'APP et de BACE1 pourrait être étudiée par immuno-marquage *in cellulo* de chacune des protéines afin de déterminer si elles co-localisent ou non après un traitement PEL. Cela permettrait d'expliquer pourquoi PEL diminue le clivage β de l'APP sans avoir d'effet direct sur l'activité enzymatique de BACE1.

Aussi, il serait intéressant d'étudier d'autres substrats de BACE1 tels que Notch ou Semaphorine 6D pour regarder si leur clivage par BACE1 est affecté par le traitement PEL. Cela pourrait se faire par analyse de l'expression de ces substrats par immunoempreinte et permettrait de déterminer la spécificité de ce composé pour le métabolisme de l'APP ou non.

Ici, PEL se présente comme un nouveau candidat médicament potentiel puisqu'il ne semble pas affecter d'autres systèmes intracellulaires dans nos modèles cellulaires. Il serait alors intéressant de passer au modèle *in vivo* et de traiter des souris qui modélisent la pathologie amyloïde comme le modèle APP/PS1 pour valider ces données cellulaires. En effet, PEL devrait réduire le développement de plaques amyloïdes et probablement les déficits cognitifs s'il montre les mêmes effets *in vivo* qu'il a démontré *in cellulo*. Nous savons déjà que les premiers traitements avec PEL n'apparaissent pas létaux *in vivo* puisque des souris sauvages ont été traitées pendant 3 mois avec ce composé. Aucun effet toxique n'est apparu, du moins, aux premiers abords (comportement général et aspects physiques) jusqu'à la fin du traitement. Les analyses restent à poursuivre aux niveaux biologiques et cérébrales afin de déterminer si notre composé passe la barrière hémato-encéphalique. Ce passage est indispensable pour que PEL puisse agir.

En conclusion, ces travaux ont permis de mettre en avant les effets de nouveaux composés qui pourraient devenir des candidats médicaments pour le traitement de la MA en agissant sur la voie amyloïde du métabolisme de l'APP.

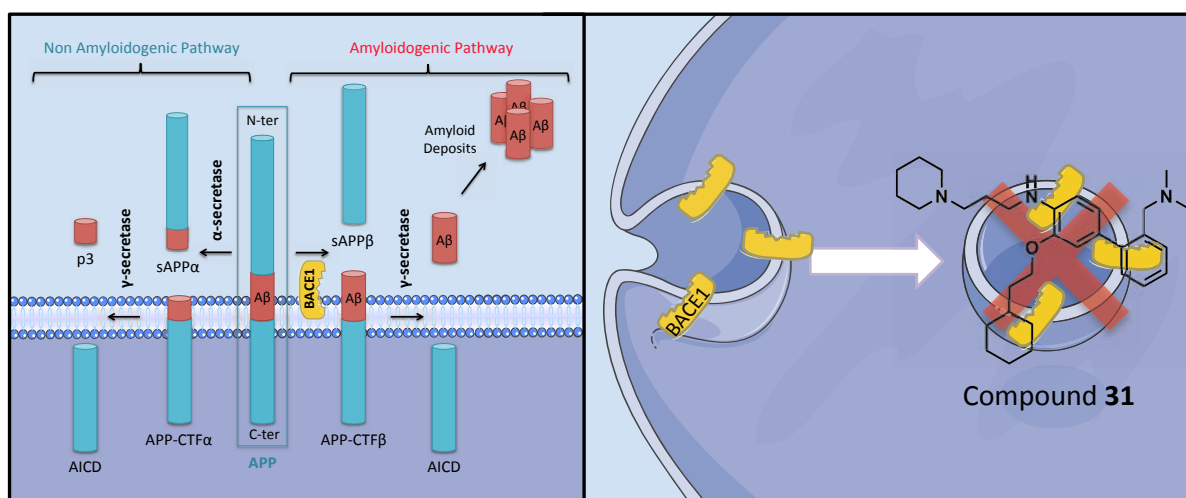


Figure 28 : Représentation schématique du mode d'action du composé 31 (PEL).

Conclusion

Discussion générale

Les objectifs de cette thèse étaient doubles. D'une part, nous avons pour objectif d'étudier la contribution relative de la γ -sécrétase, du protéasome et de la voie endo-lysosome à la dégradation de l'APP et de ses fragments carboxy-terminaux. D'autre part, nous avons pour but de déterminer le mode d'action biologique des composés MSBD sur les processus pathologiques de la MA en relation avec la protéine VCP. En effet, les résultats préliminaires du laboratoire avaient suggéré VCP comme cible potentielle pour ces molécules. Par conséquent, nous avons apporté des éléments de réponse aux questions soulevées par ces différents objectifs à travers la rédaction de trois articles scientifiques.

1. Les voies de dégradation de l'APP et des APP-CTFs

Pour répondre au premier objectif de cette thèse, nous avons montré que la γ -sécrétase et la voie endo-lysosome étaient les processus majeurs de dégradation de l'APP et des APP-CTFs dans la cellule. En effet, nous avons montré que seule l'inhibition de ces deux voies entraînait une accumulation de l'APP et/ou des APP-CTFs, traduisant un défaut de dégradation de ces derniers. Ces travaux nous ont permis de mettre de côté le rôle du protéasome dans la dégradation de l'APP et des APP-CTFs endogènes ou issus de la surexpression de la forme entière de l'APP sauvage, puisque son inhibition n'altérait pas l'expression de ces derniers. Cependant, nous avons pu observer une altération de la dégradation du fragment β -CTF (C99) surexprimé lorsque le protéasome était inhibé, suggérant alors que ce fragment était dégradé par cette voie. Bien que le protéasome apparaisse responsable de la dégradation du fragment β -CTF surexprimé dans notre modèle cellulaire, il semble que cette dégradation soit plutôt un artefact causé par la surexpression de ce fragment. En effet, ce phénomène artefactuel a déjà été décrit lors de la surexpression des protéines Aph-1 et Pen-2, composantes de la γ -sécrétase, (Dunys *et al.*, 2006) et les travaux démontrant l'implication du protéasome dans la dégradation des APP-CTFs reposent principalement sur des modèles de surexpression du fragment β -CTF/C99 (Nunan *et al.*, 2001; Bustamante *et al.*, 2013; Jang *et al.*, 2017b). Ces données suggèrent que la surexpression de fragment protéique *in cellulo* ne conduit pas nécessairement à modéliser les conditions physiologiques dans lesquelles le fragment est produit et dégradé. Cette étude nous a alors permis de sélectionner des modèles cellulaires adéquats pour l'étude du métabolisme de l'APP dans la suite de cette thèse.

L'ensemble de ces travaux renforce ainsi la pertinence de la voie endo-lysosome dans le métabolisme de l'APP et suggère également que cette voie de dégradation représente une cible potentielle pour prévenir l'accumulation des fragments de l'APP et leurs effets néfastes observés dans la pathologie amyloïde.

2. Implication de VCP dans le métabolisme de l'APP

Ensuite, nous avons initié l'étude du rôle de VCP, régulateur clé de l'homéostasie protéique, dans le métabolisme de l'APP. En effet, nous souhaitons d'abord déterminer la relation qu'il pouvait exister entre ces deux protéines avant de chercher à comprendre comment les MSBD pouvaient moduler l'activité de VCP pour avoir des effets sur l'APP et ses métabolites. Nous avons montré que VCP et l'APP interagissaient ensemble et que la répression de l'expression de VCP et son inhibition interféraient avec le métabolisme de l'APP, notamment son adressage à la surface cellulaire et sa dégradation. Nos travaux ont permis d'établir qu'il existait bien une relation entre l'APP et VCP, données encore absentes dans la littérature à ce jour. Bien que nous n'ayons pas eu le temps de détailler les mécanismes moléculaires d'interactions et de régulation protéiques mis en jeu, ces résultats permettent toutefois d'impliquer VCP dans le métabolisme de l'APP et renforcent le lien entre les dérégulations du métabolisme de l'APP et de l'homéostasie cellulaire retrouvées dans la MA. En effet, il a été montré que l'expression de VCP était diminuée dans la MA (Dolan *et al.*, 2011). De plus, les mutations ou altérations de VCP sont caractérisées par l'accumulation d'agrégats de protéines mal conformées et une altération des systèmes de dégradation, caractéristiques également retrouvées dans la MA. Ainsi, VCP apparaît comme une cible potentielle pour la régulation des altérations du métabolisme de l'APP à travers un mécanisme passant par l'homéostasie cellulaire. VCP intervenant dans les processus de dégradation cellulaire dont la voie endo-lysosome, et cette dernière étant impliquée dans le métabolisme de l'APP comme nous l'avons montré, des stratégies thérapeutiques modulant l'activité de VCP pourraient se révéler intéressantes dans le traitement de la MA. Le ciblage de VCP dans la pathologie Alzheimer s'avérerait d'autant plus judicieux puisque, non seulement, elle se situe au carrefour des systèmes altérés dans la MA mais régule à la fois le métabolisme de l'APP et de Tau. En effet, des études ont déjà montré une interaction entre la protéine Tau et VCP et nous avons également des travaux en cours qui suggèrent une implication de VCP dans la phosphorylation de Tau. Il serait alors intéressant de déterminer précisément le rôle de VCP dans le métabolisme de Tau pour conforter ou non sa pertinence dans les processus pathologique de la MA.

3. Mode d'action des MSBD et nouveaux dérivés sur le métabolisme de l'APP

Enfin, nous avons montré que les molécules MSBD, notamment le composé MAG-S, ne dépendaient ni de la présence de VCP ni de son activité ATPasique pour médier des effets sur le métabolisme de l'APP. En effet, que l'expression de VCP soit réprimée ou que son activité soit inhibée, MAG-S est capable de réduire la sécrétion des peptides A β et d'augmenter l'expression des APP-CTFs et AICD. VCP n'apparaissant pas être la cible des molécules, nous avons étudié plus en détails les effets de la dernière série de molécules sur le métabolisme de l'APP. Grâce à l'étude des composés MAG-S et PEL (analogue chimique de MAG-S capable de réduire la production de peptides A β sans affecter l'expression des APP-CTFs et AICD), nous avons montré que ces molécules modulaient le métabolisme de l'APP par des modes d'actions différents entre elles. D'une part, nous avons montré que MAG-S réduisait la production des peptides A β et augmentait l'expression des APP-CTFs et AICD en inhibant le flux autophagique. D'autre part, nous avons montré que PEL, contrairement à MAG-S, avait la capacité de réduire la sécrétion des peptides A β sans affecter l'autophagie. Nos résultats ont permis de montrer que MAG-S et PEL étaient des inhibiteurs indirects du clivage β -sécrétase de l'APP, suggérant des candidats médicaments parmi ces dérivés de MSBD pour le traitement de la MA réprimant la voie amyloïdogénique.

Ainsi, ces travaux de thèse apportent des éléments de compréhension au métabolisme de l'APP et mettent en avant les processus d'homéostasie cellulaire, particulièrement les voies de dégradation, comme cibles d'intérêt pour la régulation de la pathologie amyloïde. Nous avons d'ailleurs montré l'implication de la protéine VCP, régulateur clé de l'homéostasie protéique, dans la dégradation de l'APP. Les altérations du métabolisme de l'APP sont interconnectées avec la dysfonction des processus de dégradation dans la MA et nous avons montré l'importance de ces derniers dans le métabolisme de l'APP. Plusieurs études supportent d'ailleurs l'intérêt de cibler les voies de dégradation notamment la voie autophagie-lysosome en tant que stratégie thérapeutique pour la MA (Nixon, 2017). Favoriser la voie autophagie-lysosome permettrait de prévenir les accumulations protéiques dont les fragments de l'APP délétères les β -CTFs et de la production des peptides A β . De plus, cette voie n'intervient pas seulement dans le métabolisme de l'APP mais régule la dégradation de l'ensemble des déchets intracellulaires. Il serait intéressant alors d'étudier l'effet des composés MAG-S et PEL sur la protéine Tau. En effet, les molécules issues des précédentes familles ont montré qu'elles étaient capables de réduire la phosphorylation de la protéine Tau et d'améliorer sa protéolyse *in vitro* et *in vivo*. De plus, une étude récente a montré que le ciblage de BACE1 grâce à des miRNA réduisait la phosphorylation de Tau en modulant des médiateurs de la voie d'autophagie (Piedrahita *et al.*, 2016). Nos composés

pourraient également avoir un effet sur Tau en passant par la régulation de BACE1 et/ou de la voie autophagie-lysosome. Dans ce contexte, nous avons traité des souris transgéniques (Thy-Tau22) récemment avec MAG-S et PEL afin de déterminer leurs effets *in vivo* sur la pathologie tau.

Conclusion

En conclusion, nos travaux ont contribué d'une part à la recherche fondamentale en apportant de nouvelles données concernant le métabolisme de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP) notamment en ce qui concerne ses processus de dégradation et l'implication d'un régulateur clé de l'homéostasie qu'est la protéine VCP. D'autre part, ces travaux ont également participé au développement thérapeutique pour lutter contre la MA puisqu'ils ont démontré l'efficacité de nouveaux composés pharmacologiques sur la pathologie amyloïde *in cellulo*. L'ensemble de ces travaux ouvrent des perspectives d'études concernant les systèmes de régulation de l'homéostasie protéique et de dégradation cellulaire pour le développement de stratégies thérapeutiques ciblant les maladies neurodégénératives et pas seulement la MA. Dans cette optique, nos travaux ont permis le dépôt d'un brevet intitulé « *New Polyamine Compounds as Modulators of Amyloid Peptide Precursor Metabolism* » pour l'invention de nouveaux composés modulant le métabolisme de l'APP. Les perspectives de ce brevet seraient la validation *in vivo* de l'efficacité de ces composés dans des modèles modélisant la pathologie amyloïde et la pathologie tau.

Références

Bibliographie

A.

Abisambra, J. F. *et al.* (2013) 'Tau Accumulation Activates the Unfolded Protein Response by Impairing Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation', *Journal of Neuroscience*, 33(22), pp. 9498–9507. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5397-12.2013.

Agholme, L. *et al.* (2012) 'Amyloid- β secretion, generation, and lysosomal sequestration in response to proteasome inhibition: Involvement of autophagy', *Journal of Alzheimer's Disease*, 31(2), pp. 343–358. doi: 10.3233/JAD-2012-120001.

Ahmad, M. *et al.* (2006) 'Cleavage of Amyloid- β Precursor Protein (APP) by Membrane-Type Matrix Metalloproteinases', *The Journal of Biochemistry*, 139(3), pp. 517–526. doi: 10.1093/jb/mvj054.

Ahmed, T. *et al.* (2014) 'Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion', *Neurobiology of Aging*, 35(11), pp. 2474–2478. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.005.

Al-Bari, M. A. A. (2015) 'Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(6), pp. 1608–1621. doi: 10.1093/jac/dkv018.

Alafuzoff, I. *et al.* (1987) 'Histopathological criteria for progressive dementia disorders: clinical-pathological correlation and classification by multivariate data analysis', *Acta Neuropathologica*, 74(3), pp. 209–225. doi: 10.1007/BF00688184.

Albasanz, J. L. *et al.* (2008) 'Up-regulation of adenosine receptors in the frontal cortex in Alzheimer's disease', *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 18(2), pp. 211–219. doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00112.x.

Allinquant, B. *et al.* (1995) 'Downregulation of Amyloid Precursor Protein Inhibits Neurite Outgrowth In Vitro', *The Journal of Cell Biology*, 128(5), pp. 919–927. doi: 10.1083/JCB.128.5.919.

Alonso, A. *et al.* (2001) 'Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), pp. 6923–6928. doi: 10.1073/pnas.121119298.

Alonso, A. C. *et al.* (1994) 'Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules

in Alzheimer disease’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), pp. 5562–5566.

Alonso, A. C., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (1996) ‘Alzheimer’s disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules’, *Nature Medicine*, 2(7), pp. 783–787.

Alonso, A. D. *et al.* (2010) ‘Phosphorylation of Tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined causes neurodegeneration’, *Journal of Biological Chemistry*, 285(40), pp. 30851–30860. doi: 10.1074/jbc.M110.110957.

Alonso, A. del C. *et al.* (2001) ‘Hyperphosphorylation Induces Self-Assembly of Tau into Tangles of Paired Helical Filaments/Straight Filaments’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), pp. 6923–6928. doi: 10.1073/pnas.121119298.

Anderson, J. P. *et al.* (1991) ‘Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells’, *Neuroscience Letters*, 128(1), pp. 126–128. doi: 10.1016/0304-3940(91)90775-O.

Andrew, R. J. *et al.* (2016) ‘A Greek tragedy: The growing complexity of Alzheimer amyloid precursor protein proteolysis’, *Journal of Biological Chemistry*, 291, pp. 19235–19244. doi: 10.1074/jbc.R116.746032.

Andrew, R. J. *et al.* (2016) ‘A Greek Tragedy: The Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis *’. doi: 10.1074/jbc.R116.746032.

Araki, W. *et al.* (1991) ‘Trophic effect of β -amyloid precursor protein on cerebral cortical neurons in culture’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 181(1), pp. 265–271. doi: 10.1016/S0006-291X(05)81412-3.

Arendt, T., Stieler, J. and Holzer, M. (2015) ‘Brain hypometabolism triggers PHF-like phosphorylation of tau, a major hallmark of Alzheimer’s disease pathology’, *Journal of Neural Transmission*, 122(4), pp. 531–539. doi: 10.1007/s00702-014-1342-8.

Arriagada, P. V. *et al.* (1992) ‘Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer’s disease’, *Neurology*, 42(3), pp. 631–631. doi: 10.1212/WNL.42.3.631.

Asai, H. *et al.* (2015) ‘Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation’, *Nature neuroscience*, 18(11), pp. 1584–1593. doi: 10.1038/nn.4132.

Asai, M. *et al.* (2011) ‘An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal

fragments *via* cathepsin B in a human neuroglioma model', *The FASEB Journal*, 25(10), pp. 3720–3730. doi: 10.1096/fj.11-182154.

Asai, T. *et al.* (2002) 'VCP (p97) regulates NFκB signaling pathway, which is important for metastasis of osteosarcoma cell line', *Japanese Journal of Cancer Research*, 93(3), pp. 296–304. doi: 10.1111/j.1349-7006.2002.tb02172.x.

Asuni, A. A. *et al.* (2007) 'Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(34), pp. 9115–29. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007.

Asuni, A. A. *et al.* (2007) 'Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(34), pp. 9115–9129. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007.

Atkin, G. *et al.* (2014) 'F-box only protein 2 (Fbxo2) regulates amyloid precursor protein levels and processing', *Journal of Biological Chemistry*, 289(10), pp. 7038–7048. doi: 10.1074/jbc.M113.515056.

Attwell, D. and Laughlin, S. B. (2001) 'An energy budget for signaling in the grey matter of the brain', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(10), pp. 1133–1145. doi: 10.1097/00004647-200110000-00001.

Auer, R. N. and Siesjö, B. K. (1993) 'Hypoglycaemia: brain neurochemistry and neuropathology', *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 7(3), pp. 611–625. doi: 10.1016/S0950-351X(05)80210-1.

Augustinack, J. C. *et al.* (2002) 'Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathologica*, 103(1), pp. 26–35. doi: 10.1007/s004010100423.

Avci, D. and Lemberg, M. K. (2015) 'Clipping or Extracting: Two Ways to Membrane Protein Degradation', *Trends in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 25(10), pp. 611–622. doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.003.

El Ayadi, A. *et al.* (2012) 'Ubiquilin-1 regulates amyloid precursor protein maturation and degradation by stimulating K63-linked polyubiquitination of lysine 688', *Proceedings of the National Academy of*

Sciences, 109(33), pp. 13416–13421. doi: 10.1073/pnas.1206786109.

Bachurin, S. O., Bovina, E. V. and Ustyugov, A. A. (2017) ‘Drugs in Clinical Trials for Alzheimer’s Disease: The Major Trends’, *Medicinal Research Reviews*, 37(5), pp. 1186–1225. doi: 10.1002/med.21434.

Badadani, M. *et al.* (2010) ‘VCP associated inclusion body myopathy and paget disease of bone knock-in mouse model exhibits tissue pathology typical of human disease’, *PLoS ONE*, 5(10). doi: 10.1371/journal.pone.0013183.

Baek, G. H. *et al.* (2013) ‘Cdc48: a swiss army knife of cell biology.’, *Journal of amino acids*, 2013, p. 183421. doi: 10.1155/2013/183421.

Baek, G. H., Kim, I. and Rao, H. (2011) ‘The Cdc48 ATPase modulates the interaction between two proteolytic factors Ufd2 and Rad23’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(33), pp. 13558–13563. doi: 10.1073/pnas.1104051108.

Ballar, P. *et al.* (2006) ‘The role of a novel p97/valosin-containing protein-interacting motif of gp78 in endoplasmic reticulum-associated degradation’, *Journal of Biological Chemistry*, 281(46), pp. 35359–35368. doi: 10.1074/jbc.M603355200.

Ballar, P., Pabuccuoglu, A. and Kose, F. A. (2011) ‘Different p97/VCP complexes function in retrotranslocation step of mammalian Er-associated degradation (ERAD)’, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 43(4), pp. 613–621. doi: 10.1016/j.biocel.2010.12.021.

Ballard, C. *et al.* (2011) ‘Alzheimer’s disease’, *The Lancet*. Elsevier Ltd, 377(9770), pp. 1019–1031. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9.

Banerjee, S. *et al.* (2016) ‘2.3 Å resolution cryo-EM structure of human p97 and mechanism of allosteric inhibition’, *Science*, 351(6275), pp. 871–875. doi: 10.1126/science.aad7974.

Baranello, R. *et al.* (2015) ‘Amyloid-Beta Protein Clearance and Degradation (ABCD) Pathways and their Role in Alzheimer’s Disease’, *Current Alzheimer Research*, 12(1), pp. 32–46. doi: 10.2174/1567205012666141218140953.

Baranger, K. *et al.* (2016) ‘MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease’, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(1), pp. 217–236. doi: 10.1007/s00018-015-1992-1.

Baranger, K. *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(January), pp. 1–17. doi: 10.3389/fnmol.2016.00163.

Baranger, K., Khrestchatisky, M. and Rivera, S. (2016) 'MT5-MMP, just a new APP processing proteinase in Alzheimer's disease?', *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), p. 167. doi: 10.1186/s12974-016-0633-4.

Bard, F. *et al.* (2000) 'Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease', *Nature Medicine*, 6(8), pp. 916–919. doi: 10.1038/78682.

Barger, S. W. and Harmon, A. D. (1997) 'Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E', *Nature*, 388(6645), pp. 878–881. doi: 10.1038/42257.

Barnes, N. Y. *et al.* (1998) 'Increased production of amyloid precursor protein provides a substrate for caspase-3 in dying motoneurons.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(15), pp. 5869–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671674>.

Barrier, M. *et al.* (2014) 'Sulfate salts of N-(3-(4-(3-(diisobutylamino)propyl)piperazin-1-yl)propyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-amine, preparation thereof and use of the same.'

Becker-Pauly, C. and Pietrzik, C. U. (2017) 'The Metalloprotease Meprin β Is an Alternative β -Secretase of APP', *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9(January), pp. 1–11. doi: 10.3389/fnmol.2016.00159.

Behr, D. *et al.* (1996) 'Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I', *Journal of Biological Chemistry*, 271(3), pp. 1613–1620. doi: 10.1074/jbc.271.3.1613.

Belyaev, N. D. *et al.* (2010) 'The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a β -secretase-dependent pathway', *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), pp. 41443–41454. doi: 10.1074/jbc.M110.141390.

Bennett, B. D. *et al.* (2000) 'Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues', *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), pp. 20647–20651. doi: 10.1074/jbc.M002688200.

Benseny-Cases, N., Cócera, M. and Cladera, J. (2007) 'Conversion of non-fibrillar β -sheet oligomers into amyloid fibrils in Alzheimer's disease amyloid peptide aggregation', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(4), pp. 916–921. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.082.

- Berger-Sweeney, J. *et al.* (1999) 'Impairments in learning and memory accompanied by neurodegeneration in mice transgenic for the carboxyl-terminus of the amyloid precursor protein', *Molecular Brain Research*, 66(1–2), pp. 150–162. doi: 10.1016/S0169-328X(99)00014-5.
- Bertrand, E. *et al.* (2001) 'A short cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis in vitro and in vivo', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 18(5), pp. 503–511. doi: 10.1006/mcne.2001.1030.
- Beskow, A. *et al.* (2009) 'A Conserved Unfoldase Activity for the p97 AAA-ATPase in Proteasomal Degradation', *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 394(4), pp. 732–746. doi: 10.1016/j.jmb.2009.09.050.
- Bhattacharyya, S. (1995) 'Reductive Alkylations of Dimethylamine Using Titanium(IV) Isopropoxide and Sodium Borohydride: An Efficient, Safe, and Convenient Method for the Synthesis of N,N-Dimethylated Tertiary Amines', *Journal of Organic Chemistry*, 60, pp. 4928–4929. doi: 10.1021/jo00120a044.
- Bien, J. *et al.* (2012) 'The metalloprotease meprin β generates amino terminal-truncated amyloid β peptide species', *Journal of Biological Chemistry*, 287(40), pp. 33304–33313. doi: 10.1074/jbc.M112.395608.
- Biernat, J. *et al.* (1993) 'Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding', *Neuron*, 11(1), pp. 153–163.
- Binder, L. I. (1985) 'The distribution of tau in the mammalian central nervous system', *The Journal of Cell Biology*, 101(4), pp. 1371–1378. doi: 10.1083/jcb.101.4.1371.
- Bittner, T. *et al.* (2009) '-Secretase Inhibition Reduces Spine Density In Vivo via an Amyloid Precursor Protein-Dependent Pathway', *Journal of Neuroscience*, 29(33), pp. 10405–10409. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2288-09.2009.
- Blair, L. J. *et al.* (2015) 'The emerging role of peptidyl-prolyl isomerase chaperones in tau oligomerization, amyloid processing, and Alzheimer's disease', *Journal of Neurochemistry*, 133(1), pp. 1–13. doi: 10.1111/jnc.13033.
- Blennow, K. *et al.* (2010) 'Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease', *Nature Reviews Neurology*, 6(3), pp. 131–144. doi: 10.1038/nrneurol.2010.4.

- Bloom, G. S. (2014) 'Amyloid- β and Tau', *JAMA Neurology*, 71(4), p. 505. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.5847.
- Boluda, S. *et al.* (2015) 'Differential induction and spread of tau pathology in young PS19 tau transgenic mice following intracerebral injections of pathological tau from Alzheimer's disease or corticobasal degeneration brains', *Acta neuropathologica*, 129(2), pp. 221–237. doi: 10.1007/s00401-014-1373-0.
- De Boni, U. and Crapper, D. R. (1978) 'Paired helical filaments of the Alzheimer type in cultured neurones', *Nature*, 271(5645), pp. 566–568.
- van den Boom, J. *et al.* (2016) 'VCP/p97 Extracts Sterically Trapped Ku70/80 Rings from DNA in Double-Strand Break Repair', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 64(1), pp. 189–198. doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.037.
- Van Den Boom, J. and Meyer, H. (2017) 'VCP/p97-Mediated Unfolding as a Principle in Protein Homeostasis and Signaling'. doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.028.
- Botteri, G. *et al.* (2018) 'The BACE1 product sAPP β induces ER stress and inflammation and impairs insulin signaling', *Metabolism*. Elsevier Inc, p. #pagerange#. doi: 10.1016/j.metabol.2018.03.005.
- Bou Samra, E. *et al.* (2017) 'A role for Tau protein in maintaining ribosomal DNA stability and cytidine deaminase-deficient cell survival', *Nature Communications*, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-00633-1.
- Boutajangout, A., Quartermain, D. and Sigurdsson, E. M. (2010) 'Immunotherapy targeting pathological tau prevents cognitive decline in a new tangle mouse model', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(49), pp. 16559–16566. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4363-10.2010.
- Bowman, G. L. *et al.* (2007) 'Blood-brain barrier impairment in Alzheimer disease: stability and functional significance', *Neurology*, 68(21), pp. 1809–1814. doi: 10.1212/01.wnl.0000262031.18018.1a.
- Boxer, A. L. *et al.* (2017) 'Advances in progressive supranuclear palsy: new diagnostic criteria, biomarkers, and therapeutic approaches', *The Lancet. Neurology*, 16(7), pp. 552–563. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30157-6.
- Boyault, C. *et al.* (2006) 'HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover', *EMBO Journal*,

25(14), pp. 3357–3366. doi: 10.1038/sj.emboj.7601210.

Boyne, L. J. *et al.* (1995) ‘Distribution of Big tau in the central nervous system of the adult and developing rat’, *The Journal of Comparative Neurology*, 358(2), pp. 279–293. doi: 10.1002/cne.903580209.

Braak, H. *et al.* (2006) ‘Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry’, *Acta Neuropathologica*, 112(4), pp. 389–404. doi: 10.1007/s00401-006-0127-z.

Braak, H. and Braak, E. (1991) ‘Neuropathological staging of Alzheimer-related changes’, *Acta Neuropathologica*, 82(4), pp. 239–259. doi: 10.1007/BF00308809.

Braak, H. and Del Tredici, K. (2011) ‘The pathological process underlying Alzheimer’s disease in individuals under thirty’, *Acta Neuropathologica*, 121(2), pp. 171–181. doi: 10.1007/s00401-010-0789-4.

Brion, J. P. *et al.* (1985) ‘Neurofibrillary tangles of Alzheimer’s disease: an immunohistochemical study.’, *Journal of submicroscopic cytology*, 17(1), pp. 89–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3973960>.

Buchan, J. R. *et al.* (2013) ‘Eukaryotic Stress Granules Are Cleared by Autophagy and Cdc48/VCP Function’, *Cell*. Elsevier Inc., 153(7), pp. 1461–1474. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.037.

Buchberger, A., Schindelin, H. and Hänzelmann, P. (2015) ‘Control of p97 function by cofactor binding’, *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 589(19), pp. 2578–2589. doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.028.

Buée-Scherrer, V. *et al.* (1995) ‘Neurofibrillary degeneration in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam. Immunochemical characterization of tau proteins’, *The American Journal of Pathology*, 146(4), pp. 924–932.

Buée-Scherrer, V. *et al.* (1997) ‘Pathological tau proteins in postencephalitic parkinsonism: comparison with Alzheimer’s disease and other neurodegenerative disorders’, *Annals of Neurology*, 42(3), pp. 356–359. doi: 10.1002/ana.410420312.

Buée Scherrer, V. *et al.* (1996) ‘Hyperphosphorylated tau proteins differentiate corticobasal degeneration and Pick’s disease’, *Acta Neuropathologica*, 91(4), pp. 351–359.

Bug, M. and Meyer, H. (2012) ‘Expanding into new markets - VCP/p97 in endocytosis and autophagy’,

Journal of Structural Biology. Elsevier Inc., 179(2), pp. 78–82. doi: 10.1016/j.jsb.2012.03.003.

Bukhari, H. *et al.* (2017) ‘Small things matter: Implications of APP intracellular domain AICD nuclear signaling in the progression and pathogenesis of Alzheimer’s disease’, *Progress in Neurobiology*, 156, pp. 189–213. doi: 10.1016/j.pneurobio.2017.05.005.

Bulfer, S. L., Chou, T. F. and Arkin, M. R. (2016) ‘P97 Disease Mutations Modulate Nucleotide-Induced Conformation to Alter Protein-Protein Interactions’, *ACS Chemical Biology*, 11(8), pp. 2112–2116. doi: 10.1021/acscchembio.6b00350.

Buoso, E. *et al.* (2010) ‘ β -Amyloid precursor protein metabolism: focus on the functions and degradation of its intracellular domain’, *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd, 62(4), pp. 308–317. doi: 10.1016/j.phrs.2010.05.002.

Burnouf, S. *et al.* (2013) ‘NMDA receptor dysfunction contributes to impaired brain-derived neurotrophic factor-induced facilitation of hippocampal synaptic transmission in a Tau transgenic model’, *Aging Cell*, 12(1), pp. 11–23. doi: 10.1111/accel.12018.

Bustamante, H. A. *et al.* (2013) ‘Turnover of C99 is controlled by a crosstalk between ERAD and ubiquitin-independent lysosomal degradation in human neuroglioma cells’, *PLoS ONE*, 8(12). doi: 10.1371/journal.pone.0083096.

Buxbaum, J. D. (1998) ‘Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor’, *J Biol Chem*, 273(35), pp. 37–40.

Byun, H. *et al.* (2014) ‘ERAD and how viruses exploit it’, *Frontiers in Microbiology*, 5(JULY), pp. 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2014.00330.

Caccamo, A. *et al.* (2007) ‘Lithium Reduces Tau Phosphorylation but Not A β or Working Memory Deficits in a Transgenic Model with Both Plaques and Tangles’, *The American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 170(5), pp. 1669–1675. doi: 10.2353/ajpath.2007.061178.

Cai, H. *et al.* (2001) ‘BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons.’, *Nature neuroscience*, 4(3), pp. 233–234. doi: 10.1038/85064.

Cai, Z. and Yan, L.-J. (2013) ‘Rapamycin, Autophagy, and Alzheimer’s Disease’, *J Biochem Pharmacol Res.*, 1(2), pp. 84–90. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

- Caille, I. (2004) 'Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone', *Development*, 131(9), pp. 2173–2181. doi: 10.1242/dev.01103.
- Caillet-Boudin, M. L. *et al.* (2015) 'Regulation of human MAPT gene expression', *Molecular Neurodegeneration*. *Molecular Neurodegeneration*, 10(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s13024-015-0025-8.
- Calafate, S. *et al.* (2015) 'Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation', *Cell Reports*, 11(8), pp. 1176–1183. doi: 10.1016/j.celrep.2015.04.043.
- Caldwell, J. H. *et al.* (2013) 'Roles of the amyloid precursor protein family in the peripheral nervous system', *Mechanisms of Development*, 130(6–8), pp. 433–446. doi: 10.1016/j.mod.2012.11.001.
- de Calignon, A. *et al.* (2012) 'Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease', *Neuron*, 73(4), pp. 685–697. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.033.
- Cao, X. (2001) 'A Transcriptionally Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60', *Science*, 293(2001), pp. 115–120. doi: 10.1126/science.1058783.
- Caporaso, G. L. (1992) 'Chloroquine inhibits intracellular degradation but not secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(6), pp. 2252–6. doi: 10.1073/PNAS.89.6.2252.
- Carato, P. *et al.* (2000) 'Synthesis and binding studies on a new series of arylpiperazino benzoxazol-2-one and benzoxazin-3-one derivatives as selective D4 ligands', *Drug Des. Disc.*, 17, pp. 173–181.
- Carling, D. (2004) 'The AMP-activated protein kinase cascade - A unifying system for energy control', *Trends in Biochemical Sciences*, 29(1), pp. 18–24. doi: 10.1016/j.tibs.2003.11.005.
- Carroll, C. M. and Li, Y. M. (2016) 'Physiological and pathological roles of the γ -secretase complex', *Brain Research Bulletin*. Elsevier Inc., 126, pp. 199–206. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.04.019.
- Carvalho, P., Stanley, A. M. and Rapoport, T. A. (2010) 'Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase hrd1p', *Cell*. Elsevier Inc., 143(4), pp. 579–591. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.028.
- Cecarini, V. *et al.* (2012) 'Crosstalk between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in a human cellular model of Alzheimer's disease', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(11), pp. 1741–1751. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.07.015.

- Chabrier, M. A. *et al.* (2014) ‘Synergistic effects of amyloid-beta and wild-type human tau on dendritic spine loss in a floxed double transgenic model of Alzheimer’s disease’, *Neurobiology of Disease*. Elsevier Inc., 64, pp. 107–117. doi: 10.1016/j.nbd.2014.01.007.
- Chalbot, S. *et al.* (2011) ‘Blood-cerebrospinal fluid barrier permeability in Alzheimer’s disease’, *Journal of Alzheimer’s disease: JAD*, 25(3), pp. 505–515. doi: 10.3233/JAD-2011-101959.
- Chang, K.-A. *et al.* (2006) ‘Phosphorylation of Amyloid Precursor Protein (APP) at Thr668 Regulates the Nuclear Translocation of the APP Intracellular Domain and Induces Neurodegeneration’, *Molecular and Cellular Biology*, 26(11), pp. 4327–4338. doi: 10.1128/MCB.02393-05.
- Chasseigneaux, S. *et al.* (2011) ‘Secreted amyloid precursor protein β and secreted amyloid precursor protein α induce axon outgrowth in vitro through egr1 signaling pathway’, *PLoS ONE*, 6(1). doi: 10.1371/journal.pone.0016301.
- Chasseigneaux, S. and Allinquant, B. (2012) ‘Functions of A β , sAPP α and sAPP β : Similarities and differences’, *Journal of Neurochemistry*, 120(SUPPL. 1), pp. 99–108. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07584.x.
- Chen, H. *et al.* (2003) ‘Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development’, *Journal of Cell Biology*, 160(2), pp. 189–200. doi: 10.1083/jcb.200211046.
- Chen, Q. *et al.* (2012) ‘Tau protein is involved in morphological plasticity in hippocampal neurons in response to BDNF’, *Neurochemistry International*, 60(3), pp. 233–242. doi: 10.1016/j.neuint.2011.12.013.
- Chen, T. Y. *et al.* (2006) ‘The intracellular domain of amyloid precursor protein interacts with flotillin-1, a lipid raft protein’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(1), pp. 266–272. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.01.156.
- Chen, Y. and Dong, C. (2009) ‘A β 40 promotes neuronal cell fate in neural progenitor cells’, *Cell Death and Differentiation*, 16(3), pp. 386–394. doi: 10.1038/cdd.2008.94.
- Cheng, G. *et al.* (2002) ‘Phosphatidylinositol-3-Kinase–Akt Kinase and p42/p44 Mitogen-Activated Protein Kinases Mediate Neurotrophic and Excitoprotective Actions of a Secreted Form of Amyloid Precursor Protein’, *Experimental Neurology*, 175(2), pp. 407–414. doi: 10.1006/exnr.2002.7920.
- Chesser, A. S., Pritchard, S. M. and Johnson, G. V. W. (2013) ‘Tau Clearance Mechanisms and Their

- Possible Role in the Pathogenesis of Alzheimer Disease’, *Frontiers in Neurology*, 4(7), pp. 3274–3290. doi: 10.3389/fneur.2013.00122.
- Chia, W. S. *et al.* (2012) ‘ATP Binding to p97/VCP D1 Domain Regulates Selective Recruitment of Adaptors to Its Proximal N-Domain’, *PLoS ONE*. Edited by I. Kursula, 7(12), p. e50490. doi: 10.1371/journal.pone.0050490.
- Chiu, S. L., Chen, C. M. and Cline, H. T. (2008) ‘Insulin Receptor Signaling Regulates Synapse Number, Dendritic Plasticity, and Circuit Function In Vivo’, *Neuron*, 58(5), pp. 708–719. doi: 10.1016/j.neuron.2008.04.014.
- Cho, J.-H. and Johnson, G. V. W. (2004) ‘Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau’s ability to bind and stabilize microtubules’, *Journal of Neurochemistry*, 88(2), pp. 349–358.
- Choi, S. H. *et al.* (2014) ‘A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer’s disease’, *Nature*. Nature Publishing Group, 515(7526), pp. 274–278. doi: 10.1038/nature13800.
- Chong, F. P. *et al.* (2018) ‘Tau Proteins and Tauopathies in Alzheimer’s Disease’, *Cellular and Molecular Neurobiology*. Springer US, 38(5), pp. 965–980. doi: 10.1007/s10571-017-0574-1.
- Choy, R. W.-Y., Cheng, Z. and Schekman, R. (2012) ‘Amyloid precursor protein (APP) traffics from the cell surface via endosomes for amyloid β (A β) production in the *trans* -Golgi network’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(30), pp. E2077–E2082. doi: 10.1073/pnas.1208635109.
- Chung, K. M. *et al.* (2018) ‘Alzheimer’s disease and the autophagic-lysosomal system.’, *Neuroscience letters*, (May). doi: 10.1016/j.neulet.2018.05.017.
- Ciechanover, A. and Kwon, Y. T. (2015) ‘Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies’, *Experimental & Molecular Medicine*. Nature Publishing Group, 47(3), p. e147. doi: 10.1038/emm.2014.117.
- Ciechanover, A. and Kwon, Y. T. (2017) ‘Protein quality control by molecular chaperones in neurodegeneration’, *Frontiers in Neuroscience*, pp. 1–18. doi: 10.3389/fnins.2017.00185.
- Cipolat, S. *et al.* (2004) ‘OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(45), pp. 15927–15932. doi: 10.1073/pnas.0407043101.
- Clarris, H. J. *et al.* (1994) ‘Secretion of nerve growth factor from septum stimulates neurite outgrowth

- and release of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease from hippocampal explants', *Journal of Neuroscience Research*, 38(3), pp. 248–258. doi: 10.1002/jnr.490380303.
- Clavaguera, F. *et al.* (2009) 'Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain', *Nature cell biology*, 11(7), pp. 909–913. doi: 10.1038/ncb1901.
- Clavaguera, F. *et al.* (2013) 'Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(23), p. 9535. doi: 10.1073/pnas.1301175110.
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y. and Kirschner, M. W. (1977) 'Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly', *Journal of Molecular Biology*, 116(2), pp. 227–247.
- Coburger, I., Hoefgen, S. and Than, M. E. (2014) 'The structural biology of the amyloid precursor protein APP - A complex puzzle reveals its multi-domain architecture', *Biological Chemistry*, 395(5), pp. 485–498. doi: 10.1515/hsz-2013-0280.
- Colacurcio, D. J. *et al.* (2018) 'Dysfunction of autophagy and endosomal-lysosomal pathways: Roles in pathogenesis of Down syndrome and Alzheimer's Disease', *Free Radical Biology and Medicine*, 114(October), pp. 40–51. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.001.
- Cole, S. L. and Vassar, R. (2008) 'The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the β -secretase, in Alzheimer disease pathophysiology', *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), pp. 29621–29625. doi: 10.1074/jbc.R800015200.
- Collin, L. *et al.* (2014) 'Neuronal uptake of tau/pS422 antibody and reduced progression of tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease', *Brain: A Journal of Neurology*, 137(Pt 10), pp. 2834–2846. doi: 10.1093/brain/awu213.
- Congdon, E. E. and Sigurdsson, E. M. (2018) 'Tau-targeting therapies for Alzheimer disease', *Nature Reviews Neurology*. doi: 10.1038/s41582-018-0013-z.
- Contino, S. *et al.* (2017) 'Presenilin 2-dependent maintenance of mitochondrial oxidative capacity and morphology', *Frontiers in Physiology*, 8(OCT), pp. 1–11. doi: 10.3389/fphys.2017.00796.
- Coppola, G. *et al.* (2012) 'Evidence for a role of the rare p.A152T variant in mapp in increasing the risk for FTD-spectrum and Alzheimer's diseases', *Human Molecular Genetics*, 21(15), pp. 3500–3512. doi: 10.1093/hmg/dd161.

- Correia, S. C. *et al.* (2015) 'Alzheimer's disease-related misfolded proteins and dysfunctional organelles on autophagy menu.', *DNA and cell biology*, 34(4), pp. 261–273. doi: 10.1089/dna.2014.2757.
- Corrigan, F. *et al.* (2012) 'SAPP α rescues deficits in amyloid precursor protein knockout mice following focal traumatic brain injury', *Journal of Neurochemistry*, 122(1), pp. 208–220. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07761.x.
- Cousins, S. L. *et al.* (2009) 'Amyloid precursor protein 695 associates with assembled NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors to result in the enhancement of their cell surface delivery', *Journal of Neurochemistry*, 111(6), pp. 1501–1513. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06424.x.
- Coyle, J., Price, D. and DeLong, M. (1983) 'Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation', *Science*, 219(4589), pp. 1184–1190. doi: 10.1126/science.6338589.
- Crary, J. F. *et al.* (2014) 'Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging', *Acta Neuropathologica*, 128(6), pp. 755–766. doi: 10.1007/s00401-014-1349-0.
- Crismon, M. L. (1994) 'Tacrine: First drug approved for Alzheimer's Disease', *The Annals of Pharmacotherapy*, 28, pp. 744–751.
- Cruchaga, C. *et al.* (2012) 'Rare variants in APP, PSEN1 and PSEN2 increase risk for AD in late-onset Alzheimer's disease families', *PLoS ONE*, 7(2), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0031039.
- Cuchillo-Ibanez, I. *et al.* (2008) 'Phosphorylation of tau regulates its axonal transport by controlling its binding to kinesin', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(9), pp. 3186–3195. doi: 10.1096/fj.08-109181.
- Cummings, J. *et al.* (2017) 'Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017', *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*. Elsevier Inc., 3, pp. 367–384. doi: 10.1016/j.trci.2017.05.002.
- Cummings, J. *et al.* (2018) 'Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018', *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*. Elsevier Inc., 4, pp. 195–214. doi: 10.1016/j.trci.2018.03.009.
- Cupers, P. *et al.* (2001) 'The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by γ -secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture', *Journal of Neurochemistry*, 78(5), pp. 1168–1178. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00516.x.

- Dahlgren, K. N. *et al.* (2002) ‘Oligomeric and fibrillar species of amyloid- β peptides differentially affect neuronal viability’, *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), pp. 32046–32053. doi: 10.1074/jbc.M201750200.
- Dai, C.-L. *et al.* (2017) ‘Tau passive immunization inhibits not only tau but also A β pathology’, *Alzheimer’s Research & Therapy*, 9(1), p. 1. doi: 10.1186/s13195-016-0227-5.
- Dai, C. *et al.* (2018) ‘Tau passive immunization blocks seeding and spread of Alzheimer hyperphosphorylated Tau-induced pathology in 3 \times Tg-AD mice’, *Alzheimer’s Research & Therapy*, 10. doi: 10.1186/s13195-018-0341-7.
- Dai, M. *et al.* (2018) ‘The genes associated with early-onset Alzheimer’s disease’, *Oncotarget*, 9(19), pp. 15132–15143. doi: 10.18632/oncotarget.23738.
- Dai, R.-M. *et al.* (1998) ‘Involvement of Valosin-containing Protein, an ATPase Co-purified with I κ B α and 26 S Proteasome, in Ubiquitin-Proteasome-mediated Degradation of I κ B α ’, *Journal of Biological Chemistry*, 273(6), pp. 3562–3573. doi: 10.1074/jbc.273.6.3562.
- Dai, R. M. and Li, C. C. H. (2001) ‘Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation’, *Nature Cell Biology*, 3(8), pp. 740–744. doi: 10.1038/35087056.
- Dantuma, N. P., Acs, K. and Luijsterburg, M. S. (2014) ‘Should I stay or should I go: VCP/p97-mediated chromatin extraction in the DNA damage response’, *Experimental Cell Research*. Elsevier, 329(1), pp. 9–17. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.08.025.
- Danysz, W. and Parsons, C. G. (2003) ‘The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer’s disease: preclinical evidence’, *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 18(S1), pp. S23–S32. doi: 10.1002/gps.938.
- Dargemont, C. and Ossareh-Nazari, B. (2012) ‘Cdc48/p97, a key actor in the interplay between autophagy and ubiquitin/proteasome catabolic pathways’, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1823(1), pp. 138–144. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.07.011.
- Dartigues, J. F. *et al.* (2012) ‘Paquid 2012: illustration et bilan’, *Geriatric et Psychologie Neuropsychiatrie du Vieillissement*, 10(3), pp. 325–331. doi: 10.1684/pnv.2012.0353.
- Das, U. *et al.* (2013) ‘Activity-induced convergence of app and bace-1 in acidic microdomains via an endocytosis-dependent pathway’, *Neuron*. Elsevier Inc., 79(3), pp. 447–460. doi:

10.1016/j.neuron.2013.05.035.

Das, U. *et al.* (2015) ‘Visualizing APP and BACE-1 approximation in neurons yields insight into the amyloidogenic pathway’, *Nature Neuroscience*, 19(1), pp. 55–64. doi: 10.1038/nn.4188.

David, D. C. *et al.* (2005) ‘Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice’, *Journal of Biological Chemistry*, 280(25), pp. 23802–23814. doi: 10.1074/jbc.M500356200.

Davies, P. (1976) ‘SELECTIVE LOSS OF CENTRAL CHOLINERGIC NEURONS IN ALZHEIMER’S DISEASE’, *The Lancet*, 308(8000), p. 1403. doi: 10.1016/S0140-6736(76)91936-X.

Davis, K. L. (1999) ‘Cholinergic Markers in Elderly Patients With Early Signs of Alzheimer Disease’, *JAMA*, 281(15), p. 1401. doi: 10.1001/jama.281.15.1401.

Dawkins, E. and Small, D. H. (2014) ‘Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer’s disease’, *Journal of Neurochemistry*, 129(5), pp. 756–769. doi: 10.1111/jnc.12675.

Decock, M. *et al.* (2015) ‘Analysis by a highly sensitive split luciferase assay of the regions involved in APP dimerization and its impact on processing’, *FEBS Open Bio*, 5, pp. 763–773. doi: 10.1016/j.fob.2015.09.002.

Defenouillere, Q. *et al.* (2013) ‘Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(13), pp. 5046–5051. doi: 10.1073/pnas.1221724110.

Delabar, J. M. *et al.* (2016) ‘Changing Paradigms in Down Syndrome: The First International Conference of the Trisomy 21 Research Society’, *Molecular Syndromology*, 7(5), pp. 251–261. doi: 10.1159/000449049.

DeLaBarre, B. and Brunger, A. T. (2003) ‘Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains’, *Nature Structural Biology*, 10(10), pp. 856–863. doi: 10.1038/nsb972.

Delacourte, A. *et al.* (1999) ‘The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer’s disease.’, *Neurology*, 52(6), pp. 1158–65. doi: 10.1212/WNL.54.2.538.

Delacourte, A. *et al.* (2002) ‘Nonoverlapping but synergetic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer’s disease’, *Neurology*, 59(3), pp. 398–407. doi: 10.1212/WNL.59.3.398.

- Delacourte, A. and Defossez, A. (1986) 'Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments', *Journal of the Neurological Sciences*, 76(2–3), pp. 173–186. doi: 10.1016/0022-510X(86)90167-X.
- Despres, C. *et al.* (2017) 'Identification of the Tau phosphorylation pattern that drives its aggregation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(34), p. 201708448. doi: 10.1073/pnas.1708448114.
- Deyts, C., Thinakaran, G. and Parent, A. T. (2016) 'APP Receptor? To Be or Not to Be', *Trends in Pharmacological Sciences*, 37(5), pp. 390–411. doi: 10.1016/j.tips.2016.01.005.
- Dickey, C. A. *et al.* (2007) 'The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins', *Journal of Clinical Investigation*, 117(3), pp. 648–658. doi: 10.1172/JCI29715.
- Dickson, D. W. *et al.* (2012) 'Neuropathology of Frontotemporal Lobar Degeneration- Tau (FTLD-Tau)', *Journal of Molecular Neuroscience*, 45(3), pp. 384–389. doi: 10.1007/s12031-011-9589-0.Neuropathology.
- Dolan, P. J. *et al.* (2011) 'Decreases in valosin-containing protein result in increased levels of tau phosphorylated at Ser 262/356', *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies, 585(21), pp. 3424–3429. doi: 10.1016/j.febslet.2011.09.032.
- Domise, M. *et al.* (2016) 'AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology in vivo', *Scientific Reports*, 6(February), pp. 1–12. doi: 10.1038/srep26758.
- Doody, R. S. *et al.* (2014) 'Phase 3 trials of solanezumab for mild-to-moderate Alzheimer's disease', *The New England Journal of Medicine*, 370(4), pp. 311–321. doi: 10.1056/NEJMoa1312889.
- Drechsel, D. N. *et al.* (1992) 'Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau.', *Molecular Biology of the Cell*, 3(10), pp. 1141–1154. doi: 10.1091/mbc.3.10.1141.
- Drewes, G. *et al.* (1995) 'Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262', *The Journal of Biological Chemistry*, 270(13), pp. 7679–7688.
- Drewes, G. *et al.* (1997) 'MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-

associated proteins and trigger microtubule disruption', *Cell*, 89(2), pp. 297–308.

Dubois, B. *et al.* (2018) 'Cognitive and neuroimaging parameters and brain amyloidosis in individuals at risk of Alzheimer's disease (INSIGHT-preAD): a longitudinal observational study', *Lancet Neurology*, in press(18), pp. 1–12. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30029-2.

Dujardin, S. *et al.* (2014) 'Neuron-to-neuron wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies', *Acta Neuropathologica Communications*, 2, p. 14. doi: 10.1186/2051-5960-2-14.

Dumoulin, M. *et al.* (2003) 'A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme', *Nature*, 424(6950), pp. 783–788. doi: 10.1038/nature01870.

Dunys, J. *et al.* (2006) 'Catabolism of endogenous and overexpressed APH1a and PEN2: evidence for artifactual involvement of the proteasome in the degradation of overexpressed proteins.', *The Biochemical journal*, 394(Pt 2), pp. 501–9. doi: 10.1042/BJ20051197.

Duyckaerts, C. *et al.* (1997) 'Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status', *Neurobiology of Aging*, 18(3), pp. 267–273.

Duyckaerts, C. (2011) 'Tau pathology in children and young adults: Can you still be unconditionally baptist?', *Acta Neuropathologica*, 121(2), pp. 145–147. doi: 10.1007/s00401-010-0794-7.

Duyckaerts, C. *et al.* (2015) 'PART is part of Alzheimer disease', *Acta Neuropathologica*, 129(5), pp. 749–756. doi: 10.1007/s00401-015-1390-7.

Dyrks, T. *et al.* (1992) 'Amyloidogenicity of beta A4 and beta A4-bearing amyloid protein precursor fragments by metal-catalyzed oxidation.', *The Journal of biological chemistry*, 267(25), pp. 18210–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1517249>.

Dyrks, T. *et al.* (1992) 'Membrane inserted APP fragments containing the β A4 sequence of Alzheimer's disease do not aggregate', *FEBS Letters*, 309(1), pp. 20–24. doi: 10.1016/0014-5793(92)80730-5.

Edbauer, D. *et al.* (2002) 'Insulin-degrading enzyme rapidly removes the β -amyloid precursor protein intracellular domain (AICD)', *Journal of Biological Chemistry*, 277(16), pp. 13389–13393. doi: 10.1074/jbc.M111571200.

Edbauer, D. *et al.* (2003) 'Reconstitution of γ -secretase activity', *Nature Cell Biology*, 5(5), pp. 486–488. doi: 10.1038/ncb960.

- El-Agnaf, O. M. A. *et al.* (2000) 'Oligomerization and Toxicity of β -Amyloid-42 Implicated in Alzheimer's Disease', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273(3), pp. 1003–1007. doi: 10.1006/bbrc.2000.3051.
- Eldar-Finkelman, H. and Martinez, A. (2011) 'GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS.', *Frontiers in molecular neuroscience*, 4(October), p. 32. doi: 10.3389/fnmol.2011.00032.
- Ermolieff, J. *et al.* (2000) 'Proteolytic activation of recombinant pro-memapsin 2 (pro- β -secretase) studied with new fluorogenic substrates', *Biochemistry*, 39, pp. 12450–12456. doi: 10.1021/bi001494f.
- Erzurumlu, Y. *et al.* (2013) 'A unique IBMPFD-related P97/VCP mutation with differential binding pattern and subcellular localization', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Elsevier Ltd, 45(4), pp. 773–782. doi: 10.1016/j.biocel.2013.01.006.
- Esch, F. *et al.* (1990) 'Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor', *Science*, 248(4959), pp. 1122–1124. doi: 10.1126/science.2111583.
- Escobar-Khondiker, M. *et al.* (2007) 'Annonacin, a Natural Mitochondrial Complex I Inhibitor, Causes Tau Pathology in Cultured Neurons', *Journal of Neuroscience*, 27(29), pp. 7827–7837. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1644-07.2007.
- Evrard, C. *et al.* (2018) 'Contribution of the endosomal-lysosomal and proteasomal systems in Amyloid- β Precursor Protein derived fragments processing', *bioRxiv*, p. 300921. doi: 10.1101/300921.
- Ewers, M. *et al.* (2007) 'Multicenter assessment of CSF-phosphorylated tau for the prediction of conversion of MCI', *Neurology*, 69(24), pp. 2205–2212. doi: 10.1212/01.wnl.0000286944.22262.ff.
- F. Lichtenthaler, S. (2012) 'Alpha-Secretase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein: Proteolysis Regulated by Signaling Pathways and Protein Trafficking', *Current Alzheimer Research*, 9(2), pp. 165–177. doi: 10.2174/156720512799361655.
- Fagan, A. M. *et al.* (2006) 'Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid A β ₄₂ in humans', *Annals of Neurology*, 59(3), pp. 512–519. doi: 10.1002/ana.20730.
- Fang, L. *et al.* (2015) 'Mitochondrial function in neuronal cells depends on p97/VCP/Cdc48-mediated quality control.', *Frontiers in cellular neuroscience*, 9(February), p. 16. doi: 10.3389/fncel.2015.00016.
- Farizatto, K. L. G. *et al.* (2017) 'A β ₄₂-mediated proteasome inhibition and associated tau pathology in hippocampus are governed by a lysosomal response involving cathepsin B: Evidence for protective

- crosstalk between protein clearance pathways’, *PLoS ONE*, 12(8), pp. 1–26. doi: 10.1371/journal.pone.0182895.
- Farrer, L. A. (1997) ‘Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease’, *JAMA*, 278(16), p. 1349. doi: 10.1001/jama.1997.03550160069041.
- Farzan, M. *et al.* (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), pp. 9712–9717. doi: 10.1073/pnas.160115697.
- Fernández-Sáiz, V. and Buchberger, A. (2010) ‘Imbalances in p97 co-factor interactions in human proteinopathy’, *EMBO Reports*, 11(6), pp. 479–485. doi: 10.1038/embor.2010.49.
- Feyt, C. *et al.* (2007) ‘Phosphorylation of APP695 at Thr668 decreases γ -cleavage and extracellular A β ’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(4), pp. 1004–1010. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.036.
- Fischer, D. *et al.* (2009) ‘Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules’, *Biochemistry*, 48(42), pp. 10047–10055. doi: 10.1021/bi901090m.
- Fisher, S., Gearhart, J. D. and Oster-Granite, M. L. (1991) ‘Expression of the amyloid precursor protein gene in mouse oocytes and embryos.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(5), pp. 1779–1782. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.1779>.
- Flammang, B. *et al.* (2012) ‘Evidence that the amyloid- β protein precursor intracellular domain, AICD, derives from β -secretase-generated C-terminal fragment’, *Journal of Alzheimer’s Disease*, 30(1), pp. 145–153. doi: 10.3233/JAD-2012-112186.
- Flaten, V. *et al.* (2014) ‘From epidemiology to pathophysiology: what about caffeine in Alzheimer’s disease?’, *Biochemical Society Transactions*, 42(2), pp. 587–592. doi: 10.1042/BST20130229.
- Flierman, D. *et al.* (2003) ‘Polyubiquitin serves as a recognition signal, rather than a ratcheting molecule, during retrotranslocation of proteins across the endoplasmic reticulum membrane’, *Journal of Biological Chemistry*, 278(37), pp. 34774–34782. doi: 10.1074/jbc.M303360200.
- Flood, F. *et al.* (2005) ‘Proteasome-mediated effects on amyloid precursor protein processing at the gamma-secretase site.’, *The Biochemical journal*, 385(Pt 2), pp. 545–50. doi: 10.1042/BJ20041145.

- Folstein, M. F., Folstein, S. E. and McHugh, P. R. (1975) ““Mini-mental state””, *Journal of Psychiatric Research*, 12(3), pp. 189–198. doi: 10.1016/0022-3956(75)90026-6.
- Forman, M. S. *et al.* (2006) ‘Novel ubiquitin neuropathology in frontotemporal dementia with valosin-containing protein gene mutations’, *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 65(6), pp. 571–581.
- Francis, R. *et al.* (2002) ‘aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, γ -secretase cleavage of β APP, and presenilin protein accumulation’, *Developmental Cell*, 3(1), pp. 85–97. doi: 10.1016/S1534-5807(02)00189-2.
- Frank, S. *et al.* (2001) ‘The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis’, *Developmental Cell*, 1(4), pp. 515–525. doi: 10.1016/S1534-5807(01)00055-7.
- Franz, A., Ackermann, L. and Hoppe, T. (2014) ‘Create and preserve: Proteostasis in development and aging is governed by Cdc48/p97/VCP’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1843(1), pp. 205–215. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.03.031.
- Franz, A., Ackermann, L. and Hoppe, T. (2016) ‘Ring of change: CDC48/p97 drives protein dynamics at chromatin’, *Frontiers in Genetics*, 7(MAY), pp. 1–14. doi: 10.3389/fgene.2016.00073.
- Frappier, T. F. *et al.* (1994) ‘tau Regulation of microtubule-microtubule spacing and bundling’, *Journal of Neurochemistry*, 63(6), pp. 2288–2294.
- Fraser, P. E. (2014) ‘Prions and prion-like proteins’, *The Journal of Biological Chemistry*, 289(29), pp. 19839–19840. doi: 10.1074/jbc.R114.583492.
- Frautschy, S. A. *et al.* (1998) ‘Protease inhibitor coinfusion with amyloid beta-protein results in enhanced deposition and toxicity in rat brain.’, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(20), pp. 8311–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9763475>.
- Fredriksson, S. *et al.* (2002) ‘Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays’, *Nature Biotechnology*, 20(5), pp. 473–477. doi: 10.1038/nbt0502-473.
- Freude, K. K. *et al.* (2011) ‘Soluble amyloid precursor protein induces rapid neural differentiation of human embryonic stem cells’, *Journal of Biological Chemistry*, 286(27), pp. 24264–24274. doi: 10.1074/jbc.M111.227421.
- Friedrich, R. P. *et al.* (2010) ‘Mechanism of amyloid plaque formation suggests an intracellular basis

of A pathogenicity', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5), pp. 1942–1947. doi: 10.1073/pnas.0904532106.

Frohl, K. *et al.* (1991) 'Yeast Cel 1 Cycle Protein CDC48p Shows Ful 1 -Length Homology to the Mammalian Protein VCP and Is a Member of a Protein Family Involved in Secretion, Peroxisome Formation, and Gene Expression', 114(3). Available at: <http://jcb.rupress.org/content/jcb/114/3/443.full.pdf>.

Frost, B. *et al.* (2014) 'Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation', *Nature Neuroscience*, 17(3), pp. 357–366. doi: 10.1038/nn.3639.

Frost, B., Jacks, R. L. and Diamond, M. I. (2009) 'Propagation of Tau Misfolding from the Outside to the Inside of a Cell', *The Journal of Biological Chemistry*, 284(19), pp. 12845–12852. doi: 10.1074/jbc.M808759200.

Fukumoto, H. *et al.* (2002) 'Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease.', *Archives of neurology*, 59(9), pp. 1381–9. doi: 10.1001/archneur.59.9.1381.

Funamoto, S. *et al.* (2004) 'Truncated Carboxyl-Terminal Fragments of β -Amyloid Precursor Protein Are Processed to Amyloid β -Proteins 40 and 42[†]', *Biochemistry*, 43(42), pp. 13532–13540. doi: 10.1021/bi049399k.

Furukawa, K. *et al.* (2002) 'Increased Activity-Regulating and Neuroprotective Efficacy of α -Secretase-Derived Secreted Amyloid Precursor Protein Conferred by a C-Terminal Heparin-Binding Domain', *Journal of Neurochemistry*, 67(5), pp. 1882–1896. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67051882.x.

Furukawa, K. and Mattson, M. P. (1998) 'Secreted amyloid precursor protein alpha selectively suppresses N-methyl-D-aspartate currents in hippocampal neurons: involvement of cyclic GMP.', *Neuroscience*, 83(2), pp. 429–38. doi: S0306452297003989 [pii].

Gakhar-Koppole, N. *et al.* (2008) 'Activity requires soluble amyloid precursor protein α to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway', *European Journal of Neuroscience*, 28(5), pp. 871–882. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06398.x.

Gandhi, N. S. *et al.* (2015) 'A phosphorylation-induced turn defines the Alzheimer's disease AT8 antibody epitope on the tau protein', *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(23), pp. 6819–6823. doi: 10.1002/anie.201501898.

- Gauss, R., Sommer, T. and Jarosch, E. (2006) 'The Hrd1p ligase complex forms a linchpin between ER-lumenal substrate selection and Cdc48p recruitment', *EMBO Journal*, 25(9), pp. 1827–1835. doi: 10.1038/sj.emboj.7601088.
- Gauthier, S. *et al.* (2016) 'Efficacy and safety of tau-aggregation inhibitor therapy in patients with mild or moderate Alzheimer's disease: a randomised, controlled, double-blind, parallel-arm, phase 3 trial', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 388(10062), pp. 2873–2884. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31275-2.
- Gay, M. *et al.* (2018) 'New phenylaniline derivatives as modulators of amyloid protein precursor metabolism', *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. Elsevier Ltd, 26, pp. 2151–2164. doi: 10.1016/j.bmc.2018.03.016.
- De Genst, E. J. *et al.* (2010) 'Structure and properties of a complex of α -synuclein and a single-domain camelid antibody', *Journal of Molecular Biology*, 402(2), pp. 326–343. doi: 10.1016/j.jmb.2010.07.001.
- Ghavami, S. *et al.* (2014) 'Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders', *Progress in Neurobiology*. Elsevier Ltd, 112, pp. 24–49. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.10.004.
- Ghislain, M. *et al.* (1996) 'Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*.' *The EMBO journal*, 15(18), pp. 4884–99. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=452226&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Ghosal, K. *et al.* (2009) 'Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(43), pp. 18367–18372. doi: 10.1073/pnas.0907652106.
- Ghosh, A. K. and Osswald, H. L. (2014) 'BACE1 (β -secretase) inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease', *Chem. Soc. Rev.* Royal Society of Chemistry, 43, pp. 6765–6813. doi: 10.1039/C3CS60460H.
- Giaccone, G. *et al.* (2010) 'Neuropathology of the recessive A673V APP mutation: Alzheimer disease with distinctive features', *Acta Neuropathologica*, 120(6), pp. 803–812. doi: 10.1007/s00401-010-0747-1.
- Giliberto, L. *et al.* (2010) 'Transgenic expression of the amyloid- β precursor protein-intracellular domain does not induce Alzheimer's disease-like traits in vivo', *PLoS ONE*, 5(7), pp. 1–9. doi:

10.1371/journal.pone.0011609.

Gitcho, M. A. *et al.* (2009) 'VCP mutations causing frontotemporal lobar degeneration disrupt localization of TDP-43 and induce cell death', *Journal of Biological Chemistry*, 284(18), pp. 12384–12398. doi: 10.1074/jbc.M900992200.

Giuffrida, M. L. *et al.* (2009) ' -Amyloid Monomers Are Neuroprotective', *Journal of Neuroscience*, 29(34), pp. 10582–10587. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1736-09.2009.

Giustiniani, J. *et al.* (2015) 'The FK506-binding protein FKBP52 in vitro induces aggregation of truncated Tau forms with prion-like behavior', *FASEB Journal*, 29(8), pp. 3171–3181. doi: 10.1096/fj.14-268243.

Glenner, G. G. and Wong, C. W. (1984) 'Alzheimer's disease and Down's syndrome: Sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 122(3), pp. 1131–1135. doi: 10.1016/0006-291X(84)91209-9.

Goate, A. *et al.* (1991) 'Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease', *Nature*, 349(6311), pp. 704–706. doi: 10.1038/349704a0.

Goedert, M. *et al.* (1989) 'Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain', *The EMBO journal*, 8(2), pp. 393–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=400819&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

Goedert, M. *et al.* (1989) 'Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease', *Neuron*, 3(4), pp. 519–526.

Goedert, M., Masuda-Suzukake, M. and Falcon, B. (2017) 'Like prions: the propagation of aggregated tau and α -synuclein in neurodegeneration', *Brain: A Journal of Neurology*, 140(2), pp. 266–278. doi: 10.1093/brain/aww230.

Golde, T. E. *et al.* (1990) 'Expression of β amyloid protein precursor mRNAs: Recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in alzheimer's disease using PCR', *Neuron*, 4(2), pp. 253–267. doi: 10.1016/0896-6273(90)90100-T.

Golde, T. E. *et al.* (2013) ' γ -Secretase inhibitors and modulators', *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. Elsevier B.V., 1828(12), pp. 2898–2907. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.06.005.

- Goldgaber, D. *et al.* (1987) 'Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease.', *Science (New York, N.Y.)*, 235(4791), pp. 877–80. doi: 10.1126/science.3810169.
- Gómez-Isla, T. *et al.* (1997) 'Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease', *Annals of Neurology*, 41(1), pp. 17–24. doi: 10.1002/ana.410410106.
- Gómez de Barreda, E. *et al.* (2010) 'Tau deficiency leads to the upregulation of BAF-57, a protein involved in neuron-specific gene repression', *FEBS Letters*, 584(11), pp. 2265–2270. doi: 10.1016/j.febslet.2010.03.032.
- González, A. E. *et al.* (2017) 'Autophagosomes cooperate in the degradation of intracellular C-terminal fragments of the amyloid precursor protein via the MVB/lysosomal pathway', *FASEB Journal*, 31(6), pp. 2446–2459. doi: 10.1096/fj.201600713R.
- Goode, B. L. *et al.* (1997) 'Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly', *Molecular Biology of the Cell*, 8(2), pp. 353–365.
- Goodger, Z. V. *et al.* (2009) 'Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway', *Journal of Cell Science*, 122(20), pp. 3703–3714. doi: 10.1242/jcs.048090.
- Goodman, Y. and Mattson, M. P. (1994) 'Secreted forms of β -amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid β -peptide-induced oxidative injury', *Experimental Neurology*, 128(1), pp. 1–12. doi: 10.1006/exnr.1994.1107.
- Götz, J. *et al.* (2001) 'Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils', *Science*, 293(5534), pp. 1491–1495. doi: 10.1126/science.1062097.
- Goutte, C. *et al.* (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 of the United States of America*, 99(2), pp. 775–9. doi: 10.1073/pnas.022523499.
- Gowing, E. *et al.* (1994) 'Chemical characterization of A β 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease', *Journal of Biological Chemistry*, 269(15), pp. 10987–10990.
- Greenfield, J. P. *et al.* (1999) 'Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta-amyloid peptides.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), pp. 742–747. doi: 10.1073/pnas.96.2.742.

- Grober, E. *et al.* (1999) 'Memory and mental status correlates of modified Braak staging', *Neurobiology of Aging*, 20(6), pp. 573–579.
- Groemer, T. W. *et al.* (2011) 'Amyloid precursor protein is trafficked and secreted via synaptic vesicles', *PLoS ONE*, 6(4). doi: 10.1371/journal.pone.0018754.
- Grundke-Iqbal, I. *et al.* (1986) 'Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13), pp. 4913–7. doi: 10.1073/pnas.83.13.4913.
- Gu, Y. *et al.* (2001) 'Distinct Intramembrane Cleavage of the β -Amyloid Precursor Protein Family Resembling γ -Secretase-like Cleavage of Notch', *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), pp. 35235–35238. doi: 10.1074/jbc.C100357200.
- Gu, Y. *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), pp. 7374–7380. doi: 10.1074/jbc.M209499200.
- Le Guennec, K. *et al.* (2017) '17q21.31 duplication causes prominent tau-related dementia with increased MAPT expression', *Molecular Psychiatry*. Nature Publishing Group, 22(8), pp. 1119–1125. doi: 10.1038/mp.2016.226.
- Gugliotta, G. *et al.* (2017) 'Valosin-Containing Protein/p97 as a Novel Therapeutic Target in Acute Lymphoblastic Leukemia', *Neoplasia (United States)*. The Authors, 19(10), pp. 750–761. doi: 10.1016/j.neo.2017.08.001.
- Guo, T., Noble, W. and Hanger, D. P. (2017a) 'Roles of tau protein in health and disease', *Acta Neuropathologica*. Springer Berlin Heidelberg, 133(5), pp. 665–704. doi: 10.1007/s00401-017-1707-9.
- Guo, T., Noble, W. and Hanger, D. P. (2017b) 'Roles of tau protein in health and disease', *Acta Neuropathologica*, 133(5), pp. 665–704. doi: 10.1007/s00401-017-1707-9.
- Gustke, N. *et al.* (1994) 'Domains of tau protein and interactions with microtubules', *Biochemistry*, 33(32), pp. 9511–9522.
- Haass, C. *et al.* (1992) 'Targeting of cell-surface β -amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments', *Nature*, 357(6378), pp. 500–503. doi: 10.1038/357500a0.
- Haass, C. *et al.* (1993) ' β -Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular

mechanisms', *Journal of Biological Chemistry*, 268(5), pp. 3021–3024.

Haass, C. *et al.* (2012) 'Trafficking and proteolytic processing of APP', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(5), pp. 1–25. doi: 10.1101/cshperspect.a006270.

Haass, C. and Selkoe, D. J. (2007) 'Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(2), pp. 101–112. doi: 10.1038/nrm2101.

Haines, D. S. (2010) 'p97-containing complexes in proliferation control and cancer: Emerging culprits or Guilt by association?', *Genes and Cancer*, 1(7), pp. 753–763. doi: 10.1177/1947601910381381.

Halawani, D. *et al.* (2009) 'Hereditary Inclusion Body Myopathy-Linked p97/VCP Mutations in the NH2 Domain and the D1 Ring Modulate p97/VCP ATPase Activity and D2 Ring Conformation', *Molecular and Cellular Biology*, 29(16), pp. 4484–4494. doi: 10.1128/MCB.00252-09.

Halawani, D. *et al.* (2010) 'Identification of Caspase-6-mediated processing of the valosin containing protein (p97) in Alzheimer's disease: a novel link to dysfunction in ubiquitin proteasome system-mediated protein degradation.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(17), pp. 6132–6142. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5874-09.2010.

Ben Halima, S. *et al.* (2016) 'Specific Inhibition of β -Secretase Processing of the Alzheimer Disease Amyloid Precursor Protein', *Cell Reports*, 14, pp. 2127–2141. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.076.

Hamano, T. *et al.* (2008) 'Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression', *European Journal of Neuroscience*, 27(5), pp. 1119–1130. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06084.x.

Hamazaki, H. (1996) 'Cathepsin D is involved in the clearance of Alzheimer's β -amyloid protein', *FEBS Letters*, 396(2–3), pp. 139–142. doi: 10.1016/0014-5793(96)01087-3.

Hamdane, M. *et al.* (2003) 'Mitotic-like tau phosphorylation by p25-Cdk5 kinase complex', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(36), pp. 34026–34034. doi: 10.1074/jbc.M302872200.

Hamers-Casterman, C. *et al.* (1993) 'Naturally occurring antibodies devoid of light chains', *Nature*, 363(6428), pp. 446–448. doi: 10.1038/363446a0.

Hampel, H. *et al.* (2015) 'Advances in the therapy of Alzheimer's disease: targeting amyloid beta and tau and perspectives for the future.', *Expert review of neurotherapeutics*, 15(1), pp. 83–105. doi: 10.1586/14737175.2015.995637.

- Hansson, O. *et al.* (2007) 'Prediction of Alzheimer's disease using the CSF A β 42/A β 40 ratio in patients with mild cognitive impairment', *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 23(5), pp. 316–320. doi: 10.1159/000100926.
- Hänzelmann, P. and Schindelin, H. (2016) 'Structural Basis of ATP Hydrolysis and Intersubunit Signaling in the AAA+ ATPase p97', *Structure*, 24(1), pp. 127–139. doi: 10.1016/j.str.2015.10.026.
- Hänzelmann, P. and Schindelin, H. (2017) 'The Interplay of Cofactor Interactions and Post-translational Modifications in the Regulation of the AAA+ ATPase p97', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4(April), pp. 1–22. doi: 10.3389/fmolb.2017.00021.
- Hardy, J. A. *et al.* (1992) 'Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis', *Science*, 256(5054), pp. 184–185. doi: 10.1155/2012/369808.
- Harold, D. *et al.* (2009) 'Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease', *Nature Genetics*, 41(10), pp. 1088–1093. doi: 10.1038/ng.440.
- Hayashi, Y. *et al.* (1994) 'Alzheimer amyloid protein precursor enhances proliferation of neural stem cells from fetal rat brain', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 205(1), pp. 936–943. doi: 10.1006/bbrc.1994.2755.
- He, G. *et al.* (2006) 'Ubiquitin-proteasome pathway mediates degradation of APH-1', *Journal of Neurochemistry*, 99(5), pp. 1403–1412. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04184.x.
- He, G. *et al.* (2007) 'Degradation of nicastrin involves both proteasome and lysosome', *Journal of Neurochemistry*, 101(4), pp. 982–992. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04449.x.
- He, Y. *et al.* (2012) 'Soluble oligomers and fibrillar species of amyloid β -peptide differentially affect cognitive functions and hippocampal inflammatory response', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 429(3–4), pp. 125–130. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.129.
- He, Z. *et al.* (2018) 'Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 24(1), pp. 29–38. doi: 10.1038/nm.4443.
- Henley, D. B. *et al.* (2014) 'Safety profile of semagacestat, a gamma-secretase inhibitor: IDENTITY trial findings', *Current Medical Research and Opinion*, 30(10), pp. 2021–2032. doi: 10.1185/03007995.2014.939167.
- Henriques, A. D. *et al.* (2018) 'Fluid and imaging biomarkers for Alzheimer's disease: Where we stand

- and where to head to', *Experimental Gerontology*, 107(May 2017), pp. 169–177. doi: 10.1016/j.exger.2018.01.002.
- Heo, J. M. *et al.* (2010) 'A Stress-Responsive System for Mitochondrial Protein Degradation', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 40(3), pp. 465–480. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.021.
- Her, N. G. *et al.* (2016) 'p97 Composition Changes Caused by Allosteric Inhibition Are Suppressed by an On-Target Mechanism that Increases the Enzyme's ATPase Activity', *Cell Chemical Biology*. Elsevier Ltd, 23(4), pp. 517–528. doi: 10.1016/j.chembiol.2016.03.012.
- Hérard, A. S. *et al.* (2006) 'siRNA targeted against amyloid precursor protein impairs synaptic activity in vivo', *Neurobiology of Aging*, 27(12), pp. 1740–1750. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.10.020.
- Herreman, A. *et al.* (2003) ' γ -Secretase activity requires the presenilin-dependent trafficking of nicastrin through the Golgi apparatus but not its complex glycosylation'. doi: 10.1242/jcs.00292.
- Hesse, R. *et al.* (2018) 'sAPP β and sAPP α increase structural complexity and E/I input ratio in primary hippocampal neurons and alter Ca²⁺ homeostasis and CREB1-signaling', *Experimental Neurology*. Elsevier, 304(November 2017), pp. 1–13. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.02.010.
- Hippius, H. and Neundörfer, G. (2003) 'The discovery of Alzheimer's disease', *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 5(1), pp. 101–108. doi: 10.1055/s-2008-1026558.
- Hirabayashi, M. *et al.* (2001) 'VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration.', *Cell death and differentiation*, 8(10), pp. 977–84. doi: 10.1038/sj.cdd.4400907.
- Ho, L. *et al.* (2004) 'Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.', *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(7), pp. 902–904. doi: 10.1096/fj.03-0978fje.
- Hof, P. R. *et al.* (1992) 'Distribution of neurofibrillary tangles and senile plaques in the cerebral cortex in postencephalitic parkinsonism', *Neuroscience Letters*, 139(1), pp. 10–14.
- Hof, P. R. *et al.* (1994) 'Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam: quantitative neuropathology, immunohistochemical analysis of neuronal vulnerability, and comparison with related neurodegenerative disorders', *Acta Neuropathologica*, 88(5), pp. 397–404.
- Höglinger, G. U. *et al.* (2005) 'The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy', *Journal of Neurochemistry*, 95(4), pp. 930–939. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03493.x.

- Höllerhage, M. *et al.* (2009) 'Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies', *Experimental Neurology*, 220(1), pp. 133–142. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.08.004.
- Holmes, B. B. *et al.* (2013) 'Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(33), pp. E3138–E3147. doi: 10.1073/pnas.1301440110.
- Holmes, B. B. and Diamond, M. I. (2014) 'Prion-like Properties of Tau Protein: The Importance of Extracellular Tau as a Therapeutic Target', *The Journal of Biological Chemistry*, 289(29), pp. 19855–19861. doi: 10.1074/jbc.R114.549295.
- Holtzman, D. M. *et al.* (2016) 'Tau: From research to clinical development', *Alzheimer's & Dementia*, 12(10), pp. 1033–1039. doi: 10.1016/j.jalz.2016.03.018.
- Hook, G. *et al.* (2014) 'Brain pyroglutamate amyloid- β is produced by cathepsin b and is reduced by the cysteine protease inhibitor E64d, representing a potential alzheimer's disease therapeutic', *Journal of Alzheimer's Disease*, 41(1), pp. 129–149. doi: 10.3233/JAD-131370.
- Hook, V. *et al.* (2005) 'Inhibition of cathepsin B reduces β -amyloid production in regulated secretory vesicles of neuronal chromaffin cells: Evidence for cathepsin B as a candidate β -secretase of Alzheimer's disease', *Biological Chemistry*, 386(9), pp. 931–940. doi: 10.1515/BC.2005.108.
- Hook, V. Y. H., Kindy, M. and Hook, G. (2008) 'Inhibitors of cathepsin B improve memory and reduce β -amyloid in transgenic Alzheimer disease mice expressing the wild-type, but not the Swedish mutant, β -secretase site of the amyloid precursor protein', *Journal of Biological Chemistry*, 283(12), pp. 7745–7753. doi: 10.1074/jbc.M708362200.
- Hoover, B. R. *et al.* (2010) 'Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration', *Neuron*, 68(6), pp. 1067–1081. doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.030.
- Hoyle, J., Tan, K. H. and Fisher, E. M. C. (1997) 'Mapping the valosin-containing protein (VCP) gene on human chromosome 9 and mouse chromosome 4, and a likely pseudogene on the mouse X chromosome', *Mammalian Genome*, 8(10), pp. 778–780. doi: 10.1007/s003359900566.
- Hu, W. *et al.* (2016) 'Hyperphosphorylation determines both the spread and the morphology of tau pathology', *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 12(10), pp. 1066–1077. doi: 10.1016/j.jalz.2016.01.014.

- Hu, Y. *et al.* (2016) ‘Tau accumulation impairs mitophagy via increasing mitochondrial membrane potential and reducing mitochondrial Parkin’, *Oncotarget*, 7(14), pp. 17356–17368. doi: 10.18632/oncotarget.7861.
- Hua, Q. and He, R. Q. (2003) ‘Tau could protect DNA double helix structure’, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1645(2), pp. 205–211. doi: 10.1016/S1570-9639(02)00538-1.
- Huang, S., Tang, D. and Wang, Y. (2016) ‘Monoubiquitination of Syntaxin 5 Regulates Golgi Membrane Dynamics during the Cell Cycle’, *Developmental Cell*. Elsevier Inc., 38(1), pp. 73–85. doi: 10.1016/j.devcel.2016.06.001.
- Huang, Y. W. A. *et al.* (2017) ‘ApoE2, ApoE3, and ApoE4 Differentially Stimulate APP Transcription and A β Secretion’, *Cell*, 168(3), p. 427–441.e21. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.044.
- Hung, S.-Y. and Fu, W.-M. (2017) ‘Drug candidates in clinical trials for Alzheimer’s disease’, *Journal of Biomedical Science*, 24(1), p. 47. doi: 10.1186/s12929-017-0355-7.
- Hunter, S. and Brayne, C. (2018) ‘Understanding the roles of mutations in the amyloid precursor protein in Alzheimer disease’, *Molecular Psychiatry*. Nature Publishing Group, 23(1), pp. 81–93. doi: 10.1038/mp.2017.218.
- Huse, J. T. *et al.* (2000) ‘Maturation and Endosomal Targeting of β -Site Amyloid Precursor Protein-cleaving Enzyme’, *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), pp. 33729–33737. doi: 10.1074/jbc.M004175200.
- Huse, J. T. *et al.* (2002) ‘ β -secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer’s disease brain’, *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), pp. 16278–16284. doi: 10.1074/jbc.M111141200.
- Hussain, I. *et al.* (1999) ‘Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as β -secretase’, *Molecular and Cellular Neurosciences*, 14(6), pp. 419–427. doi: 10.1006/mcne.1999.0811.
- Ihara, Y. *et al.* (1986) ‘COMMUNICATION Phosphorylated Filaments Tau Protein Is Integrated into Paired Helical in Alzheimer’s Antisera to paired helical filaments (PHF) were found to contain a significant amount of tau antibodies specific for a phosphorylated form , but only a’, *Journal of Biochemistry*, 99(6), pp. 1807–1810. doi: 10.1097/00002093-198701030-00016.
- Imtiaz, B. *et al.* (2014) ‘Future directions in Alzheimer’s disease from risk factors to prevention’,

- Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 88(4), pp. 661–670. doi: 10.1016/j.bcp.2014.01.003.
- Iqbal, K. *et al.* (1974) ‘Protein changes in senile dementia’, *Brain Research*, 77(2), pp. 337–343.
- Iqbal, K. *et al.* (1986) ‘Defective brain microtubule assembly in Alzheimer’s disease’, *Lancet (London, England)*, 2(8504), pp. 421–426.
- Iqbal, K., Liu, F. and Gong, C.-X. (2016) ‘Tau and neurodegenerative disease: the story so far’, *Nature Reviews. Neurology*, 12(1), pp. 15–27. doi: 10.1038/nrneurol.2015.225.
- Ittner, L. M. *et al.* (2010a) ‘Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer’s disease mouse models’, *Cell*, 142(3), pp. 387–397. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.036.
- Ittner, L. M. *et al.* (2010b) ‘Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in alzheimer’s disease mouse models’, *Cell*, 142(3), pp. 387–397. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.036.
- Ittner, L. M. and Götz, J. (2011) ‘Amyloid- β and tau - A toxic pas de deux in Alzheimer’s disease’, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 12(2), pp. 67–72. doi: 10.1038/nrn2967.
- Iwatsubo, T. *et al.* (1994) ‘Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43).’, *Neuron*, 13(1), pp. 45–53. doi: 10.1016/0896-6273(94)90458-8.
- Jack, C. R. *et al.* (1992) ‘volumetry in the diagnosis of Alzheimer ’ s disease’, (January).
- Jäckle, F. *et al.* (2015) ‘Metalloprotease meprin β is activated by transmembrane serine protease matriptase-2 at the cell surface thereby enhancing APP shedding’, *Biochemical Journal*, 470(1), pp. 91–103. doi: 10.1042/BJ20141417.
- Jang, H. *et al.* (2010) ‘Truncated β -amyloid peptide channels provide an alternative mechanism for Alzheimer’s Disease and Down syndrome’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(14), pp. 6538–6543. doi: 10.1073/pnas.0914251107.
- Jang, J. K. *et al.* (2017a) ‘Selenoprotein S is required for clearance of C99 through endoplasmic reticulum-associated degradation’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 486(2), pp. 444–450. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.060.
- Jang, J. K. *et al.* (2017b) ‘Selenoprotein S is required for clearance of C99 through endoplasmic reticulum-associated degradation’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(2), pp. 444–450. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.03.060.

- Janus, C. *et al.* (2000) 'A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease', *Nature*, 408(6815), pp. 979–982. doi: 10.1038/35050110.
- Jarosz-Griffiths, H. H. *et al.* (2016) 'Amyloid-beta Receptors: The Good, the Bad, and the Prion Protein', *J Biol Chem*, 291(7), pp. 3174–3183. doi: 10.1074/jbc.R115.702704.
- Jarrett, J. T., Berger, E. P. and Lansbury, P. T. (1993a) '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), pp. 4693–7. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb23043.x.
- Jarrett, J. T., Berger, E. P. and Lansbury, P. T. (1993b) 'The carboxy terminus of the β amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease.', *Biochemistry*, 32(18), pp. 4693–7. doi: 10.1021/bi00069a001.
- Jefferson, T. *et al.* (2011) 'Metalloprotease Meprin β Generates Nontoxic N-terminal Amyloid Precursor Protein Fragments in Vivo', *Journal of Biological Chemistry*, 286(31), pp. 27741–27750. doi: 10.1074/jbc.M111.252718.
- Jeganathan, S. *et al.* (2008) 'The natively unfolded character of Tau and its aggregation to Alzheimer-like paired helical filaments', *Biochemistry*, 47(40), pp. 10526–10539. doi: 10.1021/bi800783d.
- Jho, Y. S. *et al.* (2010) 'Monte carlo simulations of tau proteins: effect of phosphorylation', *Biophysical Journal*, 99(8), pp. 2387–2397. doi: 10.1016/j.bpj.2010.06.056.
- Ji, X. R. *et al.* (2018) 'Dysfunction of different cellular degradation pathways contributes to specific β -amyloid42-induced pathologies', *FASEB Journal*, 32(3), pp. 1375–1387. doi: 10.1096/fj.201700199RR.
- Jiao, S.-S. *et al.* (2016) 'Brain-derived neurotrophic factor protects against tau-related neurodegeneration of Alzheimer's disease', *Translational Psychiatry*, 6(10), p. e907. doi: 10.1038/tp.2016.186.
- Jimenez-Palomares, M. *et al.* (2012) 'Increased A production prompts the onset of glucose intolerance and insulin resistance', *AJP: Endocrinology and Metabolism*, 302(11), pp. E1373–E1380. doi: 10.1152/ajpendo.00500.2011.
- Jin, L. W. *et al.* (1994) 'Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 14(9), pp. 5461–70. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8083748>.

Jin, S. C. *et al.* (2012) 'Pooled-DNA sequencing identifies novel causative variants in PSEN1, GRN and MAPT in a clinical early-onset and familial Alzheimer's disease Ibero-American cohort', *Alzheimer's Research and Therapy*, 4(4), pp. 1–9. doi: 10.1186/alzrt137.

Johnson, A. E. *et al.* (2015) 'VCP-dependent muscle degeneration is linked to defects in a dynamic tubular lysosomal network in vivo', *eLife*, 4(JULY2015), pp. 1–20. doi: 10.7554/eLife.07366.001.

Johnson, J. O. *et al.* (2010) 'Exome Sequencing Reveals VCP Mutations as a Cause of Familial ALS', *Neuron*, 68(5), pp. 857–864. doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.036.

Jonsson, T. *et al.* (2012) 'A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline', *Nature*, 488(7409), p. 96. doi: 10.1038/nature11283.

Josephs, K. A. *et al.* (2008) 'β-amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy', *Annals of Neurology*, 63(2), pp. 204–212. doi: 10.1002/ana.21223.

Joshi, G. and Wang, Y. (2015) 'Golgi defects enhance APP amyloidogenic processing in Alzheimer's disease', *BioEssays*, 37(3), pp. 240–247. doi: 10.1002/bies.201400116.

Ju, J. S. *et al.* (2009) 'Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease', *Journal of Cell Biology*, 187(6), pp. 875–888. doi: 10.1083/jcb.200908115.

Ju, J. S. and Weihl, C. C. (2010) 'Inclusion body myopathy, Paget's disease of the bone and fronto-temporal dementia: A disorder of autophagy', *Human Molecular Genetics*, 19(R1), pp. 38–45. doi: 10.1093/hmg/ddq157.

Jun, G. *et al.* (2016) 'A novel Alzheimer disease locus located near the gene encoding tau protein', *Molecular Psychiatry*, 21(1), pp. 108–117. doi: 10.1038/mp.2015.23.

Kadavath, H. *et al.* (2015) 'Folding of the Tau Protein on Microtubules', *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 54(35), pp. 10347–10351. doi: 10.1002/anie.201501714.

El Kadmiri, N. *et al.* (2013) 'Genetic aspects of Alzheimer's disease (Review)', *Pathologie Biologie*, 61(6), pp. 228–238. doi: 10.1016/j.patbio.2013.04.001.

Kaether, C. *et al.* (2006) 'Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated after transport of their precursors to the cell surface', *Traffic*, 7(4), pp. 408–415. doi: 10.1111/j.1600-0854.2006.00396.x.

- Kakuda, N. *et al.* (2006) 'Equimolar production of amyloid β -protein and amyloid precursor protein intracellular domain from β -carboxyl-terminal fragment by γ -secretase', *Journal of Biological Chemistry*, 281(21), pp. 14776–14786. doi: 10.1074/jbc.M513453200.
- Kandimalla, R. *et al.* (2016) 'Reduced dynamin-related protein 1 protects against phosphorylated Tau-induced mitochondrial dysfunction and synaptic damage in Alzheimer's disease', *Human Molecular Genetics*, 25(22), pp. 4881–4897. doi: 10.1093/hmg/ddw312.
- Kaneko, M. *et al.* (2010) 'Loss of HRD1-Mediated Protein Degradation Causes Amyloid Precursor Protein Accumulation and Amyloid- Generation', *Journal of Neuroscience*, 30(11), pp. 3924–3932. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2422-09.2010.
- Kang, J.-S. *et al.* (2008) 'Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation', *Cell*, 132(1), pp. 137–148. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.024.
- Kang, J. *et al.* (1987) 'The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor', *Nature*, pp. 733–736. doi: 10.1038/325733a0.
- Kant, R. Van Der and Goldstein, L. S. B. (2015) 'Review Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia', *Developmental Cell*. Elsevier Inc., 32(4), pp. 502–515. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.022.
- Kar, S. *et al.* (2003) 'Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol', *The EMBO journal*, 22(1), pp. 70–77. doi: 10.1093/emboj/cdg001.
- Katsinelos, T. *et al.* (2018) 'Unconventional Secretion Mediates the Trans-cellular Spreading of Tau', *Cell Reports*, 23(7), pp. 2039–2055. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.056.
- Katsuragi, Y., Ichimura, Y. and Komatsu, M. (2015) 'p62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor', *FEBS Journal*, p. n/a-n/a. doi: 10.1111/febs.13540.
- Kaufman, S. K. *et al.* (2016) 'Tau prion strains dictate patterns of cell pathology, progression rate, and regional vulnerability in vivo', *Neuron*, 92(4), pp. 796–812. doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.055.
- Kerppola, T. K. (2008) 'Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis as a Probe of Protein Interactions in Living Cells', *Annual Review of Biophysics*, 37(1), pp. 465–487. doi: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125842.
- Ben Khalifa, N. *et al.* (2012) 'Structural features of the KPI domain control APP dimerization, trafficking, and processing', *The FASEB Journal*, 26(2), pp. 855–867. doi: 10.1096/fj.11-190207.

- Khatoon, S., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (1994) 'Levels of normal and abnormally phosphorylated tau in different cellular and regional compartments of Alzheimer disease and control brains', *FEBS letters*, 351(1), pp. 80–84.
- Khurana, V. *et al.* (2010) 'Lysosomal dysfunction promotes cleavage and neurotoxicity of tau in vivo', *PLoS Genetics*, 6(7), pp. 1–11. doi: 10.1371/journal.pgen.1001026.
- Kibbey, M. C. *et al.* (1993) 'beta-Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(21), pp. 10150–10153. doi: 10.1073/pnas.90.21.10150.
- Kidd, M. (1963) 'Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's Disease', *Nature*, 197(4863), pp. 192–193. doi: 10.1038/197192b0.
- Kienlen-Campard, P. *et al.* (2002) 'Intracellular amyloid- β 1-42, but not extracellular soluble amyloid- β peptides, induces neuronal apoptosis', *Journal of Biological Chemistry*, 277(18), pp. 15666–15670. doi: 10.1074/jbc.M200887200.
- Kienlen-Campard, P. *et al.* (2006) 'Lactacystin decreases amyloid-beta peptide production by inhibiting beta-secretase activity.', *Journal of neuroscience research*, 84(6), pp. 1311–22. doi: 10.1002/jnr.21025.
- Kienlen-Campard, P. and Octave, J. N. (2002) 'Correlation between beta-amyloid peptide production and human APP-induced neuronal death', *Peptides*, 23(0196-9781), pp. 1199–1204.
- Kim, H.-S. (2003) 'C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3 expression', *The FASEB Journal*, 17(13), pp. 1951–1953. doi: 10.1096/fj.03-0106fje.
- Kim, J. *et al.* (2007) 'Biogenesis of γ -secretase early in the secretory pathway', *Journal of Cell Biology*, 179(5), pp. 951–963. doi: 10.1083/jcb.200709012.
- Kim, S. H. and Suh, Y. H. (1996) 'Neurotoxicity of a carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein.', *Journal of neurochemistry*, 67(3), pp. 1172–1182. doi: 10.1016/S0197-4580(96)80435-0.
- Kim, T.-W. *et al.* (1997) 'Endoproteolytic Cleavage and Proteasomal Degradation of Presenilin 2 in Transfected Cells', *Journal of Biological Chemistry*, 272(17), pp. 11006–11010. doi: 10.1074/jbc.272.17.11006.

- Kim, Y. *et al.* (2017) 'Pimozide reduces toxic forms of tau in TauC3 mice via AMPK-mediated autophagy.', *Journal of neurochemistry*, 38(1), pp. 42–49. doi: 10.1111/jnc.14109.
- Kimberly, W. T. *et al.* (2001) 'The Intracellular Domain of the β -Amyloid Precursor Protein Is Stabilized by Fe65 and Translocates to the Nucleus in a Notch-like Manner', *Journal of Biological Chemistry*, 276(43), pp. 40288–40292. doi: 10.1074/jbc.C100447200.
- Kimberly, W. T. *et al.* (2003) '-Secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, aph-1, and pen-2', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(11), pp. 6382–6387. doi: 10.1073/pnas.1037392100.
- Kimonis, V. E. *et al.* (2000) 'Clinical and molecular studies in a unique family with autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy and Paget disease of bone.', *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 2(4), pp. 232–241. doi: 10.1097/00125817-200007000-00006.
- Kimonis, V. E. *et al.* (2008) 'Clinical studies in familial VCP myopathy associated with paget disease of bone and frontotemporal dementia', *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 146(6), pp. 745–757. doi: 10.1002/ajmg.a.31862.
- Kimura, T. *et al.* (2014) 'Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus', *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1633), p. 20130144. doi: 10.1098/rstb.2013.0144.
- Kinoshita, A. *et al.* (2002) 'The γ secretase-generated carboxyl-terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells', *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), pp. 28530–28536. doi: 10.1074/jbc.M203372200.
- Kins, S. *et al.* (2006) 'Subcellular trafficking of the amyloid precursor protein gene family and its pathogenic role in alzheimer's disease', *Neurodegenerative Diseases*, 3(4–5), pp. 218–226. doi: 10.1159/000095259.
- Kirchner, P., Bug, M. and Meyer, H. (2013) 'Ubiquitination of the n-terminal region of caveolin-1 regulates endosomal sorting by the VCP/p97 AAA-ATPase', *Journal of Biological Chemistry*, 288(10), pp. 7363–7372. doi: 10.1074/jbc.M112.429076.
- Klein, D., Felsenstein, K. and Brenneman, D. (2009) 'Cathepsins B and L differentially regulate amyloid precursor protein processing', *Journal of Pharmacology and ...*, 328(3), pp. 813–821. doi: 10.1124/jpet.108.147082.the.

- Klionsky, D. J. *et al.* (2016) 'Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)', *Autophagy*, 12(1), pp. 1–222. doi: 10.1080/15548627.2015.1100356.
- Klunk, W. E. *et al.* (2004) 'Imaging Brain Amyloid in Alzheimer ' s Disease with Pittsburgh Compound-B', pp. 306–319. doi: 10.1002/ana.20009.
- Knopman, D. S. *et al.* (2003) 'Neuropathology of Cognitively Normal Elderly', *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 62(11), pp. 1087–1095. doi: 10.1093/jnen/62.11.1087.
- Knops, J. *et al.* (1995) 'Cell-type and Amyloid Precursor Protein-type Specific Inhibition of A β Release by Bafilomycin A1, a Selective Inhibitor of Vacuolar ATPases', *Journal of Biological Chemistry*, 270(6), pp. 2419–2422. doi: 10.1074/jbc.270.6.2419.
- Koike, H. *et al.* (1999) 'Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein.', *The Biochemical journal*, 343 Pt 2(2), pp. 371–5. doi: 10.1042/0264-6021:3430371.
- Kolarova, M. *et al.* (2012) 'Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease', *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, p. 731526. doi: 10.1155/2012/731526.
- Koller, K. J. and Brownstein, M. J. (1987) 'Use of a cDNA clone to identify a supposed precursor protein containing valosin', *Nature*, pp. 542–545. doi: 10.1038/325542a0.
- Kondo, H. *et al.* (1997) 'p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion', *Nature*, 388(6637), pp. 75–78. doi: 10.1038/40411.
- Kontsekova, E. *et al.* (2014) 'First-in-man tau vaccine targeting structural determinants essential for pathological tau–tau interaction reduces tau oligomerisation and neurofibrillary degeneration in an Alzheimer's disease model', *Alzheimer's Research & Therapy*, 6(4), p. 44. doi: 10.1186/alzrt278.
- Koo, E. H. *et al.* (1990) 'Precursor of Amyloid Protein in Alzheimer Disease Undergoes Fast Anterograde Axonal Transport', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(4), pp. 1561–1565. doi: 10.1073/pnas.87.4.1561.
- Koo, E. H., Park, L. and Selkoe, D. J. (1993) 'Amyloid β -Protein as a Substrate Interacts with Extracellular Matrix to Promote Neurite Outgrowth', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(10), pp. 4748–4752. doi: 10.1073/pnas.90.10.4748.
- Kopeikina, K. J. *et al.* (2011) 'Tau Accumulation Causes Mitochondrial Distribution Deficits in Neurons in a Mouse Model of Tauopathy and in Human Alzheimer's Disease Brain', *The American*

Journal of Pathology, 179(4), pp. 2071–2082. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.07.004.

Köpke, E. *et al.* (1993) 'Microtubule-associated protein tau: Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease', *Journal of Biological Chemistry*, 268(32), pp. 24374–24384. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.056.

Köpke, E. *et al.* (1993) 'Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease', *The Journal of Biological Chemistry*, 268(32), pp. 24374–24384.

Koppers, M. *et al.* (2012) 'VCP mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc., 33(4), p. 837.e7-837.e13. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.10.006.

Kovach, M. J. *et al.* (2001) 'Clinical delineation and localization to chromosome 9p13.3-p12 of a unique dominant disorder in four families: Hereditary inclusion body myopathy, paget disease of bone, and frontotemporal dementia', *Molecular Genetics and Metabolism*, 74(4), pp. 458–475. doi: 10.1006/mgme.2001.3256.

Krick, R. *et al.* (2010) 'Cdc48/p97 and Shp1/p47 regulate autophagosome biogenesis in concert with ubiquitin-like Atg8', *Journal of Cell Biology*, 190(6), pp. 965–973. doi: 10.1083/jcb.201002075.

Kuhn, P.-H. *et al.* (2010) 'ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons', *The EMBO Journal*, 29(17), pp. 3020–3032. doi: 10.1038/emboj.2010.167.

Kumar, D. *et al.* (2018) 'Secretase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Long road ahead', *European Journal of Medicinal Chemistry*, 148, pp. 436–452. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.02.035.

Kumar, S. *et al.* (2011) 'Extracellular phosphorylation of the amyloid β 2-peptide promotes formation of toxic aggregates during the pathogenesis of Alzheimer's disease', *EMBO Journal*, 30(11), pp. 2255–2265. doi: 10.1038/emboj.2011.138.

Kwok, C. T. *et al.* (2015) 'VCP mutations are not a major cause of familial amyotrophic lateral sclerosis in the UK', *Journal of the Neurological Sciences*, 349(1–2), pp. 209–213. doi: 10.1016/j.jns.2015.01.021.

Lafay-Chebassier, C. *et al.* (2006) 'The immunosuppressant rapamycin exacerbates neurotoxicity of

- A β peptide', *Journal of Neuroscience Research*, 84(6), pp. 1323–1334. doi: 10.1002/jnr.21039.
- Lambert, J. C. *et al.* (2009) 'Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 41(10), pp. 1094–1099. doi: 10.1038/ng.439.
- Lamere, C. A. *et al.* (1996) 'Sequence of deposition of heterogenous amyloid B-peptides and the APOE in Down Syndrome: Implication for the initial events in amyloid plaque formation', *Neurobiology of disease*, 3(0003), pp. 16–32. doi: 10.1006/nbdi.1996.0003.
- Lammich, S. *et al.* (1999) 'Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), pp. 3922–3927. doi: 10.1073/pnas.96.7.3922.
- Landau, S. M. *et al.* (2014) 'Amyloid PET imaging in Alzheimer's disease: A comparison of three radiotracers', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 41(7), pp. 1398–1407. doi: 10.1007/s00259-014-2753-3.
- Laßek, M. *et al.* (2013) 'Amyloid precursor proteins are constituents of the presynaptic active zone', *Journal of Neurochemistry*, 127(1), pp. 48–56. doi: 10.1111/jnc.12358.
- Latterich, M., Fröhlich, K. U. and Schekman, R. (1995) 'Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes', *Cell*, 82(6), pp. 885–893. doi: 10.1016/0092-8674(95)90268-6.
- Lau, D. H. W. *et al.* (2016) 'Critical residues involved in tau binding to fyn: implications for tau phosphorylation in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathologica Communications*, 4. doi: 10.1186/s40478-016-0317-4.
- Laurent, C. *et al.* (2014) 'Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology', *Neurobiology of Aging*, 35(9), pp. 2079–2090. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.027.
- Laurent, C. *et al.* (2016) 'A2A adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy', *Molecular Psychiatry*, 21(1), pp. 97–107. doi: 10.1038/mp.2014.151.
- Lauretti, E. *et al.* (2017) 'Glucose deficit triggers tau pathology and synaptic dysfunction in a tauopathy mouse model', *Translational Psychiatry*, 7(1). doi: 10.1038/tp.2016.296.
- Lauretti, E. and Praticò, D. (2015) 'Glucose deprivation increases tau phosphorylation via P38

- mitogen-activated protein kinase', *Aging Cell*, 14(6), pp. 1067–1074. doi: 10.1111/accel.12381.
- Lauritzen, I. *et al.* (2012) 'The γ -Secretase-Derived C-Terminal Fragment of APP, C99, But Not A β , Is a Key Contributor to Early Intraneuronal Lesions in Triple-Transgenic Mouse Hippocampus', *Journal of Neuroscience*, 32(46), pp. 16243–16255. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2775-12.2012.
- Lauritzen, I. *et al.* (2016) 'Intraneuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces A β -independent lysosomal-autophagic pathology', *Acta Neuropathologica*. Springer Berlin Heidelberg, 132(2), pp. 257–276. doi: 10.1007/s00401-016-1577-6.
- LeBlanc, A. C., Xue, R. and Gambetti, P. (1996) 'Amyloid precursor protein metabolism in primary cell cultures of neurons, astrocytes, and microglia', *J.Neurochem.*, 66(0022-3042), pp. 2300–2310.
- Lee, K. J. *et al.* (2010) 'Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines', *Neuroscience*, 169(1), pp. 344–356. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.04.078.
- Lee, M. S. *et al.* (2003) 'APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation', *Journal of Cell Biology*, 163(1), pp. 83–95. doi: 10.1083/jcb.200301115.
- Lefranc-Jullien, S. *et al.* (2005) 'Design and characterization of a new cell-permeant inhibitor of the beta-secretase BACE1.', *British journal of pharmacology*, 145(2), pp. 228–35. doi: 10.1038/sj.bjp.0706183.
- Lemere, C. A. (2013) 'Immunotherapy for Alzheimer's disease: hoops and hurdles', *Molecular Neurodegeneration*, 8, p. 36. doi: 10.1186/1750-1326-8-36.
- Lemere, C. A. and Masliah, E. (2010) 'Can Alzheimer disease be prevented by amyloid- β immunotherapy?', *Nature reviews. Neurology*, 6(2), pp. 108–119. doi: 10.1038/nrneurol.2009.219.
- Lewis, J. *et al.* (2001) 'Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP', *Science*, 293(5534), pp. 1487–1491. doi: 10.1126/science.1058189.
- Li, B. *et al.* (2007) 'Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau', *Acta Neuropathologica*, 113(5), pp. 501–511. doi: 10.1007/s00401-007-0207-8.
- Li, H., Wolfe, M. S. and Selkoe, D. J. (2009) 'Toward Structural Elucidation of the γ -Secretase Complex', *Structure*, 17(3), pp. 326–334. doi: 10.1016/j.str.2009.01.007.
- Li, J.-M. *et al.* (2014) 'The p97-UFD1L-NPL4 Protein Complex Mediates Cytokine-Induced

- I B Proteolysis', *Molecular and Cellular Biology*, 34(3), pp. 335–347. doi: 10.1128/MCB.01190-13.
- Li, R. *et al.* (2004) 'Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), pp. 3632–3637. doi: 10.1073/pnas.0205689101.
- Li, S. *et al.* (2011) 'Soluble A Oligomers Inhibit Long-Term Potentiation through a Mechanism Involving Excessive Activation of Extrasynaptic NR2B-Containing NMDA Receptors', *Journal of Neuroscience*, 31(18), pp. 6627–6638. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0203-11.2011.
- Li, T., Vandesquille, M., *et al.* (2016) 'Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for in vivo imaging of extracellular and intracellular brain targets', *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 243, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.09.019.
- Li, T., Bourgeois, J.-P., *et al.* (2016) 'Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging', *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(10), pp. 3969–3979. doi: 10.1096/fj.11-201384.
- Li, X.-C. *et al.* (2016) 'Human wild-type full-length tau accumulation disrupts mitochondrial dynamics and the functions via increasing mitofusins', *Scientific Reports*, 6, p. 24756. doi: 10.1038/srep24756.
- Li, X. *et al.* (2011) 'Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration', *The EMBO journal*, 30(23), pp. 4825–4837. doi: 10.1038/emboj.2011.376.
- Licht-Murava, A. *et al.* (2016) 'A unique type of GSK-3 inhibitor brings new opportunities to the clinic', *Science Signaling*, 9(454), p. ra110 LP-ra110. doi: 10.1126/scisignal.aah7102.
- Lichtenthaler, S. F. (2011) 'Alpha-secretase in Alzheimer's disease: Molecular identity, regulation and therapeutic potential', *Journal of Neurochemistry*, 116(1), pp. 10–21. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07081.x.
- Lilley, B. N. and Ploegh, H. L. (2004) 'A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER', *Nature*, 429(6994), pp. 834–840. doi: 10.1038/nature02592.
- Lin, X. L. *et al.* (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), pp. 1456–1460. doi: DOI 10.1073/pnas.97.4.1456.
- Lindwall, G. and Cole, R. D. (1984) 'Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote

- microtubule assembly', *The Journal of Biological Chemistry*, 259(8), pp. 5301–5305.
- Liu, C. and Götz, J. (2013) 'Profiling murine tau with 0N, 1N and 2N isoform-specific antibodies in brain and peripheral organs reveals distinct subcellular localization, with the 1N isoform being enriched in the nucleus', *PLoS ONE*, 8(12), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0084849.
- Liu, F. *et al.* (2007) 'Site-specific effects of tau phosphorylation on its microtubule assembly activity and self-aggregation', *The European Journal of Neuroscience*, 26(12), pp. 3429–3436. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05955.x.
- Liu, L. *et al.* (2012) 'Trans-Synaptic Spread of Tau Pathology In Vivo', *PLoS ONE*, 7(2). doi: 10.1371/journal.pone.0031302.
- Liu, Y. *et al.* (2012) 'VCP/p97, down-regulated by microRNA-129-5p, could regulate the progression of hepatocellular carcinoma', *PLoS ONE*, 7(4), pp. 2–9. doi: 10.1371/journal.pone.0035800.
- Livingstone, M. *et al.* (2005) 'Valosin-Containing Protein Phosphorylation at Ser⁷⁸⁴ in Response to DNA Damage', *Cancer Research*, 65(17), pp. 7533–7540. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3729.
- Löffler, J. and Huber, G. (1992) 'Beta-amyloid precursor protein isoforms in various rat brain regions and during brain development.', *Journal of neurochemistry*, 59(4), pp. 1316–24. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08443.x>.
- Loomis, P. A. *et al.* (1990) 'Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(21), pp. 8422–8426.
- Lopez Salon, M. *et al.* (2003) 'Relationship between β -amyloid degradation and the 26S proteasome in neural cells', *Experimental Neurology*, 180(2), pp. 131–143. doi: 10.1016/S0014-4886(02)00060-2.
- Lovestone, S. *et al.* (2015) 'A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease.', *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 45(1), pp. 75–88. doi: 10.3233/JAD-141959.
- Lu, D. C. *et al.* (2000) 'A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid β -protein precursor', *Nature Medicine*, 6(4), pp. 397–404. doi: 10.1038/74656.
- Lu, D. C. *et al.* (2003) 'Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid β -protein toxicity', *Journal of Neurochemistry*, 87(3), pp. 733–741. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.02059.x.

- Lu, Y. *et al.* (2013) 'Hyperphosphorylation results in tau dysfunction in DNA folding and protection', *Journal of Alzheimer's Disease*, 37(3), pp. 551–563. doi: 10.3233/JAD-130602.
- Luo, Y. *et al.* (2001) 'Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation', *Nature Neuroscience*, 4(3), pp. 231–232. doi: 10.1038/85059.
- Lyckman, A. W. *et al.* (1998) 'Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily proteins in the central nervous system', *Journal of Biological Chemistry*, 273(18), pp. 11100–11106. doi: 10.1074/jbc.273.18.11100.
- Maass, A. *et al.* (2017) 'Comparison of multiple tau-PET measures as biomarkers in aging and Alzheimer's disease', *NeuroImage*, 157, pp. 448–463. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.05.058.
- Mackenzie, I. R. A. (1994) 'Senile plaques do not progressively accumulate with normal aging', *Acta Neuropathologica*, 87(5), pp. 520–525. doi: 10.1007/s004010050118.
- Madeira, A. *et al.* (2005) 'SET protein (TAF1 β , I2PP2A) is involved in neuronal apoptosis induced by an amyloid precursor protein cytoplasmic subdomain', 20, pp. 1–20.
- Madeo, F. *et al.* (1998) 'Tyrosine phosphorylation regulates cell cycle-dependent nuclear localization of Cdc48p.', *Molecular biology of the cell*, 9(1), pp. 131–41. doi: 10.1091/mbc.9.1.131.
- Magnaghi, P. *et al.* (2013) 'Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death.', *Nature chemical biology*. Nature Publishing Group, 9(9), pp. 548–56. doi: 10.1038/nchembio.1313.
- Maina, M. B., Al-Hilaly, Y. K. and Serpell, L. C. (2016) 'Nuclear tau and its potential role in alzheimer's disease', *Biomolecules*, 6(1), pp. 2–20. doi: 10.3390/biom6010009.
- Mairet-Coello, G. *et al.* (2013) 'The CAMKK2-AMPK Kinase Pathway Mediates the Synaptotoxic Effects of A β Oligomers through Tau Phosphorylation', *Neuron*, 78(1), pp. 94–108. doi: 10.1016/j.neuron.2013.02.003.
- Majumder, S. *et al.* (2011) 'Inducing autophagy by rapamycin before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficits', *PLoS ONE*, 6(9). doi: 10.1371/journal.pone.0025416.
- Malmqvist, T., Anthony, K. and Gallo, J.-M. (2014) 'Tau mRNA is present in axonal RNA granules and is associated with elongation factor 1A', *Brain Research*, 1584, pp. 22–27. doi: 10.1016/j.brainres.2013.12.033.

- Maloney, J. A. *et al.* (2014) 'Molecular mechanisms of Alzheimer disease protection by the A673T allele of amyloid precursor protein', *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), pp. 30990–31000. doi: 10.1074/jbc.M114.589069.
- Manczak, M. and Reddy, P. H. (2012) 'Abnormal interaction of VDAC1 with amyloid beta and phosphorylated tau causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease', *Human Molecular Genetics*, 21(23), pp. 5131–5146. doi: 10.1093/hmg/dds360.
- Mandelkow, E. M. *et al.* (1992) 'Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau', *FEBS letters*, 314(3), pp. 315–321.
- Mandelkow, E. M. *et al.* (2004) 'MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons', *Journal of Cell Biology*, 167(1), pp. 99–110. doi: 10.1083/jcb.200401085.
- Mann, D. M. A. *et al.* (2018) 'Patterns and severity of vascular amyloid in Alzheimer's disease associated with duplications and missense mutations in APP gene, Down syndrome and sporadic Alzheimer's disease', *Acta Neuropathologica*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–19. doi: 10.1007/s00401-018-1866-3.
- Manno, A. *et al.* (2010) 'Enhanced ATPase activities as a primary defect of mutant valosin-containing proteins that cause inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia', *Genes to Cells*, 15(8), pp. 911–922. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01428.x.
- Mansuroglu, Z. *et al.* (2016) 'Loss of Tau protein affects the structure, transcription and repair of neuronal pericentromeric heterochromatin', *Scientific Reports*, 6, pp. 1–16. doi: 10.1038/srep33047.
- Marambaud, P. *et al.* (1997) 'Proteasome Contributes to the a-Secretase Pathway of Amyloid Precursor Protein in Human Cells', *Journal of Neurochemist*, pp. 698–703.
- Marambaud, P. *et al.* (1998) 'Proteasome inhibitors prevent the degradation of familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 and potentiate A beta 42 recovery from human cells.', *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 4(3), pp. 147–57. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2230353&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Marciniak, E. *et al.* (2017) 'Tau deletion promotes brain insulin resistance', *The Journal of Experimental Medicine*, 214(8), pp. 2257–2269. doi: 10.1084/jem.20161731.
- Mastroeni, D. *et al.* (2015) 'Aberrant intracellular localization of H3k4me3 demonstrates an early

epigenetic phenomenon in Alzheimer's disease', *Neurobiology of Aging*, 36(12), pp. 3121–3129. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.017.

Matsumoto, S.-E. *et al.* (2015) 'The twenty-four KDa C-terminal tau fragment increases with aging in tauopathy mice: implications of prion-like properties', *Human Molecular Genetics*, 24(22), pp. 6403–6416. doi: 10.1093/hmg/ddv351.

Mattson, M. *et al.* (1993) 'Evidence for neuroprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the b-amyloid precursor protein', *Neuron*, 10, pp. 243–254.

McEwan, W. A. *et al.* (2017) 'Cytosolic Fc receptor TRIM21 inhibits seeded tau aggregation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(3), pp. 574–579. doi: 10.1073/pnas.1607215114.

McKhann, G. M. *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 and Dementia*, 7(3), pp. 263–269. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.

Meerang, M. *et al.* (2011) 'The ubiquitin-selective segregase VCP/p97 orchestrates the response to DNA double-strand breaks', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 13(11), pp. 1376–1382. doi: 10.1038/ncb2367.

Mehta, S. G. *et al.* (2013) 'Genotype-phenotype studies of VCP-associated inclusion body myopathy with Paget disease of bone and/or frontotemporal dementia', *Clinical Genetics*, 83(5), pp. 422–431. doi: 10.1111/cge.12000.

Melis, V. *et al.* (2015) 'Effects of oxidized and reduced forms of methylthioninium in two transgenic mouse tauopathy models.', *Behavioural pharmacology*, 26(4), pp. 353–68. doi: 10.1097/FBP.000000000000133.

Melnyk, P. *et al.* (2006) 'Use of 1,4-bis(3-aminoalkyl) piperazine derivatives in the treatment of neurodegenerative diseases.'

Melnyk, P., Carato, P., *et al.* (2014) 'Beta and gamma-carbolines derivatives for the treatment of neurodegenerative diseases.'

Melnyk, P., Burlet, S., *et al.* (2014) 'Heterocycle compounds and uses thereof for the treatment of diseases involving formation of amyloid plaques and/or where a dysfunction of the APP metabolism

occurs'. doi: 10.1126/science.Liquids.

Melnyk, P., Vingtdeux, V., Burret, S., Eddarkaoui, S., Grosjean, M.-E., *et al.* (2015) 'Chloroquine and Chloroquinoline Derivatives as Models for the Design of Modulators of Amyloid Peptide Precursor Metabolism', *ACS Chemical Neuroscience*, p. 150206113613007. doi: 10.1021/cn5003013.

Melnyk, P., Vingtdeux, V., Burret, S., Eddarkaoui, S., Grosjean, M. E., *et al.* (2015) 'Chloroquine and Chloroquinoline Derivatives as Models for the Design of Modulators of Amyloid Peptide Precursor Metabolism', *ACS Chemical Neuroscience*, 6(4), pp. 559–569. doi: 10.1021/cn5003013.

Metuzals, J. *et al.* (1988) 'Paired helical filaments and the cytoplasmic-nuclear interface in Alzheimer's disease', *Journal of Neurocytology*, 17(6), pp. 827–833. doi: 10.1007/BF01216709.

Meyer, H., Bug, M. and Bremer, S. (2012) 'Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 14(2), pp. 117–123. doi: 10.1038/ncb2407.

Meyer, H. H. *et al.* (2000) 'A complex of mammalian Ufd1 and Npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways', *EMBO Journal*, 19(10), pp. 2181–2192. doi: 10.1093/emboj/19.10.2181.

Meyer, H. H., Wang, Y. and Warren, G. (2002) 'Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4', *EMBO Journal*, 21(21), pp. 5645–5652. doi: 10.1093/emboj/cdf579.

Meyer, H. and Weihl, C. C. (2014) 'The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis', *Journal of Cell Science*, (August), pp. 1–7. doi: 10.1242/jcs.093831.

Meziane, H. *et al.* (1998) 'Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), pp. 12683–12688. doi: 10.1073/pnas.95.21.12683.

Mileusnic, R. *et al.* (2000) 'APP is required during an early phase of memory formation', *Eur.J.Neurosci.*, 12(0953–816X), pp. 4487–4495.

Mileusnic, R., Lancashire, C. L. and Rose, S. R. R. (2004) 'The peptide sequence Arg-Glu-Arg, present in the amyloid precursor protein, protects against memory loss caused by A β and acts as a cognitive enhancer', *European Journal of Neuroscience*, 19(7), pp. 1933–1938. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03276.x.

- Milosch, N. *et al.* (2014) 'Holo-APP and G-protein-mediated signaling are required for sAPP α -induced activation of the Akt survival pathway', *Cell Death and Disease*, 5(8), pp. 1–14. doi: 10.1038/cddis.2014.352.
- Mirbaha, H. *et al.* (2015) 'Tau Trimers Are the Minimal Propagation Unit Spontaneously Internalized to Seed Intracellular Aggregation', *The Journal of Biological Chemistry*, 290(24), pp. 14893–14903. doi: 10.1074/jbc.M115.652693.
- Momeni, P. *et al.* (2009) 'Clinical and pathological features of an Alzheimer's disease patient with the MAPT Δ K280 mutation', *Neurobiology of Aging*, 30(3), pp. 388–393. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.07.013.
- Mondragón-Rodríguez, S. *et al.* (2012) 'Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(38), pp. 32040–32053. doi: 10.1074/jbc.M112.401240.
- Moore, S. *et al.* (2015) 'APP Metabolism Regulates Tau Proteostasis in Human Cerebral Cortex Neurons', *Cell Reports*. The Authors, 11(5), pp. 689–696. doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.068.
- Morel, E. *et al.* (2013) 'Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system', *Nature Communications*, 4, pp. 1–13. doi: 10.1038/ncomms3250.
- Morgan, D. *et al.* (2000) 'A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease', *Nature*, 408(6815), pp. 982–985. doi: 10.1038/35050116.
- Morley, J. E. and Farr, S. A. (2012) 'Hormesis and amyloid- β protein: Physiology or pathology?', *Journal of Alzheimer's Disease*, 29(3), pp. 487–492. doi: 10.3233/JAD-2011-111928.
- Mosconi, L., Pupi, A. and De Leon, M. J. (2008) 'NIH Public Access', *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 1147(4), pp. 180–195. doi: 10.1196/annals.1427.007.Brain.
- Mucke, L. and Selkoe, D. J. (2012) 'Neurotoxicity of Amyloid β -Protein: Synaptic and Network Dysfunction', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7), pp. a006338–a006338. doi: 10.1101/cshperspect.a006338.
- Mukrasch, M. D. *et al.* (2009) 'Structural polymorphism of 441-residue Tau at single residue resolution', *PLoS Biology*, 7(2), pp. 0399–0414. doi: 10.1371/journal.pbio.1000034.
- Müller, J. M. M. *et al.* (2007) 'Targeted deletion of p97 (VCP/CDC48) in mouse results in early

embryonic lethality', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(2), pp. 459–465. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.12.206.

Müller, T. *et al.* (2008) 'The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-Relevance for Alzheimer's disease', *Progress in Neurobiology*, 85(4), pp. 393–406. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.05.002.

Müller, U. C., Deller, T. and Korte, M. (2017) 'Not just amyloid: Physiological functions of the amyloid precursor protein family', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 18(5), pp. 281–298. doi: 10.1038/nrn.2017.29.

Muntané, G. *et al.* (2008) 'Phosphorylation of tau and alpha-synuclein in synaptic-enriched fractions of the frontal cortex in Alzheimer's disease, and in Parkinson's disease and related alpha-synucleinopathies', *Neuroscience*, 152(4), pp. 913–923. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.01.030.

Murakami, N. *et al.* (1998) 'Accumulation of tau in autophagic vacuoles in chloroquine myopathy.', *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 57(7), pp. 664–73. doi: 10.1074/jbc.M112.422964.

Muratore, C. R. *et al.* (2014) 'The familial alzheimer's disease APPV717I mutation alters APP processing and Tau expression in iPSC-derived neurons', *Human Molecular Genetics*, 23(13), pp. 3523–3536. doi: 10.1093/hmg/ddu064.

Musiek, E. S. and Holtzman, D. M. (2015) 'Three dimensions of the amyloid hypothesis: Time, space and "wingmen"', *Nature Neuroscience*, 18(6), pp. 800–806. doi: 10.1038/nn.4018.

Myeku, N. *et al.* (2015) 'Tau-driven 26S proteasome impairment and cognitive dysfunction can be prevented early in disease by activating cAMP-PKA signaling', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 6(December), pp. 1–11. doi: 10.1038/nm.4011.

Nadanaciva, S. *et al.* (2011) 'Toxicology in Vitro A high content screening assay for identifying lysosomotropic compounds', *Toxicology in Vitro*. Elsevier Ltd, 25(3), pp. 715–723. doi: 10.1016/j.tiv.2010.12.010.

Nakayama, K. *et al.* (2008) 'The intracellular domain of amyloid precursor protein induces neuron-specific apoptosis', *Neuroscience Letters*, 444(2), pp. 127–131. doi: 10.1016/j.neulet.2008.08.034.

Nalbandian, A. *et al.* (2011) 'The multiple faces of valosin-containing protein-associated diseases: Inclusion body myopathy with Paget's disease of bone, frontotemporal dementia, and amyotrophic

lateral sclerosis’, *Journal of Molecular Neuroscience*, 45(3), pp. 522–531. doi: 10.1007/s12031-011-9627-y.

Nalbandian, A. *et al.* (2015) ‘Rapamycin and chloroquine: The In Vitro and In Vivo effects of autophagy-modifying drugs show promising results in Valosin containing protein multisystem proteinopathy’, *PLoS ONE*, 10(4), pp. 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0122888.

Nalbantoglu, J. *et al.* (1997) ‘Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein’, *Nature*, 387(6632), pp. 500–505. doi: 10.1038/387500a0.

Nam, T. *et al.* (2017) ‘Emerging Paradigm of Crosstalk between Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System’, *Molecules and Cells*, 40(12), pp. 1–9. doi: 10.14348/MOLCELLS.2017.0226.

Narendra, D. *et al.* (2008) ‘Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy’, *Journal of Cell Biology*, 183(5), pp. 795–803. doi: 10.1083/jcb.200809125.

Narendra, D. P. *et al.* (2010) ‘PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin’, *PLoS Biology*, 8(1). doi: 10.1371/journal.pbio.1000298.

Nelson, P. T. *et al.* (2012) ‘Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature’, *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 71(5), pp. 362–381. doi: 10.1097/NEN.0b013e31825018f7.

Netzer, W. J. *et al.* (2017) ‘Gleevec shifts APP processing from a β -cleavage to a nonamyloidogenic cleavage’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, pp. 1389–1394. doi: 10.1073/pnas.1620963114.

Neve, R. L., Finch, E. a and Dawes, L. R. (1988) ‘Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain.’, *Neuron*, 1(8), pp. 669–77. doi: 0896-6273(88)90166-3 [pii].

Neve, R. L., Kammesheidt, A. and Hohmann, C. F. (1992) ‘Brain transplants of cells expressing the carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer amyloid protein precursor cause specific neuropathology in vivo.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(8), pp. 3448–3452. doi: 10.1073/pnas.89.8.3448.

Nguyen, K. V. (2015) ‘The human β -amyloid precursor protein: Biomolecular and epigenetic aspects’, *Biomolecular Concepts*, 6(1), pp. 11–32. doi: 10.1515/bmc-2014-0041.

Nhan, H. S., Chiang, K. and Koo, E. H. (2015) ‘The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes’, *Acta Neuropathologica*, 129(1), pp. 1–19. doi:

10.1007/s00401-014-1347-2.

Nikolaev, A. *et al.* (2009) 'APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases', *Nature*. Nature Publishing Group, 457(7232), pp. 981–989. doi: 10.1038/nature07767.

Niwa, H. *et al.* (2012) 'The role of the N-domain in the atpase activity of the mammalian AAA ATPase p97/VCP', *Journal of Biological Chemistry*, 287(11), pp. 8561–8570. doi: 10.1074/jbc.M111.302778.

Nixon, R. A. (2017) 'Amyloid precursor protein & endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: Inseparable partners in a multifactorial disease', *FASEB Journal*, 31(7), pp. 2729–2743. doi: 10.1096/fj.201700359.

Noble, W. *et al.* (2005) 'Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(19), pp. 6990–5. doi: 10.1073/pnas.0500466102.

Nunan, J. *et al.* (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 / FEBS*, 268(20), pp. 5329–5336. doi: ejb2465 [pii].

Nunan, J. *et al.* (2003) 'Proteasome-mediated degradation of the C-terminus of the Alzheimer's disease β -amyloid protein precursor: Effect of C-terminal truncation on production of β -amyloid protein', *Journal of Neuroscience Research*, 74(3), pp. 378–385. doi: 10.1002/jnr.10646.

Nygaard, H. B. (2013) 'Current and emerging therapies for alzheimer's disease', *Clinical Therapeutics*. Elsevier, 35(10), pp. 1480–1489. doi: 10.1016/j.clinthera.2013.09.009.

Oddo, S. *et al.* (2004) 'A β Immunotherapy Leads to Clearance of Early, but Not Late, Hyperphosphorylated Tau Aggregates via the Proteasome', *Neuron*, 43(3), pp. 321–332. doi: 10.1016/j.neuron.2004.07.003.

Oddo, S. *et al.* (2006) 'Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(51), pp. 39413–39423. doi: 10.1074/jbc.M608485200.

Ohkawara, T. *et al.* (2011) 'The amyloid precursor protein intracellular domain alters gene expression and induces neuron-specific apoptosis', *Gene*, 475(1), pp. 1–9. doi: 10.1016/j.gene.2010.11.014.

Ohsawa, I. *et al.* (1999) 'Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells', *Eur.J.Neurosci.*, 11(0953–816X), pp. 1907–1913. doi:

10.1046/j.1460-9568.1999.00601.x.

Opattova, A. *et al.* (2015) 'The ubiquitin proteasome system as a potential therapeutic target for treatment of neurodegenerative diseases', *Gen. Physiol. Biophys.*, 34, pp. 337–352. doi: 10.4149/gpb_2015024.

Orgogozo, J.-M. *et al.* (2003) 'Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization', *Neurology*, 61(1), pp. 46–54.

Orr, A. G. *et al.* (2015) 'Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory', *Nature Neuroscience*, 18(3), pp. 423–434. doi: 10.1038/nn.3930.

Ossareh-Nazari, B. *et al.* (2010) 'Cdc48 and Ufd3, new partners of the ubiquitin protease Ubp3, are required for ribophagy', *EMBO Reports*, 11(7), pp. 548–554. doi: 10.1038/embor.2010.74.

Ott, A. *et al.* (1999) 'Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study', *Neurology*, 53(9), pp. 1937–1937. doi: 10.1212/WNL.53.9.1937.

Oyama, F. *et al.* (2004) 'Gem GTPase and Tau: Morphological changes induced by Gem GTPase in CHO cells are antagonized by tau', *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), pp. 27272–27277. doi: 10.1074/jbc.M401634200.

Ozaki, T. *et al.* (2006) 'The intracellular domain of the amyloid precursor protein (AICD) enhances the p53-mediated apoptosis', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 351(1), pp. 57–63. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.162.

Pacheco-Quinto, J. and Eckman, E. A. (2013) 'Endothelin-converting enzymes degrade intracellular β -amyloid produced within the endosomal/lysosomal pathway and autophagosomes', *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), pp. 5606–5615. doi: 10.1074/jbc.M112.422964.

Panda, D. *et al.* (2003) 'Differential regulation of microtubule dynamics by three- and four-repeat tau: implications for the onset of neurodegenerative disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16), pp. 9548–9553. doi: 10.1073/pnas.1633508100.

Pandey, M. K. and DeGrado, T. R. (2016) 'Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3)-targeted therapy and imaging', *Theranostics*, pp. 571–593. doi: 10.7150/thno.14334.

Panza, F. *et al.* (2016) 'Tau-based therapeutics for Alzheimer's disease: active and passive immunotherapy', *Immunotherapy*, 8(9), pp. 1119–1134. doi: 10.2217/imt-2016-0019.

- Papadopoulos, C. *et al.* (2017) 'VCP/p97 cooperates with YOD1, UBXD1 and PLAA to drive clearance of ruptured lysosomes by autophagy', *The EMBO Journal*, 36(2), pp. 135–150. doi: 10.15252/embj.201695148.
- Pardossi-Piquard, R. *et al.* (2009) 'APH1 polar transmembrane residues regulate the assembly and activity of presenilin complexes', *Journal of Biological Chemistry*, 284(24), pp. 16298–16307. doi: 10.1074/jbc.M109.000067.
- Pardossi-Piquard, R. and Checler, F. (2012) 'The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD', *Journal of Neurochemistry*, 120, pp. 109–124. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07475.x.
- Park, S. A. *et al.* (2009) 'Mechanism of cytotoxicity mediated by the C31 fragment of the amyloid precursor protein', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(2), pp. 450–455. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.08.042.
- Pascoal, T. A. *et al.* (2017) 'Amyloid- β and hyperphosphorylated tau synergy drives metabolic decline in preclinical Alzheimer's disease', *Molecular Psychiatry*. Nature Publishing Group, 22(2), pp. 306–311. doi: 10.1038/mp.2016.37.
- Penke, B., Bogár, F. and Fülöp, L. (2017) ' β -Amyloid and the Pathomechanisms of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View', *Molecules*, 22(10), p. 1692. doi: 10.3390/molecules22101692.
- Pera, M. *et al.* (2013) 'Distinct patterns of APP processing in the CNS in autosomal-dominant and sporadic Alzheimer disease', *Acta Neuropathologica*, 125(2), pp. 201–213. doi: 10.1007/s00401-012-1062-9.
- Perez, M. *et al.* (2009) 'Tau - An inhibitor of deacetylase HDAC6 function', *Journal of Neurochemistry*, 109(6), pp. 1756–1766. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06102.x.
- Peric, A. and Annaert, W. (2015) 'Early etiology of Alzheimer's disease: tipping the balance toward autophagy or endosomal dysfunction?', *Acta Neuropathologica*, 129, pp. 363–381. doi: 10.1007/s00401-014-1379-7.
- Peters, J.-M., Walsh, M. J. and Franke, W. W. (1990) 'An abundant and ubiquitous homo-oligomeric ring-shaped ATPase particle related to the putative vesicle fusion proteins Sec18p and NSF', *The EMBO Journal*, 9(1), pp. 757–1767. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb08300.x.
- Peters, J. M. *et al.* (1992) 'Ubiquitous soluble Mg²⁺-ATPase complex. A structural study', *Journal of*

- Molecular Biology*, 223(2), pp. 557–571. doi: 10.1016/0022-2836(92)90670-F.
- Petrucci, L. *et al.* (2004) ‘CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation’, *Human Molecular Genetics*, 13(7), pp. 703–714. doi: 10.1093/hmg/ddh083.
- Phiel, C. J. *et al.* (2003) ‘GSK-3 α regulates production of Alzheimer’s disease amyloid-beta peptides.’, *Nature*, 423(lane 2), pp. 435–439. doi: 10.1038/nature01640.
- Pickford, F. *et al.* (2008) ‘The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice’, *The Journal of Clinical Investigation*, 118(6), pp. 2190–2199. doi: 10.1172/JCI33585.The.
- Pickhardt, M. *et al.* (2005) ‘Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer’s paired helical filaments in vitro and in cells’, *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), pp. 3628–3635. doi: 10.1074/jbc.M410984200.
- Pickhardt, M. *et al.* (2007) ‘Phenylthiazolyl-hydrazide and its derivatives are potent inhibitors of tau aggregation and toxicity in vitro and in cells.’, *Biochemistry*, 46(35), pp. 10016–23. doi: 10.1021/bi700878g.
- Piedrahita, D. *et al.* (2016) ‘ β -Secretase 1’s Targeting Reduces Hyperphosphorylated Tau, Implying Autophagy Actors in 3xTg-AD Mice’, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(January), pp. 1–19. doi: 10.3389/fncel.2015.00498.
- Pilling, A. D. *et al.* (2006) ‘Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons’, *Molecular Biology of the Cell*, 17(4), pp. 2057–2068. doi: 10.1091/mbc.e05-06-0526.
- Pinheiro, S. *et al.* (2016) ‘Tau Mislocation in Glucocorticoid-Triggered Hippocampal Pathology’, *Molecular Neurobiology*, 53(7), pp. 4745–4753. doi: 10.1007/s12035-015-9356-2.
- Pintér, M. *et al.* (1998) ‘TER94, a *Drosophila* homolog of the membrane fusion protein CDC48/p97, is accumulated in nonproliferating cells: In the reproductive organs and in the brain of the imago’, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(2), pp. 91–98. doi: 10.1016/S0965-1748(97)00095-7.
- Pitsi, D., Kienlen-Campard, P. and Octave, J. N. (2002) ‘Failure of the interaction between presenilin 1 and the substrate of gamma-secretase to produce A β in insect cells’, *J Neurochem*, 83(2), pp. 390–399. doi: 1138 [pii].
- Planel, E. (2004) ‘Alterations in Glucose Metabolism Induce Hypothermia Leading to Tau

- Hyperphosphorylation through Differential Inhibition of Kinase and Phosphatase Activities: Implications for Alzheimer's Disease', *Journal of Neuroscience*, 24(10), pp. 2401–2411. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5561-03.2004.
- Plantone, D. and Koudriavtseva, T. (2018) 'Current and Future Use of Chloroquine and Hydroxychloroquine in Infectious, Immune, Neoplastic, and Neurological Diseases: A Mini-Review', *Clinical Drug Investigation*. Springer International Publishing, pp. 1–19. doi: 10.1007/s40261-018-0656-y.
- Pleasure, I. T., Black, M. M. and Keen, J. H. (1993) 'Valosin-containing protein, VCP, is a ubiquitous clathrin-binding protein', *Nature*, 365(6445), pp. 459–462. doi: 10.1038/365459a0.
- Plummer, S. *et al.* (2016) 'The Neuroprotective Properties of the Amyloid Precursor Protein Following Traumatic Brain Injury.', *Aging and disease*, 7(2), pp. 163–79. doi: 10.14336/AD.2015.0907.
- Pohanka, M. (2012) 'Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review (2008 – present)', *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 22(8), pp. 871–886. doi: 10.1517/13543776.2012.701620.
- Pooler, A. M. *et al.* (2013) 'Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity', *EMBO Reports*, 14(4), pp. 389–394. doi: 10.1038/embor.2013.15.
- Pooler, A. M. *et al.* (2015) 'Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease', *Acta neuropathologica communications*, 3, p. 14. doi: 10.1186/s40478-015-0199-x.
- Postina, R. *et al.* (2004) 'A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model', *Journal of Clinical Investigation*, 113(10), pp. 1456–1464. doi: 10.1172/JCI20864.
- Price, J. L. *et al.* (1991) 'The distribution of tangles, plaques and related immunohistochemical markers in healthy aging and Alzheimer's disease', *Neurobiol.Aging*, 12(0197-4580), pp. 295–312.
- Price, J. L. and Morris, J. C. (1999) 'Tangles and plaques in nondemented aging and "preclinical" Alzheimer's disease', *Ann Neurol*, 45, pp. 358–368. doi: 3.0.CO;2-X.
- Prince, M. J. *et al.* (2016) *World Alzheimer Report 2016 - Improving healthcare for people living with dementia: Coverage, quality and costs now and in the future.*
- Prokop, S. *et al.* (2004) 'Requirement of PEN-2 for stabilization of the presenilin N-/C-terminal fragment heterodimer within the γ -secretase complex', *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), pp.

23255–23261. doi: 10.1074/jbc.M401789200.

Puzzo, D. *et al.* (2008) ‘Picomolar Amyloid- Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus’, *Journal of Neuroscience*, 28(53), pp. 14537–14545. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008.

Puzzo, D. *et al.* (2011) ‘Endogenous amyloid- β is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory’, *Annals of Neurology*, 69(5), pp. 819–830. doi: 10.1002/ana.22313.

Puzzo, D. *et al.* (2017) ‘LTP and memory impairment caused by extracellular A β and tau oligomers is APP- dependent’, *eLife*, 6, pp. 1–21. doi: 10.7554/eLife.26991.001.

Qi-Takahara, Y. (2005) ‘Longer Forms of Amyloid Protein: Implications for the Mechanism of Intramembrane Cleavage by γ -Secretase’, *Journal of Neuroscience*, 25(2), pp. 436–445. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1575-04.2005.

Qi, H. *et al.* (2015) ‘Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Characterization of Interaction of Tau with DNA and Its Regulation by Phosphorylation’, *Biochemistry*, 54(7), pp. 1525–1533. doi: 10.1021/bi5014613.

Rabinovich, E. *et al.* (2002) ‘AAA-ATPase p97/Cdc48p, a Cytosolic Chaperone Required for Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation’, *Molecular and Cellular Biology*, 22(2), pp. 626–634. doi: 10.1128/MCB.22.2.626-634.2002.

Ramadan, K. *et al.* (2007) ‘Cdc48/p97 promotes reformation of the nucleus by extracting the kinase Aurora B from chromatin’, *Nature*, 450(7173), pp. 1258–1262. doi: 10.1038/nature06388.

Ramanathan, H. N. and Ye, Y. (2012) ‘The p97 ATPase associates with EEA1 to regulate the size of early endosomes’, *Cell Research*. Nature Publishing Group, 22(2), pp. 346–359. doi: 10.1038/cr.2011.80.

Rapoport, M. *et al.* (2002) ‘Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), pp. 6364–6369. doi: 10.1073/pnas.092136199.

Rapoport, M. *et al.* (2002) ‘Tau is essential to beta β -amyloid-induced neurotoxicity’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), pp. 6364–6369. doi: 10.1073/pnas.092136199.

Regan, P. *et al.* (2015) ‘Tau phosphorylation at serine 396 residue is required for hippocampal LTD’, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(12), pp. 4804–

4812. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2842-14.2015.

Reiss, A. B. *et al.* (2018) 'Amyloid toxicity in Alzheimer ' s disease'.

Reitz, C., Brayne, C. and Mayeux, R. (2011) 'Epidemiology of Alzheimer disease', *Nature Reviews Neurology*, 7(3), pp. 137–152. doi: 10.1038/nrneurol.2011.2.

Reitz, C. and Mayeux, R. (2014) 'Alzheimer disease: Epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 88(4), pp. 640–651. doi: 10.1016/j.bcp.2013.12.024.

Richly, H. *et al.* (2005) 'A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting', *Cell*, 120(1), pp. 73–84. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.013.

Rijal, R. *et al.* (2016) 'Mutant p97 exhibits species-specific changes of its ATPase activity and compromises the UBXD9-mediated monomerisation of p97 hexamers', *European Journal of Cell Biology*. Elsevier GmbH., 95(6–7), pp. 195–207. doi: 10.1016/j.ejcb.2016.03.004.

Ritz, D. *et al.* (2011) 'Endolysosomal sorting of ubiquitylated caveolin-1 is regulated by VCP and UBXD1 and impaired by VCP disease mutations', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 13(9), pp. 1116–1124. doi: 10.1038/ncb2301.

Roberson, E. D. *et al.* (2007) 'Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid -Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model', *Science*, 316(5825), pp. 750–754. doi: 10.1126/science.1141736.

Roch, J. M. *et al.* (1994) 'Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(August), pp. 7450–4. doi: 10.1073/pnas.91.16.7450.

Rodríguez-Martín, T. *et al.* (2016) 'Reduced number of axonal mitochondria and tau hypophosphorylation in mouse P301L tau knockin neurons', *Neurobiology of Disease*, 85, pp. 1–10. doi: 10.1016/j.nbd.2015.10.007.

Rogaev, E. I. *et al.* (1995) 'Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene', *Nature*, 376(6543), pp. 775–778. doi: 10.1038/376775a0.

Rossi, G. *et al.* (2013) 'Mutations in MAPT gene cause chromosome instability and introduce copy

- number variations widely in the genome’, *Journal of Alzheimer’s Disease*, 33(4), pp. 969–982. doi: 10.3233/JAD-2012-121633.
- Rothballer, A., Tzvetkov, N. and Zwickl, P. (2007) ‘Mutations in p97/VCP induce unfolding activity’, *FEBS Letters*, 581(6), pp. 1197–1201. doi: 10.1016/j.febslet.2007.02.031.
- Rovelet-Lecrux, A. *et al.* (2006) ‘APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy’, *Nature Genetics*, 38(1), pp. 24–26. doi: 10.1038/ng1718.
- Rubinsztein, D. C., Mariño, G. and Kroemer, G. (2011) ‘Autophagy and aging’, *Cell*, 146(5), pp. 682–695. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.030.
- Rutgers, K. S. *et al.* (2011) ‘Transmigration of beta amyloid specific heavy chain antibody fragments across the in vitro blood-brain barrier’, *Neuroscience*, 190, pp. 37–42. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.05.076.
- Ruthel, G. and Hollenbeck, P. J. (2003) ‘Response of mitochondrial traffic to axon determination and differential branch growth.’, *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(24), pp. 8618–8624. doi: 23/24/8618 [pii].
- Saido, T. and Leissring, M. a (2012) ‘Proteolytic degradation of amyloid beta-protein’, *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(6), p. a006379. doi: 10.1101/cshperspect.a006379.
- Saitoh, T. *et al.* (1989) ‘Secret & 1 Form of Amyloid p Protein Precursor Is Involved in the Growth Regulation of Fibroblasts’, *Cell*, 58, pp. 615–622.
- Salloway, S. *et al.* (2014) ‘Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer’s disease’, *The New England Journal of Medicine*, 370(4), pp. 322–333. doi: 10.1056/NEJMoa1304839.
- Saman, S. *et al.* (2012) ‘Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease’, *The Journal of Biological Chemistry*, 287(6), pp. 3842–3849. doi: 10.1074/jbc.M111.277061.
- Sanders, D. W. *et al.* (2014) ‘Distinct tau prion strains propagate in cells and mice and define different tauopathies’, *Neuron*, 82(6), pp. 1271–1288. doi: 10.1016/j.neuron.2014.04.047.
- Santarella, R. A. *et al.* (2004) ‘Surface-decoration of microtubules by human tau’, *Journal of Molecular Biology*, 339(3), pp. 539–553. doi: 10.1016/j.jmb.2004.04.008.

- Saracino, D. *et al.* (2018) 'Novel VCP mutations expand the mutational spectrum of frontotemporal dementia', *Neurobiology of Aging*. Elsevier Inc. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.037>.
- Saxton, W. M. and Hollenbeck, P. J. (2012) 'The axonal transport of mitochondria', *Journal of Cell Science*, 125(9), pp. 2095–2104. doi: 10.1242/jcs.053850.
- Sbardella, G. *et al.* (2004) 'Synthesis and in vitro antimycobacterial activity of novel 3-(1H-pyrrol-1-yl)-2-oxazolidinone analogues of PNU-100480', *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14, pp. 1537–1541. doi: 10.1016/j.bmcl.2004.01.010.
- Schellenberg, G. *et al.* (1992) 'Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14', *Science*, 258(5082), pp. 668–671. doi: 10.1126/science.1411576.
- Scheltens, P. *et al.* (2002) 'Structural magnetic resonance imaging in the practical assessment of dementia: Beyond exclusion', *Lancet Neurology*, pp. 13–21. doi: 10.1016/S1474-4422(02)00002-9.
- Scheltens, P. *et al.* (2016) 'Alzheimer's disease', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 388(10043), pp. 505–517. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01124-1.
- Schenk, D. *et al.* (1999) 'Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse', *Nature*, 400(6740), pp. 173–177. doi: 10.1038/22124.
- Scheuermann, S. *et al.* (2001) 'Homodimerization of Amyloid Precursor Protein and Its Implication in the Amyloidogenic Pathway of Alzheimer's Disease', *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), pp. 33923–33929. doi: 10.1074/jbc.M105410200.
- Schlenzig, D. *et al.* (2009) 'Pyroglutamate formation influences solubility and amyloidogenicity of amyloid peptides', *Biochemistry*, 48(29), pp. 7072–7078. doi: 10.1021/bi900818a.
- Schöll, M. *et al.* (2016) 'PET Imaging of Tau Deposition in the Aging Human Brain', *Neuron*, 89(5), pp. 971–982. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.028.
- Schönherr, C. *et al.* (2016) 'Generation of aggregation prone N-terminally truncated amyloid β peptides by meprin β depends on the sequence specificity at the cleavage site', *Molecular Neurodegeneration*. *Molecular Neurodegeneration*, 11(1), p. 19. doi: 10.1186/s13024-016-0084-5.
- Schrader-Fischer, G. and Paganetti, P. A. (1996) 'Effect of alkalizing agents on the processing of the β -amyloid precursor protein', *Brain Research*, 716(1–2), pp. 91–100. doi: 10.1016/0006-8993(96)00002-9.

- Schubert, D. and Behl, C. (1993) 'The expression of amyloid beta protein precursor protects nerve cells from β -amyloid and glutamate toxicity and alters their interaction with the extracellular matrix', *Brain Research*, 629(2), pp. 275–282. doi: 10.1016/0006-8993(93)91331-L.
- Schuetz, A. K. and Kay, L. E. (2016) 'A dynamic molecular basis for malfunction in disease mutants of p97/VCP', *eLife*, 5(NOVEMBER2016), pp. 1–25. doi: 10.7554/eLife.20143.
- Schwalbe, M. *et al.* (2015) 'Structural Impact of Tau Phosphorylation at Threonine 231', *Structure*, 23(8), pp. 1448–1458. doi: 10.1016/j.str.2015.06.002.
- Schwarz, A. J. *et al.* (2016) 'Regional profiles of the candidate tau PET ligand 18F-AV-1451 recapitulate key features of Braak histopathological stages', *Brain: A Journal of Neurology*, 139(Pt 5), pp. 1539–1550. doi: 10.1093/brain/aww023.
- Schweitzer, K., Pralow, A. and Naumann, M. (2016) 'p97/VCP promotes Cullin-RING-ubiquitin-ligase/proteasome-dependent degradation of I κ B α and the preceding liberation of RelA from ubiquitinated I κ B α ', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(1), pp. 58–70. doi: 10.1111/jcmm.12702.
- Seabrook, G. R. *et al.* (1999) 'Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein', *Neuropharmacology*, 38(3), pp. 349–359. doi: 10.1016/S0028-3908(98)00204-4.
- Seguin, S. J. *et al.* (2014) 'Inhibition of autophagy, lysosome and VCP function impairs stress granule assembly', *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 21(12), pp. 1838–1851. doi: 10.1038/cdd.2014.103.
- Seitz-Tutter, D., Langford, G. M. and Weiss, D. G. (1988) 'Dynamic instability of native microtubules from squid axons is rare and independent of gliding and vesicle transport', *Experimental Cell Research*, 178(2), pp. 504–512.
- Selkoe, D. J. and Hardy, J. (2016) 'The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years', *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), pp. 595–608. doi: 10.15252/emmm.201606210.
- Selkoe, D. and Kopan, R. (2003) 'NOTCH AND PRESENILIN: Regulated Intramembrane Proteolysis Links Development and Degeneration', *Annual Review of Neuroscience*, 26(1), pp. 565–597. doi: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131334.
- Sengupta, A. *et al.* (1998) 'Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal

- inhibition of its binding to microtubules', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 357(2), pp. 299–309. doi: 10.1006/abbi.1998.0813.
- Sergeant, N. *et al.* (2002) 'Progressive decrease of amyloid precursor protein carboxy terminal fragments (APP-CTFs), associated with tau pathology stages, in Alzheimer's disease', *Journal of Neurochemistry*, 81(4), pp. 663–672. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.00901.x.
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Caillet-Boudin, M.-L., *et al.* (2008) 'Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders', *Expert Review of Proteomics*, 5(2), pp. 207–224. doi: 10.1586/14789450.5.2.207.
- Sergeant, N., Bretteville, A., Hamdane, M., Grognet, P., *et al.* (2008) 'Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders.', *Expert review of proteomics*, 5(2), pp. 207–224. doi: 10.1586/14789450.5.2.207.
- Sergeant, N., Wattez, A. and Delacourte, A. (1999) 'Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively "exon 10" isoforms', *Journal of Neurochemistry*, 72(3), pp. 1243–1249.
- Serrano-Pozo, A. *et al.* (2011) 'Neuropathological alterations in Alzheimer disease', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), pp. 1–24. doi: 10.1101/cshperspect.a006189.
- Seshadri, S. (2010) 'Genome-wide Analysis of Genetic Loci Associated With Alzheimer Disease', *JAMA*, 303(18), p. 1832. doi: 10.1001/jama.2010.574.
- Shah, S. *et al.* (2005) 'Nicastrin functions as a γ -secretase-substrate receptor', *Cell*, 122(3), pp. 435–447. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.022.
- Shankar, G. M. *et al.* (2008) 'Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer brain impair synaptic plasticity and memory', *Nature medicine*, 14(8), pp. 837–842. doi: 10.1038/nm1782.Amyloid.
- Shaw, L. M. *et al.* (2009) 'Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects', *Annals of Neurology*, 65(4), pp. 403–413. doi: 10.1002/ana.21610.
- Shen, L. and Jia, J. (2016) 'An Overview of Genome-Wide Association Studies in Alzheimer's Disease', *Neuroscience Bulletin*. Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, 32(2), pp. 183–190. doi: 10.1007/s12264-016-0011-3.
- Sherrington, R. *et al.* (1995) 'Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial

Alzheimer's disease', *Nature*, 375(6534), pp. 754–760. doi: 10.1038/375754a0.

Shigematsu, K., McGeer, P. L. and McGeer, E. G. (1992) 'Localization of amyloid precursor protein in selective postsynaptic densities of rat cortical neurons', *Brain Research*, 592(1–2), pp. 353–357. doi: 10.1016/0006-8993(92)91697-D.

Shipton, O. A. *et al.* (2011) 'Tau protein is required for amyloid {beta}-induced impairment of hippocampal long-term potentiation', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(5), pp. 1688–1692. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2610-10.2011.

Shirotani, K. *et al.* (2001) 'Nepilysin Degrades Both Amyloid β Peptides 1-40 and 1-42 Most Rapidly and Efficiently among Thiorphan- and Phosphoramidon-sensitive Endopeptidases', *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), pp. 21895–21901. doi: 10.1074/jbc.M008511200.

Shirotani, K. *et al.* (2004) 'Identification of distinct γ -secretase complexes with different APH-1 variants', *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), pp. 41340–41345. doi: 10.1074/jbc.M405768200.

Sibille, N. *et al.* (2012) 'Structural characterization by nuclear magnetic resonance of the impact of phosphorylation in the proline-rich region of the disordered Tau protein', *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 80(2), pp. 454–462. doi: 10.1002/prot.23210.

Simons, M. *et al.* (1996) 'Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(3), pp. 899–908. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=8558258&retmode=ref&cmd=prlinks%5Cnpapers2://publication/uuid/8CADB60F-9B5E-4F7B-8717-3F9527FB1C4D>.

Sinha, S. *et al.* (1999) 'Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain', *Nature*, 402(6761), pp. 537–540. doi: 10.1038/990114.

Sisodia, S. S. (1992) 'Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(13), pp. 6075–9. doi: 10.1073/pnas.89.13.6075.

Sisodia, S. S. and St George-Hyslop, P. H. (2002) ' γ -Secretase, notch, A β and alzheimer's disease: Where do the presenilins fit in?', *Nature Reviews Neuroscience*, 3(4), pp. 281–290. doi: 10.1038/nrn785.

Sjoberg, M. K. (2006) 'Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in

- nucleolar organization', *Journal of Cell Science*, 119(10), pp. 2025–2034. doi: 10.1242/jcs.02907.
- Skovronsky, D. M. *et al.* (2000) 'A Distinct ER/IC γ -Secretase Competes with the Proteasome for Cleavage of APP \dagger ', *Biochemistry*, 39(4), pp. 810–817. doi: 10.1021/bi991728z.
- Slegers, K. *et al.* (2006) 'APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy', *Brain*, 129(11), pp. 2977–2983. doi: 10.1093/brain/awl203.
- Small, D. H. *et al.* (1999) 'Neurite-Outgrowth Regulating Functions of the Amyloid Protein Precursor of Alzheimer's Disease', *J.Alzheimers.Dis.*, 1(1387–2877), pp. 275–285. doi: 10.3233/JAD-1999-14-508.
- Snow, A. D. *et al.* (1990) 'Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie', *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 63(5), pp. 601–611.
- Soba, P. *et al.* (2005) 'Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion', *EMBO Journal*, 24(20), pp. 3624–3634. doi: 10.1038/sj.emboj.7600824.
- Sokoloff, L. (1977) 'RELATION BETWEEN PHYSIOLOGICAL FUNCTION AND ENERGY METABOLISM IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM', *Journal of Neurochemistry*, 29(1), pp. 13–26. doi: 10.1111/j.1471-4159.1977.tb03919.x.
- Sokolow, S. *et al.* (2015) 'Pre-synaptic C-terminal truncated tau is released from cortical synapses in Alzheimer's disease', *Journal of Neurochemistry*, 133(3), pp. 368–379. doi: 10.1111/jnc.12991.
- Song, C., Wang, Q., Song, C., Lockett, S. J., *et al.* (2015) 'Nucleocytoplasmic shuttling of valosin-containing protein (VCP/p97) regulated by its N domain and C-terminal region', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1853(1), pp. 222–232. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.10.019.
- Song, C., Wang, Q., Song, C. and Rogers, T. J. (2015) 'Valosin-containing protein (VCP/p97) is capable of unfolding polyubiquitinated proteins through its ATPase domains.', *Biochemical and biophysical research communications*. Elsevier Ltd, 463(3), pp. 453–7. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.111.
- Song, C., Wang, Q. and Li, C. C. H. (2003) 'ATPase activity of p97-valosin-containing protein (VCP): D2 mediates the major enzyme activity, and D1 contributes to the heat-induced activity', *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), pp. 3648–3655. doi: 10.1074/jbc.M208422200.

- Song, D. K. *et al.* (1998) 'Behavioral and neuropathologic changes induced by central injection of carboxyl-terminal fragment of beta-amyloid precursor protein in mice.', *Journal of neurochemistry*, 71(2), pp. 875–878.
- Spillantini, M. G. *et al.* (1998) 'Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), pp. 7737–7741.
- Spillantini, M. G., Bird, T. D. and Ghetti, B. (1998) 'Frontotemporal dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17: a new group of tauopathies', *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 8(2), pp. 387–402.
- Spillantini, M. G. and Goedert, M. (2013) 'Tau pathology and neurodegeneration', *The Lancet. Neurology*, 12(6), pp. 609–622. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70090-5.
- Spires-Jones, T. L. and Hyman, B. T. (2014) 'The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease', *Neuron*, 82(4), pp. 756–771. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.004.
- Stach, L. and Freemont, P. S. (2017) 'The AAA+ ATPase p97, a cellular multitool', *Biochemical Journal*, 474(17), pp. 2953–2976. doi: 10.1042/BCJ20160783.
- Strittmatter, W. J. *et al.* (1993) 'Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(5), pp. 1977–1981. doi: 10.1073/pnas.90.5.1977.
- De Strooper, B. *et al.* (1998) 'Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein', *Nature*, 391(6665), pp. 387–390. doi: 10.1038/34910.
- De Strooper, B. (2010) 'Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process.', *Physiological reviews*, 90(2), pp. 465–494. doi: 10.1152/physrev.00023.2009.
- De Strooper, B. (2010) 'Proteases and Proteolysis in Alzheimer Disease: A Multifactorial View on the Disease Process', *Physiological Reviews*, 90, pp. 465–494. doi: 10.1152/physrev.00023.2009.
- De Strooper, B. and Annaert, W. (2000) 'Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein', *Journal of cell science*, 113, pp. 1857–1870.
- De Strooper, B. and Annaert, W. (2010) 'Novel Research Horizons for Presenilins and γ -Secretases in Cell Biology and Disease', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26(1), pp. 235–260. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104117.

- De Strooper, B. and Karran, E. (2016) 'The Cellular Phase of Alzheimer's Disease', *Cell*. Elsevier Inc., 164(4), pp. 603–615. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.056.
- Sultan, A. *et al.* (2011) 'Nuclear Tau, a key player in neuronal DNA protection', *Journal of Biological Chemistry*, 286(6), pp. 4566–4575. doi: 10.1074/jbc.M110.199976.
- Sun, B. *et al.* (2008) 'Cystatin C-Cathepsin B Axis Regulates Amyloid Beta Levels and Associated Neuronal Deficits in an Animal Model of Alzheimer's Disease', *Neuron*. Elsevier Inc., 60(2), pp. 247–257. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.001.
- Sun, J. and Roy, S. (2017) 'The physical approximation of APP and BACE-1: A key event in alzheimer's disease pathogenesis', *Developmental Neurobiology*, pp. 340–347. doi: 10.1002/dneu.22556.
- Sun, T. *et al.* (2013) 'Motile axonal mitochondria contribute to the variability of presynaptic strength', *Cell Reports*, 4(3), pp. 413–419. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.040.
- Suzuki, M. and Kimura, T. (2017) 'Microtubule-associated tau contributes to intra-dendritic trafficking of AMPA receptors in multiple ways', *Neuroscience Letters*, 653, pp. 276–282. doi: 10.1016/j.neulet.2017.05.056.
- Swaminathan, G., Zhu, W. and Plowey, E. D. (2016) 'BECN1/Beclin 1 sorts cell-surface APP/amyloid β precursor protein for lysosomal degradation', *Autophagy*. Taylor & Francis, 12(12), pp. 2404–2419. doi: 10.1080/15548627.2016.1234561.
- Szczepanik, A. M., Rampe, D. and Ringheim, G. E. (2001) 'Amyloid-beta peptide fragments p3 and p4 induce pro-inflammatory cytokine and chemokine production in vitro and in vivo.', *Journal of neurochemistry*, 77(1), pp. 304–17. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00240.x.
- Tai, H.-C. *et al.* (2012) 'The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system', *The American Journal of Pathology*, 181(4), pp. 1426–1435. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.06.033.
- Takahashi, R. H. *et al.* (2010) 'Co-occurrence of Alzheimer's disease β -amyloid and τ pathologies at synapses', *Neurobiology of Aging*, 31(7), pp. 1145–1152. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.021.
- Takahashi, R. H., Nagao, T. and Gouras, G. K. (2017) 'Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease', *Pathology International*, 67(4), pp. 185–193. doi: 10.1111/pin.12520.

- Takasugi, N. *et al.* (2003) 'The role of presenilin cofactors in the γ -secretase complex', *Nature*, 422(6930), pp. 438–441. doi: 10.1038/nature01506.
- Takeuchi, I. K. and Takeuchi, Y. K. (2001) 'Transient accumulation of Gallyas-Braak-positive and phosphorylated tau-immunopositive substances in neuronal lipofuscin granules in the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex of rats during long-term chloroquine intoxication.', *Acta neuropathologica*, 102(2), pp. 191–4. doi: 10.1007/s004010100360.
- Tam, J. H. K. *et al.* (2016) 'Tyrosine binding protein sites regulate the intracellular trafficking and processing of amyloid precursor protein through a novel lysosome-directed pathway', *PLoS ONE*, 11(10), pp. 1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0161445.
- Tam, J. H. K., Seah, C. and Pasternak, S. H. (2014) 'The Amyloid Precursor Protein is rapidly transported from the Golgi apparatus to the lysosome and where it is processed into beta-amyloid.', *Molecular brain*, 7(1), p. 54. doi: 10.1186/s13041-014-0054-1.
- Tamayev, R. *et al.* (2012) ' β - but not γ -secretase proteolysis of APP causes synaptic and memory deficits in a mouse model of dementia', *EMBO Molecular Medicine*, 4(3), pp. 171–179. doi: 10.1002/emmm.201100195.
- Taminau, J., Thijs, G. and De Winter, H. (2008) 'Pharao: Pharmacophore alignment and optimization', *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 27, pp. 161–169. doi: 10.1016/j.jmgm.2008.04.003.
- Tanabe, C. *et al.* (2007) 'ADAM19 is tightly associated with constitutive Alzheimer's disease APP α -secretase in A172 cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(1), pp. 111–117. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.10.181.
- Tanaka, A. *et al.* (2010) 'Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin', *Journal of Cell Biology*, 191(7), pp. 1367–1380. doi: 10.1083/jcb.201007013.
- Tang, W. K. *et al.* (2010) 'A novel ATP-dependent conformation in p97 N-D1 fragment revealed by crystal structures of disease-related mutants', *EMBO Journal*. Nature Publishing Group, 29(13), pp. 2217–2229. doi: 10.1038/emboj.2010.104.
- Tang, W. K. and Xia, D. (2012) 'Structural and functional deviations in disease-associated p97 mutants', *Journal of Structural Biology*, 179(2), pp. 83–92. doi: 10.1016/j.jsb.2012.04.024.
- Tang, W. K. and Xia, D. (2013) 'Altered intersubunit communication is the molecular basis for functional defects of pathogenic p97 mutants', *Journal of Biological Chemistry*, 288(51), pp. 36624–

36635. doi: 10.1074/jbc.M113.488924.

Tang, W. K. and Xia, D. (2016) 'Mutations in the Human AAA+ Chaperone p97 and Related Diseases', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3(December), pp. 1–12. doi: 10.3389/fmolb.2016.00079.

Tanzi, R. *et al.* (1987) 'Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus', *Science*, 235(4791), pp. 880–884. doi: 10.1126/science.2949367.

Tardivel, M. *et al.* (2016) 'Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies', *Acta Neuropathologica Communications*, 4. doi: 10.1186/s40478-016-0386-4.

Tashiro, K. *et al.* (1997) 'Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex', *Neuroreport*, 8(12), pp. 2797–2801.

Tatebayashi, Y. *et al.* (2004) 'Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 β in the regulation of organelle transport', *Journal of Cell Science*, 117(9), pp. 1653–1663. doi: 10.1242/jcs.01018.

Taylor, C. J. *et al.* (2008) 'Endogenous secreted amyloid precursor protein- α regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory', *Neurobiology of Disease*, 31(2), pp. 250–260. doi: 10.1016/j.nbd.2008.04.011.

TCW, J. and Goate, A. M. (2017) 'Genetics of β -Amyloid Precursor Protein in Alzheimer's Disease', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(6), p. a024539. doi: 10.1101/cshperspect.a024539.

Temido-Ferreira, M. *et al.* (2018) 'Age-related shift in LTD is dependent on neuronal adenosine A2A receptors interplay with mGluR5 and NMDA receptors', *Molecular Psychiatry*. doi: 10.1038/s41380-018-0110-9.

Terwel, D. *et al.* (2008) 'Amyloid activates GSK-3 β to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice', *American Journal of Pathology*, 172(3), pp. 786–798. doi: 10.2353/ajpath.2008.070904.

Teune, L. K. *et al.* (2010) 'Typical cerebral metabolic patterns in neurodegenerative brain diseases', *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 25(14), pp. 2395–2404. doi: 10.1002/mds.23291.

Thal, D. *et al.* (2002) 'Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD', *Neurology*, 58, pp. 1791–1800.

- Thal, D. R. *et al.* (1998) 'Progression of neurofibrillary changes and PHF- τ in end-stage Alzheimer's disease is different from plaque and cortical microglial pathology', *Neurobiology of Aging*, 19(6), pp. 517–525. doi: 10.1016/S0197-4580(98)00090-6.
- Thal, D. R. *et al.* (2000) 'Sequence of A β -Protein Deposition in the Human Medial Temporal Lobe', *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 59(8), pp. 733–748. doi: 10.1093/jnen/59.8.733.
- Thal, D. R. *et al.* (2015) 'Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathologica*, 129(2), pp. 167–182. doi: 10.1007/s00401-014-1375-y.
- Theunis, C. *et al.* (2013) 'Efficacy and Safety of A Liposome-Based Vaccine against Protein Tau, Assessed in Tau.P301L Mice That Model Tauopathy', *PLoS ONE*, 8(8). doi: 10.1371/journal.pone.0072301.
- Thinakaran, G. and Koo, E. H. (2008) 'Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function', *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), pp. 29615–29619. doi: 10.1074/jbc.R800019200.
- Thornton, C. *et al.* (2011) 'AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid β -peptide exposure', *Biochemical Journal*, 434(3), pp. 503–512. doi: 10.1042/BJ20101485.
- Tiwari, S. S. *et al.* (2015) 'Evidence that the presynaptic vesicle protein CSPalpha is a key player in synaptic degeneration and protection in Alzheimer's disease', *Molecular Brain*, 8, p. 6. doi: 10.1186/s13041-015-0096-z.
- Todd, S. *et al.* (2013) 'Survival in dementia and predictors of mortality: A review', *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 28(11), pp. 1109–1124. doi: 10.1002/gps.3946.
- Toh, W. H. *et al.* (2017) 'Amyloid precursor protein traffics from the Golgi directly to early endosomes in an Arl5b- and AP4-dependent pathway', *Traffic*, 18(3), pp. 159–175. doi: 10.1111/tra.12465.
- Tracy, T. E. *et al.* (2016) 'Acetylated Tau Obstructs KIBRA-Mediated Signaling in Synaptic Plasticity and Promotes Tauopathy-Related Memory Loss', *Neuron*, 90(2), pp. 245–260. doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.005.
- Tresse, E. *et al.* (2010) 'VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD', *Autophagy*, 6(2), pp. 217–227. doi: 10.4161/auto.6.2.11014.
- Trinczek, B. *et al.* (1995) 'Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic

instability of microtubules', *Molecular Biology of the Cell*, 6(12), pp. 1887–1902.

Troquier, L. *et al.* (2012) 'Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THYTau22 mouse model: a suitable therapeutic approach', *Current Alzheimer Research*, 9(4), pp. 397–405.

Tsai, J. *et al.* (2004) 'Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches', *Nature Neuroscience*, 7(11), pp. 1181–1183. doi: 10.1038/nn1335.

Tseng, B. P. *et al.* (2008) 'A β inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation', *Neurobiology of Aging*, 29(11), pp. 1607–1618. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.014.

Tsuboi, Y., Doh-Ura, K. and Yamada, T. (2009) 'Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: clinical trial against prion diseases', *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 29(5), pp. 632–636. doi: 10.1111/j.1440-1789.2009.01058.x.

Uchiyama, K. *et al.* (2002) 'VCIP135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for golgi and ER assembly in vivo', *Journal of Cell Biology*, 159(5), pp. 855–866. doi: 10.1083/jcb.200208112.

Uchiyama, K. *et al.* (2006) 'p37 Is a p97 Adaptor Required for Golgi and ER Biogenesis in Interphase and at the End of Mitosis', *Developmental Cell*, 11(6), pp. 803–816. doi: 10.1016/j.devcel.2006.10.016.

Uchiyama, K. and Kondo, H. (2005) 'p97/p47-mediated biogenesis of Golgi and ER', *Journal of Biochemistry*, 137(2), pp. 115–119. doi: 10.1093/jb/mvi028.

Vasconcelos, B. *et al.* (2016) 'Heterotypic seeding of Tau fibrillization by pre-aggregated Abeta provides potent seeds for prion-like seeding and propagation of Tau-pathology in vivo', *Acta Neuropathologica*. Springer Berlin Heidelberg, 131(4), pp. 549–569. doi: 10.1007/s00401-015-1525-x.

Vassar, R. *et al.* (1999) 'B-Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE', *Science*, 286(1999), pp. 735–741. doi: 10.1126/science.286.5440.735.

Vassar, R. *et al.* (2009) 'The γ -Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function, and Therapeutic Potential', *Journal of Neuroscience*, 29, pp. 12787–12794. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3657-09.2009.

Vassar, R. (2014) 'BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease', *Alzheimer's*

Research and Therapy, 6, pp. 1–14. doi: 10.1186/s13195-014-0089-7.

Vekaria, P. H. *et al.* (2016) ‘Targeting p97 to Disrupt Protein Homeostasis in Cancer’, *Frontiers in Oncology*, 6(August), pp. 1–8. doi: 10.3389/fonc.2016.00181.

Vekrellis, K. *et al.* (2000) ‘Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme.’, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(5), pp. 1657–1665. doi: 11160418.

Venugopal, C. *et al.* (2008) ‘Beta-secretase: structure, function, and evolution.’, *CNS & neurological disorders drug targets*, 7(3), pp. 278–94. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/dneu.22556>.

Verma, R. *et al.* (2011) ‘Cdc48/p97 mediates UV-dependent turnover of RNA Pol II’, *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 41(1), pp. 82–92. doi: 10.1016/j.molcel.2010.12.017.

Verma, R. *et al.* (2013) ‘Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome’, *eLife*, 2013(2), pp. 1–17. doi: 10.7554/eLife.00308.

Viegas, A. *et al.* (2011) ‘Saturation-transfer difference (STD) NMR: A simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding’, *Journal of Chemical Education*, 88(7), pp. 990–994. doi: 10.1021/ed101169t.

Vilchez, D., Saez, I. and Dillin, A. (2014) ‘The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases’, *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5, pp. 1–13. doi: 10.1038/ncomms6659.

Vingtdeux, V. *et al.* (2005) ‘Phosphorylation of amyloid precursor carboxy-terminal fragments enhances their processing by a gamma-secretase-dependent mechanism’, *Neurobiology of Disease*, 20(2), pp. 625–637. doi: 10.1016/j.nbd.2005.05.004.

Vingtdeux, V., Hamdane, M., Loyens, A., *et al.* (2007) ‘Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies’, *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), pp. 18197–18205. doi: 10.1074/jbc.M609475200.

Vingtdeux, V., Hamdane, M., Bégard, S., *et al.* (2007) ‘Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation’, *Neurobiology of Disease*. Academic Press, 25(3), pp. 686–696. doi: 10.1016/j.nbd.2006.09.019.

Vingtdeux, V. *et al.* (2011) ‘AMPK is abnormally activated in tangle-and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer’s disease and other tauopathies’, *Acta Neuropathologica*, 121(3), pp. 337–349. doi:

10.1007/s00401-010-0759-x.

Vingtdeux, V. and Marambaud, P. (2012) 'Identification and biology of α -secretase', *Journal of Neurochemistry*, 120(SUPPL. 1), pp. 34–45. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07477.x.

Violet, M. *et al.* (2014) 'A major role for Tau in neuronal DNA and RNA protection in vivo under physiological and hyperthermic conditions', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8. doi: 10.3389/fncel.2014.00084.

Violet, M. *et al.* (2015) 'Prefibrillar Tau oligomers alter the nucleic acid protective function of Tau in hippocampal neurons in vivo', *Neurobiology of Disease*, 82, pp. 540–551. doi: 10.1016/j.nbd.2015.09.003.

De Vos, K. J. *et al.* (2008) 'Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases', *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), pp. 151–173. doi: 10.1146/annurev.neuro.31.061307.090711.

Wakabayashi, T. *et al.* (2009) 'Analysis of the gamma-secretase interactome and validation of its association with tetraspanin-enriched microdomains.', *Nature cell biology*, 11(11), pp. 1340–1346. doi: 10.1038/ncb1978.

Walsh, D. M. *et al.* (2002) 'Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo', *Nature*, 416(6880), pp. 535–539. doi: 10.1038/416535a.

Walsh, D. M. and Selkoe, D. J. (2004) 'Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease', *Neuron*, 44(1), pp. 181–193. doi: 10.1016/j.neuron.2004.09.010.

Wan, Q. *et al.* (1997) 'Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin', *Nature*, 388(6643), pp. 686–690. doi: 10.1038/41792.

Wang, H. *et al.* (2015) 'Cathepsin L Mediates the Degradation of Novel APP C-Terminal Fragments', *Biochemistry*, 54(18), pp. 2806–2816. doi: 10.1021/acs.biochem.5b00329.

Wang, J. Z., Grundke-Iqbal, I. and Iqbal, K. (2007) 'Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration', *European Journal of Neuroscience*, 25(1), pp. 59–68. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05226.x.

Wang, P. *et al.* (2005) 'Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(5), pp. 1219–25. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4660-04.2005.

- Wang, Q. *et al.* (2003) 'D1 ring is stable and nucleotide-independent, whereas D2 ring undergoes major conformational changes during the ATPase cycle of p97-VCP', *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), pp. 32784–32793. doi: 10.1074/jbc.M303869200.
- Wang, Q., Song, C. and Li, C. C. H. (2003) 'Hexamerization of p97-VCP is promoted by ATP binding to the D1 domain and required for ATPase and biological activities', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(2), pp. 253–260. doi: 10.1016/S0006-291X(02)02840-1.
- Wang, Q., Song, C. and Li, C. C. H. (2004) 'Molecular perspectives on p97-VCP: Progress in understanding its structure and diverse biological functions', *Journal of Structural Biology*, 146(1–2), pp. 44–57. doi: 10.1016/j.jsb.2003.11.014.
- Wang, R. *et al.* (1991) 'Secretion of the β /A4 Amyloid Precursor Protein', *The Journal of Biological Chemistry*, 266(25), pp. 16960–16964.
- Wang, R. *et al.* (2012) 'Lys²⁰³ and {Lys}³⁸² are essential for the proteasomal degradation of {BACE}1.', *Current Alzheimer Research*, 9(5), pp. 606–615. doi: 10.2174/1567205012666141218140953.
- Wang, X. *et al.* (2014) 'Dysregulation of protein trafficking in neurodegeneration', *Mol Neurodegener*, 9(1), p. 31. doi: 10.1186/1750-1326-9-31.
- Wang, X. *et al.* (2017) 'Modifications and Trafficking of APP in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease', *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers, 10, p. 294. doi: 10.3389/fnmol.2017.00294.
- Wang, Y. and Mandelkow, E. (2016) 'Tau in physiology and pathology', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 17(1), pp. 22–35. doi: 10.1038/nrn.2015.1.
- Wang, Z.-H. *et al.* (2017) 'Delta-Secretase Phosphorylation by SRPK2 Enhances Its Enzymatic Activity, Provoking Pathogenesis in Alzheimer's Disease', *Molecular Cell*, 67(5), p. 812–825.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.07.018.
- Wasco, W. *et al.* (1993) 'Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the alzheimer's associated amyloid β protein precursor', *Nature Genetics*, 5(1), pp. 95–100. doi: 10.1038/ng0993-95.
- Wasco, W., Brook, J. D. and Tanzi, R. E. (1993) 'The Amyloid Precursor-like Protein (APLP) Gene Maps to the Long Arm of Human Chromosome 19', *Genomics*, pp. 237–239. doi: 10.1006/geno.1993.1047.

- Watts, G. D. J. *et al.* (2004) 'Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein', *Nature Genetics*, 36(4), pp. 377–381. doi: 10.1038/ng1332.
- Wei, W. (2002) 'Aβ₁₇₋₄₂ in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis', *Brain*, 125(9), pp. 2036–2043. doi: 10.1093/brain/awf205.
- Wei, Y. *et al.* (2008) 'Binding to the minor groove of the double-strand, Tau protein prevents DNA damage by peroxidation', *PLoS ONE*, 3(7). doi: 10.1371/journal.pone.0002600.
- Wei, Y. P. *et al.* (2018) 'Tau-Induced Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase-IV Activation Aggravates Nuclear Tau Hyperphosphorylation', *Neuroscience Bulletin*, 34(2), pp. 261–269. doi: 10.1007/s12264-017-0148-8.
- Weidemann, A. *et al.* (1989) 'Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein', *Cell*, 57(1), pp. 115–126. doi: 10.1016/0092-8674(89)90177-3.
- Weidemann, A. *et al.* (1999) 'Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein within its cytoplasmic domain by caspase-like proteases', *J Biol.Chem.*, 274(9), pp. 5823–5829. Available at: file://c:/My files/RefMan10/RefMan pdfs/16656.pdf.
- Weidemann, A. *et al.* (2002) 'A Novel ε-Cleavage within the Transmembrane Domain of the Alzheimer Amyloid Precursor Protein Demonstrates Homology with Notch Processing †', *Biochemistry*, 41(8), pp. 2825–2835. doi: 10.1021/bi015794o.
- Weihl, C. C. *et al.* (2006) 'Inclusion body myopathy-associated mutations in p97/VCP impair endoplasmic reticulum-associated degradation', *Human Molecular Genetics*, 15(2), pp. 189–199. doi: 10.1093/hmg/ddi426.
- Weihl, C. C. *et al.* (2008) 'TDP-43 accumulation in inclusion body myopathy muscle suggests a common pathogenic mechanism with frontotemporal dementia', *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 79(10), pp. 1186–1189. doi: 10.1136/jnnp.2007.131334.
- Weingarten, M. D. *et al.* (1975) 'A protein factor essential for microtubule assembly.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), pp. 1858–62. doi: 10.1073/pnas.72.5.1858.
- Werth, J. L. and Thayer, S. A. (1994) 'Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for*

Neuroscience, 14(1), pp. 348–56.

Whitson, J. S., Selkoe, D. J. and Cotman, C. W. (1989) 'Amyloid beta protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro', *Science*, 243(4897), pp. 1488–1490. doi: 10.1126/science.2928783.

Wilcock, G. K. and Esiri, M. M. (1982) 'Plaques, tangles and dementia. A quantitative study', *Journal of the Neurological Sciences*, 56(2–3), pp. 343–356.

Willem, M. *et al.* (2015) 'η-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus.', *Nature*, 526(7573), pp. 443–7. doi: 10.1038/nature14864.

Wiltfang, J. *et al.* (2001) 'Elevation of β-Amyloid Peptide 2–42 in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease and Its Generation in PS1 Knockout Cells', *Journal of Biological Chemistry*, 276(46), pp. 42645–42657. doi: 10.1074/jbc.M102790200.

Wischik, C. M. *et al.* (1996) 'Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), pp. 11213–8. doi: 10.1073/pnas.93.20.11213.

Wischik, C. M. *et al.* (2015) 'Tau aggregation inhibitor therapy: An exploratory phase 2 study in mild or moderate Alzheimer's disease', *Journal of Alzheimer's Disease*, 44(2), pp. 705–720. doi: 10.3233/JAD-142874.

Wiśniewski, H. M., Narang, H. K. and Terry, R. D. (1976) 'Neurofibrillary tangles of paired helical filaments', *Journal of the Neurological Sciences*, 27(2), pp. 173–181. doi: 10.1016/0022-510X(76)90059-9.

Witman, G. B. *et al.* (1976) 'Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(11), pp. 4070–4074.

Wolf, D. H. and Stolz, A. (2012) 'The Cdc48 machine in endoplasmic reticulum associated protein degradation', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 1823(1), pp. 117–124. doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.09.002.

Wolfe, M. S. *et al.* (1999) 'Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and γ-secretase activity', *Nature*, 398(6727), pp. 513–517. doi: 10.1038/19077.

Wu, J. W. *et al.* (2013) 'Small misfolded Tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons', *The Journal of Biological Chemistry*, 288(3),

pp. 1856–1870. doi: 10.1074/jbc.M112.394528.

Wu, J. W. *et al.* (2016) ‘Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo’, *Nature neuroscience*, 19(8), pp. 1085–1092. doi: 10.1038/nn.4328.

Wu, X., Li, L. and Jiang, H. (2016) ‘Doa1 targets ubiquitinated substrates for mitochondria-associated degradation’, *Journal of Cell Biology*, 213(1), pp. 49–63. doi: 10.1083/jcb.201510098.

Xia, D., Tang, W. K. and Ye, Y. (2016) ‘Structure and function of the AAA+ ATPase p97/Cdc48p’, *Gene*. Elsevier B.V., 583(1), pp. 64–77. doi: 10.1016/j.gene.2016.02.042.

Xiao, Q. *et al.* (2015) ‘Neuronal-Targeted TFEB Accelerates Lysosomal Degradation of APP, Reducing A Generation and Amyloid Plaque Pathogenesis’, *Journal of Neuroscience*, 35(35), pp. 12137–12151. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0705-15.2015.

Xu, S. *et al.* (2011) ‘The AAA-ATPase p97 is essential for outer mitochondrial membrane protein turnover’, *Molecular Biology of the Cell*, 22(3), pp. 291–300. doi: 10.1091/mbc.E10-09-0748.

Xu, S., Zhang, L. and Brodin, L. (2017) ‘Overexpression of SNX7 reduces A β production by enhancing lysosomal degradation of APP’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Ltd, 495(1), pp. 12–19. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.127.

Yagishita, S. *et al.* (2015) ‘Glycogen Synthase Kinase 3 β -mediated Phosphorylation in the Most C-terminal Region of Protein Interacting with C Kinase 1 (PICK1) Regulates the Binding of PICK1 to Glutamate Receptor Subunit GluA2’, *The Journal of Biological Chemistry*, 290(49), pp. 29438–29448. doi: 10.1074/jbc.M114.619668.

Yamada, E. S. *et al.* (2014) ‘Annonacin, a natural lipophilic mitochondrial complex I inhibitor, increases phosphorylation of tau in the brain of FTDP-17 transgenic mice’, *Experimental Neurology*, 253, pp. 113–125. doi: 10.1016/j.expneurol.2013.12.017.

Yamada, K. *et al.* (2014) ‘Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo’, *The Journal of Experimental Medicine*, 211(3), pp. 387–393. doi: 10.1084/jem.20131685.

Yamada, K. M., Spooner, B. S. and Wessells, N. K. (1970) ‘Axon growth: roles of microfilaments and microtubules’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 66(4), pp. 1206–1212.

Yamamoto, A. *et al.* (1998) ‘Bafilomycin A1 Prevents Maturation of Autophagic Vacuoles by Inhibiting Fusion between Autophagosomes and Lysosomes in Rat Hepatoma Cell Line, H-4-II-E

Cells.’, *Cell Structure and Function*, 23(1), pp. 33–42. doi: 10.1247/csf.23.33.

Yamamoto, S. *et al.* (2003) ‘Elevated expression of valosin-containing protein (p97) in hepatocellular carcinoma is correlated with increased incidence of tumor recurrence’, *Journal of Clinical Oncology*, 21(3), pp. 447–452. doi: 10.1200/JCO.2003.06.068.

Yamazaki, T., Koo, E. H. and Selkoe, D. J. (1996) ‘Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization.’, *Journal of cell science*, 109 (Pt 5(Pt 5), pp. 999–1008. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8743946>.

Yamazaki, T., Koo, E. H. and Selkoe, D. J. (1996) ‘Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization.’, *Journal of cell science*, 109 (Pt 5, pp. 999–1008. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8743947>.

Yan, R. *et al.* (1999) ‘Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer’s disease β -secretase activity’, *Nature*, 402(6761), pp. 533–537. doi: 10.1038/990107.

Yan, R. and Vassar, R. (2014) ‘Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer’s disease therapy’, *The Lancet Neurology*. Elsevier Ltd, 13, pp. 319–329. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70276-X.

Yanamandra, K. *et al.* (2013) ‘Anti-tau antibodies that block tau aggregate seeding in vitro markedly decrease pathology and improve cognition in vivo’, *Neuron*, 80(2), pp. 402–414. doi: 10.1016/j.neuron.2013.07.046.

Yanamandra, K. *et al.* (2015) ‘Anti-tau antibody reduces insoluble tau and decreases brain atrophy’, *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2(3), pp. 278–288. doi: 10.1002/acn3.176.

Yang, D. S. *et al.* (2011) ‘Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer’s disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits’, *Brain*, 134(1), pp. 258–277. doi: 10.1093/brain/awq341.

Yang, S. Y. (2010) ‘Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: Challenges and recent advances’, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd, 15, pp. 444–450. doi: 10.1016/j.drudis.2010.03.013.

Yang, T. *et al.* (2008) ‘Quantification of gamma-secretase modulation differentiates inhibitor compound selectivity between two substrates Notch and amyloid precursor protein’, *Molecular Brain*,

1(1), p. 15. doi: 10.1186/1756-6606-1-15.

Ye, Y. *et al.* (2004) 'A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol', *Nature*, 429(6994), pp. 841–847. doi: 10.1038/nature02656.

Ye, Y. *et al.* (2005) 'Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), pp. 14132–8. doi: 10.1073/pnas.0505006102.

Ye, Y. (2006) 'Diverse functions with a common regulator: Ubiquitin takes command of an AAA ATPase', *Journal of Structural Biology*, 156(1), pp. 29–40. doi: 10.1016/j.jsb.2006.01.005.

Ye, Y. *et al.* (2017) 'A Mighty "Protein Extractor" of the Cell: Structure and Function of the p97/CDC48 ATPase', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 4(June), pp. 1–20. doi: 10.3389/fmolb.2017.00039.

Ye, Y., Meyer, H. H. and Rapoport, T. A. (2001) 'The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol', *Nature*, 414(6864), pp. 652–656. doi: 10.1038/414652a.

Ye, Y., Meyer, H. H. and Rapoport, T. A. (2003) 'Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: Dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains', *Journal of Cell Biology*, 162(1), pp. 71–84. doi: 10.1083/jcb.200302169.

Yoshikai, S. *et al.* (1990) 'Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene', *Gene*, 87(2), pp. 257–263. doi: 10.1016/0378-1119(90)90310-N.

Youle, R. J. and Narendra, D. P. (2011) 'Mechanisms of mitophagy', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), pp. 9–14. doi: 10.1038/nrm3028.

Young-Pearse, T. L. *et al.* (2010) 'Biochemical and Functional Interaction of Disrupted-in-Schizophrenia 1 and Amyloid Precursor Protein Regulates Neuronal Migration during Mammalian Cortical Development', *Journal of Neuroscience*, 30(31), pp. 10431–10440. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1445-10.2010.

Yu, G. *et al.* (2000) 'Nicastrin modulates presenilin-mediated notch / glp-1 signal transduction and β APP processing', *Nature*, 407(6800), pp. 48–54. doi: 10.1038/35024009.

Zalk, R. and Shoshan-Barmatz, V. (2003) 'ATP-binding sites in brain p97/VCP (valosin-containing

- protein), a multifunctional AAA ATPase', *Biochemical Journal*, 374(2), pp. 473–480. doi: 10.1042/bj20030219.
- Zempel, H. *et al.* (2010) 'Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(36), pp. 11938–11950. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2357-10.2010.
- Zempel, H. and Mandelkow, E.-M. (2015) 'Tau missorting and spastin-induced microtubule disruption in neurodegeneration: Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia', *Molecular Neurodegeneration*, 10. doi: 10.1186/s13024-015-0064-1.
- Zhang, S. *et al.* (2010) 'Rapamycin promotes β -amyloid production via ADAM-10 inhibition', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(3), pp. 337–341. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.06.017.
- Zhang, T. and Ye, Y. (2014) 'The Final Moments of Misfolded Proteins en Route to the Proteasome', *DNA and Cell Biology*, 33(8), pp. 477–483. doi: 10.1089/dna.2014.2452.
- Zhang, T. and Ye, Y. (2016) 'Doa1 is a MAD adaptor for Cdc48', *Journal of Cell Biology*, 213(1), pp. 7–9. doi: 10.1083/jcb.201603078.
- Zhang, X. *et al.* (2000) 'Structure of the AAA ATPase p97', *Molecular Cell*, 6(6), pp. 1473–1484. doi: 10.1016/S1097-2765(00)00143-X.
- Zhang, X. *et al.* (2015) 'Altered cofactor regulation with disease-associated p97/VCP mutations', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201418820. doi: 10.1073/pnas.1418820112.
- Zhang, Z. *et al.* (2014) 'Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease.', *Nature medicine*, 20(11), pp. 1–16. doi: 10.1038/nm.3700.
- Zhang, Z. *et al.* (2015) 'Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6, pp. 1–16. doi: 10.1038/ncomms9762.
- Zhang, Z. *et al.* (2015) 'The transitional endoplasmic reticulum ATPase p97 regulates the alternative nuclear factor NF- κ B signaling via partial degradation of the NF- κ B subunit p100', *Journal of Biological Chemistry*, 290(32), pp. 19558–19568. doi: 10.1074/jbc.M114.630061.
- Zhang, Z. *et al.* (2017) 'Inhibition of delta-secretase improves cognitive functions in mouse models of

- Alzheimer's disease', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8, pp. 1–17. doi: 10.1038/ncomms14740.
- Zhang, Z. *et al.* (2017) 'Selenomethionine mitigates cognitive decline by targeting both tau hyperphosphorylation and autophagic clearance in an Alzheimer's disease mouse model.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(9), pp. 3229–16. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3229-16.2017.
- Zhang, Z., Xie, M. and Ye, K. (2016) 'Asparagine endopeptidase is an innovative therapeutic target for neurodegenerative diseases', *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20(10), pp. 1237–1245. doi: 10.1080/14728222.2016.1182990.
- Zheng, H. *et al.* (1995) ' β -amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity', *Cell*, 81(4), pp. 525–531. doi: 10.1016/0092-8674(95)90073-X.
- Zheng, H. and Koo, E. H. (2006) 'The amyloid precursor protein: Beyond amyloid', *Molecular Neurodegeneration*, 1(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/1750-1326-1-5.
- Zhu, J.-B. *et al.* (2017) 'State of Play in Alzheimer's Disease Genetics', *Journal of Alzheimer's Disease*, 58(3), pp. 631–659. doi: 10.3233/JAD-170062.
- Ziviani, E., Tao, R. N. and Whitworth, A. J. (2010) 'Drosophila Parkin requires PINK1 for mitochondrial translocation and ubiquitinates Mitofusin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(11), pp. 5018–5023. doi: 10.1073/pnas.0913485107.

Annexes

Annexe 1 : Revue « *Tau as a therapeutic target* »

Revue en cours de préparation en co-auteur avec les étudiants de l'équipe du Dr. Luc Buée

TAU AS A THERAPEUTIC TARGET

Marie Albert*, Kevin Carvalho*, Clément Danis*, Manon Domise*, Caroline Evrard*, Melissa Gilles*, Victoria Gomez-Murcia*, Mégane Homa*, Coline Leghay*, Claudia Marinangeli*, Claire Schirmer*, Khalid Iqbal¹, Luc Buee

University of Lille, Inserm, CHU-Lille, UMR-S 1172, Alzheimer & Tauopathies, LabEx DISTALZ, F-59000 Lille, France

*equal contribution

¹Current address: Department of Neurochemistry, Inge Grundke-Iqbal Research Floor, New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Staten Island, New York 10314, USA; email: khalid.iqbal.ibr@gmail.com

Address all correspondence to: Dr. Luc Buee

Head of the team Alzheimer & Tauopathies

Director of the Jean-Pierre Aubert research centre (JPArc - UMR-S 1172)

Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille

Faculté de Médecine - Pôle Recherche

59045 Lille France

Abstract

Tau pathology is a hallmark of Alzheimer's disease (AD) and a family of related conditions called Tauopathies. The density of Tau lesions, which are made up of abnormally hyperphosphorylated proteins, directly correlates with the degree of cognitive impairment in AD and preclinical studies have shown the therapeutic potential of targeting Tau pathology in experimental animal models. Currently, there is an increasing interest, both in academia and in industry, to understand Tau-based mechanisms and therapeutic strategies. Tau is the major microtubule associated protein of a normal neuron where it promotes the assembly of tubulin into microtubules and maintains their structure. In addition to cytoplasm, Tau is also known to exist in various cellular compartments where it is involved in different functions. This review will summarize various functions of Tau beyond microtubule assembly, its role in Alzheimer's disease and related conditions, the seeding and the spread of Tau pathology and its potential as a therapeutic target, with an ending focus on current Tau immunotherapy approaches and human clinical trials.

Introduction

Alzheimer's Disease

Epidemiology

Cerebral aging is a major public health problem in modern society. With improvement in modern medicine, especially increasing use of preventive care, lifespan will continue to increase. However, aging is the main risk factor for dementia and since life expectancy increases, the number of people with dementia will follow. Alzheimer's disease (AD) is the most important cause of dementia in the elderly. At age 65, around 3% of people suffers from AD and this prevalence doubles every five years thereafter, reaching almost 50% at 85 years old. Alzheimer's Disease International estimates that 46.8 million people worldwide were living with dementia in 2015 and this number is expected to reach 131.5 million in 2050, unless a treatment to prevent, inhibit or cure this disease is found (Prince *et al.*, 2016). The magnitude of this problem has also created an enormous economic burden to the society. The total estimated worldwide cost of dementia is US\$818 billion and it will become a trillion dollars disease by 2018.

Histopathology

AD is neuropathologically characterized by extracellular deposits of β -amyloid in the brain parenchyma and the cerebral blood vessels and also by intraneuronal accumulation of paired helical filaments in neuronal cell body as neurofibrillary tangles, in neurites as neuropil threads and in dystrophic neurites that surround the amyloid plaque core. The density of the neurofibrillary pathology but not the amyloid one correlates with the clinical phenotype of the dementia (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Alafuzoff *et al.*, 1987; Arriagada *et al.*, 1992). This has been recently confirmed with PET Tau tracers (Maass *et al.*, 2017). In fact, about 30% of normal aged people have as many amyloid plaques in their brains as in typical cases of AD. Plaques in normal aged cases lack the dystrophic neurites with neurofibrillary pathology surrounding the β -amyloid plaque core.

AD paired helical filaments are made up of microtubule associated protein Tau (Brion *et al.*, 1985; Delacourte and Defossez, 1986) in an abnormally hyperphosphorylated state (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). Tau protein is encoded by a single gene *MAPT* which is located on chromosome 17. Tau protein is expressed in mature human brain in six isoforms generated by alternative splicing of its pre-mRNA (M. Goedert *et al.*, 1989). These six isoforms are generated by splicing of exon 10 that codes for microtubule binding repeat (R)

2 and exons 2 and 3 which code for amino-terminal inserts 1 and 2, respectively. In normal human brain the 3R and 4R Tau occur in 1:1 ratio.

Tau Pathology

Tau pathology, which in addition to AD, is a hallmark of a family of neurodegenerative diseases, called Tauopathies, is, without any exception, made up of the hyperphosphorylated protein (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). Unlike AD and Down's syndrome, which are characterized by the presence of both amyloid plaques and neurofibrillary tangles, Tauopathies [which include fronto-temporal lobar degeneration (Spillantini *et al.*, 1998), primary age-related Tauopathy, PART (Crary *et al.*, 2014; Duyckaerts *et al.*, 2015), progressive supranuclear palsy (Boxer *et al.*, 2017), corticobasal degeneration, Pick's disease (Buée Scherrer *et al.*, 1996), argyrophilic grain disease, postencephalitic parkinsonism (Hof *et al.*, 1992; Buée-Scherrer *et al.*, 1997) and Guam Parkinsonism dementia complex] (Hof *et al.*, 1994; Buée-Scherrer *et al.*, 1995) show Tau pathology in the absence of amyloid pathology. In fact, in some Tauopathies, this ratio is altered, e.g. while progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration are mostly 4R Tauopathies (Sergeant, Wattez and Delacourte, 1999), Pick's bodies are made of only 3R Tau in Pick's disease (Buée Scherrer *et al.*, 1996). Mutations in Tau gene that alter the 1:1 ratio of 3R and 4R cause tauopathies. Several missense mutations in *MAPT* cause frontotemporal lobar degeneration (Spillantini *et al.*, 1998; Spillantini, Bird and Ghetti, 1998). Independently of etiology, whether disease is caused by a Tau mutation as in familial cases of Tauopathies or no Tau mutation as in AD, Tau pathology is made up of the hyperphosphorylated protein. Thus, Tau pathology can be both primary as in familial cases of frontotemporal lobar degeneration and secondary as in AD. However, in both cases Tau pathology is strongly linked to cognitive impairment and hence a potential therapeutic target. Mechanisms of Tau pathology, especially involving hyperphosphorylation and truncation of Tau have been the subject of several recent review articles (Spillantini and Goedert, 2013; Holtzman *et al.*, 2016; Iqbal, Liu and Gong, 2016; Wang and Mandelkow, 2016). In this article, we will review various functions of Tau that could be compromised in AD and related Tauopathies, possible therapeutic strategies and their pros and cons, especially Tau immunotherapy which is at present a major focus of the field.

Various functions of Tau

Tau is now well known as a microtubule-associated protein in neurons (Weingarten *et al.*, 1975; Cleveland, Hwo and Kirschner, 1977; Drechsel *et al.*, 1992; Trinczek *et al.*, 1995). However, Tau presents various functions, depending on its localization inside and outside neurons, and these functions are altered under pathophysiological states (Figure 1).

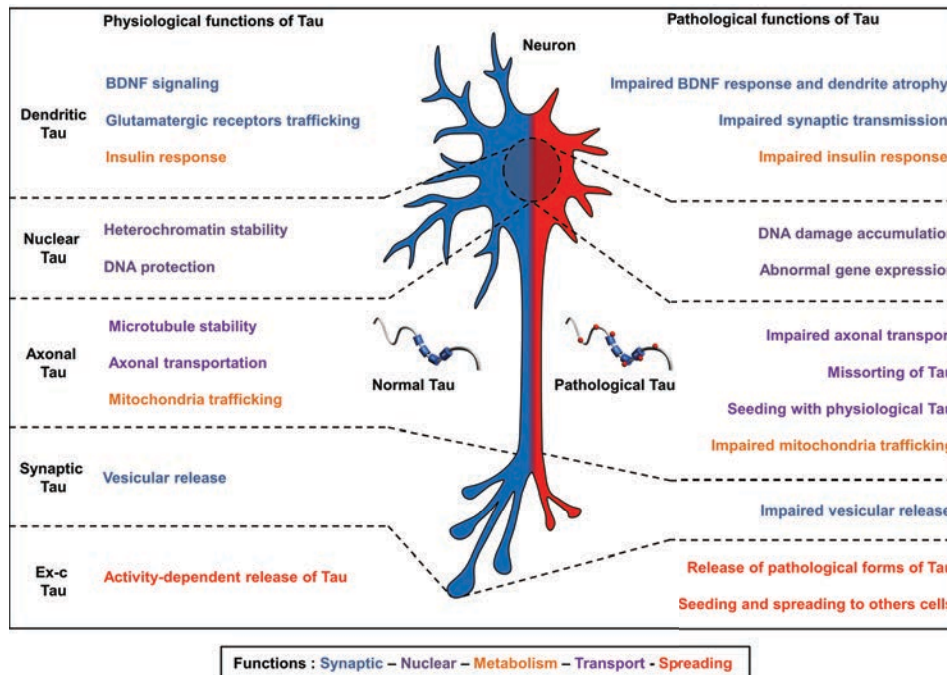


Figure 1: Various functions of Tau. Besides stabilization of microtubules, Tau is implicated in following functions: synaptic activity (signalling pathways, synaptic transmission, vesicular release), nuclear stability (DNA protection and heterochromatin stability), metabolism (insulin response and mitochondria trafficking) and extracellular functions still to be uncovered. In pathological conditions, there is an alteration of these functions that could explain many of the deficits observed in human Tauopathies and their animal models.

Tau is widely subject to post-translational modifications such as phosphorylation, acetylation, methylation, isomerization, glycation, nitration, ubiquitination, sumoylation, O-N- acetyl-gluco-aminylation (O-Glc-Nac) and truncation. Some of them, for instance truncation, glycation and polyamination exist under pathological states only while others, such as phosphorylation, glycosylation and nitration, which are fundamental for physiological functions of Tau, are deregulated in Tauopathies. In fact, in Tauopathies, Tau proteins are hyper and abnormally phosphorylated, and could have role in their aggregation (A. Alonso *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2007). These modifications induce changes of Tau functions. Indeed, it leads to somatodendritic relocalization of Tau (Tashiro *et al.*, 1997; X. Li *et al.*, 2011),

destabilization of microtubule network (Alonso *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2007), axonal transport deficits (Cuchillo-Ibanez *et al.*, 2008) and breakdown of neuronal polarity (X. Li *et al.*, 2011). Synaptic dysfunctions are also identified as axonal transport deficits, perturbations of recruitments of mitochondria to synapses, synapse depotentiation and spine collapse (Spires-Jones and Hyman, 2014). Tau deficiency alters synaptic plasticity, suggesting its potential role in memory mechanism (Ahmed *et al.*, 2014).

Tau as cytosolic MAP

Microtubule Associated Protein (MAP) Tau was first identified from porcine brain extracts as an essential factor for assembling microtubules in 1975 (Weingarten *et al.*, 1975; Witman *et al.*, 1976). It is interesting to note that Tau was isolated from Alzheimer neurofibrillary tangles as a PHF protein in 1974 (Iqbal *et al.*, 1974). It was not until 1986 that the PHF protein and the microtubule associated protein Tau were associated as one and the same (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986).

Microtubules are present in all cell types but are described as being particularly stable in neurons (Seitz-Tutter, Langford and Weiss, 1988). In fact, neurons are highly differentiated cells and microtubules are critical to the axon as they are required for axo-plasmic transport; microtubules enable axons to retract and expand to create neural circuits (Yamada, Spooner and Wessells, 1970). Tau can bind to the outside (Santarella *et al.*, 2004), and inside of microtubules (Kar *et al.*, 2003). This ability to bind microtubules depends on the C-terminal region of Tau named Microtubule Binding Domain (MBD) (Gustke *et al.*, 1994). This region contains three (3R isoforms) or four (4R isoforms) repeating units named R1, R2, R3 and R4 corresponding to highly conserved sequences of the MAP (M. Goedert *et al.*, 1989). These motifs are directly involved in the Tau binding to microtubules (Goode *et al.*, 1997; Kolarova *et al.*, 2012) and separated by inter-repeats, iR1, iR2 and iR3, which also play a role in microtubule binding affinity (Goode and Feinstein, *J. Cell. Biol.*, 1994). In fact, it has been shown that the absence of iR1 decreases the affinity of Tau for microtubules. Probably because of an extra iR, the 4R isoforms show a greater affinity for microtubules than the 3R isoforms (Panda *et al.*, 2003). This binding mechanism remains unclear but the studies show ionic binding, the repeating units are positively charged whereas the microtubules are negatively charged (Jho *et al.*, 2010; Kadavath *et al.*, 2015). Because, the N-terminal part of Tau is charged negatively, the protein is not able to bind microtubules but is involved in the

spacing between microtubules (Frappier *et al.*, 1994) and consequently regulates the axonal diameter (Boyne *et al.*, 1995).

Numerous *in vitro* and *in cellulo* mechanistic studies have shown that Tau increases the rate of microtubule polymerization (Witman *et al.*, 1976). Indeed, the length of polymerization of an isolated microtubule is nine times higher when Tau is present (Drechsel *et al.*, 1992). Thus, Tau protein is directly involved in the microtubular dynamic and a deregulation leads to various cellular consequences. Cleveland's work in 1977 showed that Tau may be phosphorylated (Cleveland, Hwo and Kirschner, 1977) and the phosphorylation can play a role in Tau functions notably in the microtubule dynamic. Early studies have shown that in its non-hyperphosphorylated form, Tau promotes polymerization of tubulin into microtubules better than when it is hyperphosphorylated (Lindwall and Cole, 1984; Alonso *et al.*, 1994). Subsequently, Tau phosphorylation sites involved in microtubule binding were identified. Indeed, the phosphorylation of Ser262, Ser293, Ser324 and Ser356 residues located in the repeat units results in inhibition of the Tau binding to microtubules (Biernat *et al.*, 1993; Drewes *et al.*, 1995, 1997; Fischer *et al.*, 2009). Thr231 and Ser235 residues located in the proline rich domain, which when phosphorylated result in a decrease in Tau affinity for microtubules (Sengupta *et al.*, 1998; Hamdane *et al.*, 2003; Cho and Johnson, 2004). Indeed, phosphorylation neutralizes the positive charge of C-terminal part of Tau, alters the conformation and leads to the detachment of Tau from microtubules. In pathological conditions, as in Tauopathies, the association of Tau with microtubules is disrupted because Tau is abnormally hyperphosphorylated (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986; Iqbal *et al.*, 1986; Jho *et al.*, 2010).

Tau as a nuclear protein

Since almost thirty years, Tau protein is also known to localise in nucleus where it plays many unclear roles (Metuzals *et al.*, 1988; Loomis *et al.*, 1990). Nuclear Tau protein has been reported in a large variety of cells including neuronal and non neuronal cells in rodent or primate cell lines and also in mouse and human brains (Maina, Al-Hilaly and Serpell, 2016). The major Tau isoform which localises in the nucleus is 1N4R although, other Tau isoforms are also present (Liu and Götz, 2013). Nuclear Tau is essentially non-phosphorylated but the existence of both phosphorylated and non-phosphorylated Tau has been reported in the nucleus (Guo, Noble and Hanger, 2017b). After hyperthermic stress, cytoplasmic

dephosphorylated Tau translocates to the nucleus suggesting that Tau phosphorylation state could mediate its shuttling between these two compartments (Alonso *et al.*, 2010; Sultan *et al.*, 2011). Tau is also located in the nucleolus where it is involved in the processing of ribosomal RNA. Indeed, a loss of Tau induces a decrease of ribosomal RNA synthesis and also affects ribosomal DNA stability (Bou Samra *et al.*, 2017).

In vitro studies have shown that purified Tau can bind nuclear DNA (Hua and He, 2003; Wei *et al.*, 2008). The protein domains involved in the interaction between Tau and DNA have been characterized in several studies and shown that Tau binds to the AT-rich minor groove of DNA through its proline-rich and microtubule binding domains (Rossi *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2015). Other studies demonstrate that Tau specifically binds to, AT-rich pericentromeric satellite DNA sequences (Sjoberg, 2006). Tau displays many phosphorylated sites in this location and reports indicate that Tau-DNA interaction is strongly reduced when Tau is phosphorylated (Qi *et al.*, 2015). Studies performed in Tau-deficient mice (KO-Tau) have revealed that Tau plays a major role in DNA and RNA protection under physiological and hyperthermic conditions (Sultan *et al.*, 2011; Violet *et al.*, 2014). Interestingly, hyperphosphorylation of Tau prevents its protecting effect of DNA from damages in N2A cell lines (Lu *et al.*, 2013) and in the brain of a mouse model of Tauopathies (Thy-Tau22). In this Thy-Tau22 mouse model, hyperthermia-induced Tau oligomers correlate with accumulation of nucleic acid damage. It seems that Tau oligomerization process prevents DNA protective function of soluble Tau monomers (Violet *et al.*, 2015). A recent study in HEK293 cells has demonstrated that hyperphosphorylation of nuclear Tau at Thr205 activates the Ca²⁺/CaMKIV pathway which aggravates, in turn, Tau phosphorylation and thus leads to neurodegeneration (Wei *et al.*, 2018).

The involvement of nuclear Tau in the regulation of gene expression is still unclear. Few micro array studies have shown differences in transcripts between wild type and KO-Tau mice (Oyama *et al.*, 2004). A study reported the involvement of Tau in BAF-57 expression which is a protein of the chromatin remodelling SWI/SNF complex (Gómez de Barreda *et al.*, 2010). Tau can bind to the histone deacetylase HDAC6, a cytosolic enzyme which is involved in tubulin-deacetylase. Tau-HDAC6 interaction leads to the inhibition of the latter and thus to the acetylation of its targets (Perez *et al.*, 2009). Likewise, due to its ability to bind HDAC6 in cytosol, nuclear Tau could also regulate histone acetylase/deacetylase activity and thus modify the expression of genes. Furthermore, the effect of nuclear Tau on gene expression could be

direct through DNA interaction or indirect through the interaction of Tau with proteins involved in gene expression regulation.

In nucleus, Tau binds to and colocalizes with pericentromeric heterochromatin (PCH), a highly repeated major satellite DNA sequence rich in histone 3 trimethylated on lysine 9 (H3K9me3) and heterochromatin protein 1 alpha (HP1alpha), in primary neuronal cultures from wild-type mice (Mansuroglu *et al.*, 2016). Interestingly, in neurons of Tau deficient mice the distribution of H3K9me3 and HP1alpha is disrupted, demonstrating a new physiological function of Tau regulating neuronal PCH integrity which is impaired in AD (Mansuroglu *et al.*, 2016). Importantly, several studies demonstrated alteration of epigenetic markers in AD such as, cytoplasmic accumulation of histone 3 trimethylation on lysine 4 (H3K4me3) in human brain AD (Mastroeni *et al.*, 2015). Alterations of these epigenetic markers are associated with heterochromatin loss in Tau transgenic drosophila and human AD establishing this phenomenon as a toxic effector of Tau-induced neurodegeneration. Heterochromatin relaxation allows the aberrant expression of genes that are heterochromatically silenced and could lead to neurodegeneration (Frost *et al.*, 2014). Dysregulated genes related to Tau induced neurodegeneration are potential targets for Tau-based therapies.

Tau as membrane/synaptic protein

Biochemical analysis showed that there is at least as much Tau in the human cerebral grey matter as in the underlying white matter (Khatoon, Grundke-Iqbal and Iqbal, 1994). However, Tau immunohistochemically is mainly distributed in the axonal compartment of adult neurons, but during pathological events, as in AD, is relocalized in the somato-dendritic compartment which can lead to synaptic impairment (Hoover *et al.*, 2010). Even if there is less Tau in dendrites, 70% of postsynaptic membranes are positively stained for Tau (Tai *et al.*, 2012), which suggest a role in the synaptic transmission. Tau pathology correlates with cognitive deficit/synaptic impairment, thus emphasizing the importance of Tau for synaptic function and cognition (Braak and Braak, 1991; Duyckaerts *et al.*, 1997; Grober *et al.*, 1999). Additionally, Tau mRNA is found in the dendritic spines (Malmqvist, Anthony and Gallo, 2014). There are several isoforms of Tau in neurons. Post-translational changes are also potent modifiers of Tau localization, as for example hyperphosphorylated Tau tends to relocalize in the somatodendritic compartment (Tashiro *et al.*, 1997; Hoover *et al.*, 2010). One hypothesis to explain this relocalisation would be the existence of a diffusion barrier that prevents Tau from

entering somatodendritic compartment of mature and healthy neurons (X. Li *et al.*, 2011). In pathological condition, where Tau is found hyperphosphorylated, Tau is detached from microtubules and can diffuse to the somatodendritic compartment (Zempel *et al.*, 2010). Furthermore, there is evidence that suggests an activity-dependant transfer of Tau from presynaptic to postsynaptic compartment (Pooler *et al.*, 2013; K. Yamada *et al.*, 2014; Sokolow *et al.*, 2015).

Tau function is closely related to its phosphorylation state. Phosphorylation of Tau is dependant of kinase activity, and it is interesting to note that two of the main kinases of Tau, namely GSK3- β and p38 MAPK, are found located in the post-synaptic compartment (Mandelkow *et al.*, 1992). For example, the phosphorylation of Tau at Ser396 is critical for the induction of long term potentiation (LTD), a critical process for memory (Regan *et al.*, 2015) and both GSK3- β and p38 MAPK can phosphorylate Tau at this site (Sergeant, Bretteville, Hamdane, Caillet-Boudin, *et al.*, 2008). The required function of Tau for LTD was confirmed using Tau deficient mouse model that showed a selective impairment of LTD in hippocampus (Kimura *et al.*, 2014). One possible mechanism resides in the interaction between Tau and the AMPA receptor subunit GluA2 that is necessary for LTD induction (Yagishita *et al.*, 2015) and the ability for Tau to regulate AMPAR trafficking in the post-synaptic membrane (Suzuki and Kimura, 2017). Additionally, Tau interaction with the Src Kinase Fyn modulate the membrane stability of the NR2B subunit of NMDAR, another critical component for synaptic plasticity and memory (Ittner *et al.*, 2010a; Mondragón-Rodríguez *et al.*, 2012). Tau has also been linked to the main neurotrophic factor in the brain, the BDNF, as Tau is necessary for the increase of spine density induced by BDNF (Chen *et al.*, 2012) and Tau deletion result in a loss of synaptic mass possibly due to an impairment of BDNF signalling (Burnouf *et al.*, 2013; Jiao *et al.*, 2016). Several studies show that there is a synaptic hyperphosphorylation of Tau (Muntané *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2010) and that Tau is required for synaptic impairment induced by β -amyloid peptide, as Tau deletion prevents amyloid toxicity (Mark Rapoport *et al.*, 2002; Roberson *et al.*, 2007; Shipton *et al.*, 2011).

Spatiotemporal evolution of Tau pathology, as hyperphosphorylation and aggregation is well correlated with the cognitive deficits, known as Braak Stages in AD (Braak and Braak, 1991). As Tau function is critically linked to its phosphorylation state, one can assume that the abnormal hyperphosphorylation of Tau during disease can have 2 effects: a loss-of-function or a toxic gain-of-function. This mechanism could explain the possible link between Tau

pathology and cognitive deficit. For instance, the well described interaction between Tau and Fyn, regulating NMDAR stability, is found decreased when Tau is hyperphosphorylated (Lau *et al.*, 2016). Phosphorylation of Tau at Ser396 and Ser404 is correlated with a loss of synaptic markers and a reduction of dendritic spines (Muntané *et al.*, 2008; Pinheiro *et al.*, 2016). Other post translational modifications should not be discarded, as for example abnormal acetylation of Tau on Lys274 and Lys281, as found in AD, can impair AMPAR trafficking and LTP (Tracy *et al.*, 2016).

Altogether, several studies show a critical role for Tau in synaptic function, and provide new evidence that those pathological changes of Tau results in synaptic impairment which translates into cognitive deficits.

Tau as mediator of metabolism

Brain hypometabolism and Tau phosphorylation

The maintenance of energy metabolism is a crucial process for all living cells. Metabolic alterations are an early event in neurodegenerative disorders including Tauopathies. Indeed, defects in energy metabolism, mitochondrial dysfunctions and oxidative stress are commonly described in these disorders. Increasing number of studies show interrelation between alteration in metabolic control, mitochondrial dysfunction and hyperphosphorylation of Tau protein.

Glucose is the main source of energy in the brain, in particular for neurons that need a continuous supply of energy for the maintenance of their functions (Auer and Siesjö, 1993). Therefore, any changes in glucose availability could have harmful effects for brain functions. Defects in energy metabolism are observed in several Tauopathies including AD, frontotemporal dementia (FTD), progressive supranuclear palsy (PSP) and corticobasal dementia (CBD) (Mosconi, Pupi and De Leon, 2008). Indeed, positron emission tomography (PET) imaging performed in patients affected by these diseases reveals that in restricted brain areas, including parietotemporal and frontotemporal regions and prefrontal cortex, there is a strong reduction of glucose utilization compared to that in aged-matched healthy persons (Mosconi, Pupi and De Leon, 2008; Teune *et al.*, 2010). Recent studies showed that glucose deprivation induces in neuronal cells an increase of Tau phosphorylation, mediated by the activation of P38MAPK pathway (Lauretti and Praticò, 2015), and in a h-Tau mouse model it produces learning and memory impairments (Lauretti *et al.*, 2017). Additionally, it has been

also demonstrated that the decrease of metabolic rate observed in a model of hibernating animal triggers PHF-like hyper-phosphorylation of Tau (Planel, 2004; Arendt, Stieler and Holzer, 2015). However, in this model, Tau phosphorylation is fully reversible after arousal, suggesting that phosphorylation of Tau protein during hypometabolic state could represent a physiological adaptation with protective functions which is lost if the hypometabolism persists (Arendt, Stieler and Holzer, 2015).

Tau and insulin

At present, several studies showed a correlation between type 2 diabetes and the development of neurodegenerative diseases, such AD (Ott *et al.*, 1999; Ho *et al.*, 2004; Jimenez-Palomares *et al.*, 2012). Additional studies show the interrelation between brain insulin signalling and neuronal plasticity in neuronal cells as well as *in vivo* (Wan *et al.*, 1997; Chiu, Chen and Cline, 2008). However, the link between Tau functionality and the insulin signalling is still to be deciphered.

A recent study uncovered that Tau is necessary for normal insulin response in the brain (Marciniak *et al.*, 2017). The abrogation of Tau expression, in a Tau knockout mouse model, impairs the long-term depression (LTD) induced by insulin in hippocampus, as well as the anorexigenic effect of insulin in hypothalamus. The hypothesis is that PTEN (phosphatase and tensin homologue on chromosome 10), an inhibitor of the PI3K-Akt pathway of the insulin receptor, physiologically binds Tau protein, abrogating its function. Therefore, loss of Tau functions, as in Tauopathies, prevents the binding between Tau and PTEN, thus inducing a brain insulin resistance.

Tau and adenosine metabolism

In the past decades, several studies showed a possible protective effect of caffeine consumption towards Alzheimer's disease and others dementia (Flaten *et al.*, 2014). Caffeine acts in the brain as a non-specific antagonist of adenosine receptor, and it has been shown in Tau mouse model (THY-Tau22) that caffeine consumption prevents hyperphosphorylation of tau and related memory deficits, linking adenosine metabolism and tau pathology (Laurent *et al.*, 2014). Following this results, our team showed that this beneficial effect of caffeine towards tau was linked to the blockade of the adenosine A2A receptor (Laurent *et al.*, 2016). This is particularly interesting as A2AR is found overexpressed during AD (Albasanz *et al.*, 2008; Temido-Ferreira *et al.*, 2018) and correlated with tau pathology progression in the brain

(Braak stages) (Orr *et al.*, 2015). In light of these results, due to beneficial effect of the blockade of $\alpha_2\alpha$ receptors for the pathophysiological development of tau, adenosinergic pathway should be considered for the clinical point of view as a potential therapeutic target (Cellai *et al.* *in press*).

Mitochondrial dysfunctions and Tau alterations: who come first?

Mitochondria are the power plants of neuronal cells, providing most of the ATP required for both the survival and functionality of neurons, as well in regulating the production of reactive oxygen species (ROS) and the signalling of cell apoptosis. During synaptic activation, mitochondria are of central importance for buffering Ca^{2+} influx (Werth and Thayer, 1994), and supplying the ATP required for neuronal transmission, vesicle release, neurotransmitter recycling and re-establishment of ion gradient across the post-synaptic membrane (Attwell and Laughlin, 2001). In neural cells mitochondria can be stationary, docked in regions requiring a constant provision of metabolic ATP such as synaptic terminals and dendritic spines (Kang *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2013). Alternatively, mitochondria are transported within the axon and dendrites along the microtubule binaries of the cells, to provide metabolic energy and accomplish Ca^{2+} buffering functions. Mitochondrial anterograde transport is mediated by the kinesin-1 motors (KIF5), while anterograde trafficking is dependent on the cytoplasmic dynein motors (Ruthel and Hollenbeck, 2003; Pilling *et al.*, 2006; Saxton and Hollenbeck, 2012). To maintain their functionality, distribution, size and morphology, mitochondria undergo fusion, fission and mitophagy. In mammalian cells. Mitochondrial fusion is mediated by three proteins: mitofusin1 and 2 (Mfn1, Mfn2), which are located in the outer mitochondrial membrane, and OPA1, in the internal mitochondria membrane (IMM) (Chen *et al.*, 2003; Cipolat *et al.*, 2004). Fission, instead, is induced by the cytoplasmic dynamin-related protein 1 (Drp1) (Frank *et al.*, 2001). Mitophagy is a quality control system by which dysfunctional mitochondria are degraded and eliminated (Youle and Narendra, 2011). This process is principally mediated by the activity of PINK1 and the E3 ubiquitin-protein ligase, that binds and ubiquitinates abnormal mitochondria, respectively and recruit them for autophagosome-dependent degradation (Narendra *et al.*, 2008, 2010; Ziviani, Tao and Whitworth, 2010).

Dysfunctional and mislocalized mitochondria are considered as a common hallmark of several neurodegenerative diseases, including AD and Tauopathies (David *et al.*, 2005; De Vos *et al.*, 2008). Several studies show a correlation between Tau and the functionality,

localization and dynamics of mitochondria. A recent study showed that in neuronal cells, decrease in ATP availability, induced by reduction of mitochondrial oxidative respiration, associates with alteration in the level, distribution, phosphorylation and aggregation of Tau protein. Treatment of primary rat striatal neurons with annonacin, MPP⁺ or NP-3, three inhibitors targeting specific mitochondrial respiratory complexes, causes a redistribution of Tau protein from the axon to the cell body and an increase in phosphorylation and level of Tau. Similarly, injection of annonacin and rotenone, an inhibitor of the respiratory complex I, induces redistribution, phosphorylation, accumulation and aggregation of Tau protein in neuronal cells in rodent brain (Höglinger *et al.*, 2005; Escobar-Khondiker *et al.*, 2007; Höllerhage *et al.*, 2009; E. S. Yamada *et al.*, 2014), suggesting that aberrant mitochondrial function associates with alteration of Tau protein functionality.

Correlation between mitochondria and Tau is not unidirectional: Tau indeed has been described to affect mitochondrial trafficking, dynamics and degradation.

Mitochondria are trafficked within neuronal cells along microtubules, the stability of which is dependent on Tau phosphorylation (Mandelkow *et al.*, 2004; Tatebayashi *et al.*, 2004). In neurons from mouse models of Tauopathies and AD, mislocalization of Tau disrupts mitochondrial trafficking, thus eventually affecting the distribution and supply of energy in neuronal cells (Kopeikina *et al.*, 2011; Zempel and Mandelkow, 2015). Additionally, neurons from Tau P301L knock-in mice, where a hypophosphorylation of Tau is reported, present a reduction in the number of axonal mitochondria (Rodríguez-Martín *et al.*, 2016).

Recent studies show that phosphorylated Tau protein promotes mitochondrial fragmentation by interacting with Drp1, therefore causing mitochondrial deficiency and death of neurons (Manczak and Reddy, 2012; Kandimalla *et al.*, 2016). Overexpression of wild-type Tau protein has been shown to upregulate mitochondrial fusion, causing the accumulation of longer mitochondria and deficits in mitophagy by impairing the binding of PINK1/Parkin to mitochondria (X.-C. Li *et al.*, 2016; Y. Hu *et al.*, 2016).

In neuronal metabolism, metabolic energy regulation and Tau phosphorylation are strictly and reciprocally connected. However, the dilemma of “who comes first” in the pathogenesis of Tauopathies and AD is still unknown and further investigations are required to find answers.

AMPK not only a metabolic regulator

Besides these early events, Tauopathies are also characterized by a deregulation of the metabolic sensor, AMP-activated protein kinase (AMPK). AMPK is a serine/threonine kinase which is abundantly expressed in brain neurons. AMPK is a heterotrimer which contains a catalytic subunit (α) and two regulatory subunits (β and γ). Once activated, AMPK restores intracellular energy balance by stimulating ATP-producing pathways, by acting on glycolysis, mitochondria biogenesis, and inhibits anabolic ATP-consuming pathways, such as protein synthesis (Carling, 2004). It has been shown that AMPK is deregulated in AD and in other Tauopathies where it co-localizes with hyper-phosphorylated Tau in pre-tangle and tangle-bearing neurons (Vingtdeux *et al.*, 2011). *In vitro* studies using recombinant protein and *in vivo* studies showed that AMPK could phosphorylate Tau protein at several epitopes including Ser²⁶², Thr²³¹, Ser³⁵⁶ and Ser^{396/404} (Wang, Grundke-Iqbal and Iqbal, 2007; Thornton *et al.*, 2011; Domise *et al.*, 2016). Moreover, recent studies revealed that a deficiency of AMPK reduces Tau pathology in the PS19 mouse model suggesting that AMPK could regulate Tau pathology (Domise *et al.*, 2016).

Overall, these studies suggest that alteration of metabolic alteration, as well as AMPK activity could represent a potential target for therapeutic approach in the very early pathological phase of AD and Tauopathies.

Dysfunctions in the mitochondrial organelles, in particular reduction in oxidative respiration, has been described to alter Tau aggregation and localization in neuronal cells. However, alteration in Tau functionality has been associated to abnormality in mitochondrial trafficking, dynamics, such as mitochondrial fission and fusion, and with altered mitophagy. Alteration in neuronal metabolism is associated with several neurodegenerative diseases. AMP activated protein kinase (AMPK) is not only an intracellular energy sensor and regulator, but it also found overactivated in degenerating neurons.

Tau as a prion-like protein

In prion disorders, prion protein aggregates spread across the brain through an intercellular propagation. Once entered in healthy cells, these pathological aggregates induce conformational changes and aggregation of physiological prion proteins (Fraser, 2014).

The prion-like transmission was implicated in 1978 when treatment of foetal human primary neuronal cultures with extract from an AD brain was found to induce Alzheimer's like PHF (De Boni and Crapper, 1978). Later, hyperphosphorylated, mutated and truncated Tau proteins were shown to template normal Tau in a prion-like fashion (Alonso, Grundke-Iqbal and Iqbal, 1996; Clavaguera *et al.*, 2009; Holmes and Diamond, 2014; Sanders *et al.*, 2014; W. Hu *et al.*, 2016). Injection of brain extracts from P301L transgenic mice or AD cases in the brains of mice over-expressing wild-Type Tau results in the appearance of Tau aggregation at the injection site and in distant and neuro-connected brain regions which suggest an intercellular and trans-synaptic spread of Tau pathology (Clavaguera *et al.*, 2009, 2013; W. Hu *et al.*, 2016; C. Dai *et al.*, 2018). In Tau transgenic mice expressing the P301L Tau protein in the entorhinal cortex, Tau aggregation and synaptic degeneration was found in proximal brain regions: the CA1 region of hippocampus and granule cells of the dentate gyrus where the Tau transgene wasn't expressed. These observations reflect the ability of P301L misfolded Tau to induce aggregation of both Tau transgene and endogenous wild-type Tau which suggest the existence of "trans-cellular" propagation pathways (de Calignon *et al.*, 2012; L. Liu *et al.*, 2012; Dujardin *et al.*, 2014).

In vitro studies brings further evidence in support on this potential Tau trans-synaptic propagation by demonstrating that the physical presence of synaptic contacts between neurons facilitate Tau pathology propagation (Calafate *et al.*, 2015). Once injected in the hippocampus of transgenic mice overexpressing human Tau, hyperphosphorylated Tau is taken up by proximal neurons, induces seeding of human Tau and is axonally transported in connected regions in a prion-like manner. This finding suggests a random spread of Tau pathology by proximity (W. Hu *et al.*, 2016). Indeed, Tau seeds could be released from dying and damaged neurons and then taken up by unaffected cells in proximity. Such a mechanism might be one of the sources of the spread of Tau pathology and amenable to immunotherapy. Most of the Tau is secreted from neuronal plasma membrane by unconventional protein secretion (UPS) mechanism upon its detachment from microtubules due to hyperphosphorylation and is taken up by the recipient neurons from the extracellular space at random (Katsinelos *et al.*, 2018).

In physiological conditions and under the influence of neuronal activity, Tau protein is released by neurons in a non-vesicular and unconventional way (Pooler *et al.*, 2013; K. Yamada *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016; Katsinelos *et al.*, 2018). Tau release can also be mediated by exosomes (Saman *et al.*, 2012; K. Yamada *et al.*, 2014). Although this vesicular

release of Tau represents only a small percentage of the extracellular Tau (Saman *et al.*, 2012; Dujardin *et al.*, 2014), a recent study showed that this exosomal Tau could play an important role in Tau propagation. Indeed, thanks to an adeno-associated virus-based model of Tau propagation, it was shown that depleting microglia or inhibit exosome synthesis dramatically suppress the propagation of Tau in vivo (Asai *et al.*, 2015). Tunnelling nanotubes have also been identified as another mechanism for Tau aggregates transmission and interestingly exposure to exogenous Tau seems to increase the number of these tunnelling structures (Tardivel *et al.*, 2016). Tau release from neurons can also be due to CSP α - dependent exocytosis, a co-chaperone dysregulated in AD (Tiwari *et al.*, 2015).

Regarding the uptake of aggregated Tau by adjacent and connected neurons, it has been shown that low molecular weight aggregates and short fibrils of recombinant Tau can be internalised by endocytosis. Indeed, the blocking of this Tau internalisation way by inhibiting dynamin reduces the propagation of Tau pathology (Wu *et al.*, 2013).

In cultured cells and primary neurons, extracellular Tau has been shown to bind heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) and thereby enter into cells by micropinocytosis (Holmes *et al.*, 2013). Interestingly, HSPGs have been previously linked to prion protein (Snow *et al.*, 1990). Thus, preventing prion seeds from binding HSPGs present at the cell surface may be a good way to slow down the progression of neurodegenerative diseases. This approach has been tried for prion disease with pentosan polysulfate which proved to be highly effective at inhibiting PrP^{Sc} formation both *in vitro* and in rodent models (Tsuboi, Doh-Ura and Yamada, 2009). This compound has also been tested in humans with Creutzfeldt-Jakob Disease and even it didn't halt progressive deterioration of the brain, it seems to prolong the survival of these patients (Tsuboi, Doh-Ura and Yamada, 2009; Holmes and Diamond, 2014).

Certain Tau modifications, such as truncation appears to enhance Tau ability to aggregate and propagate between cells. Indeed some truncated Tau, such as Tau₂₄₃₋₄₄₁ (Tau-CTF24) showed higher propensity for aggregation, higher efficiency for propagation as well as faster and greater cell binding than aggregated full-length Tau (Matsumoto *et al.*, 2015). These observations suggest that Tau truncation enhances its prion-like propagation and likely contributes to neurodegeneration.

Because of their exclusive ability to be picked up by cells, Tau oligomers and short fibrils have been described as essential species for Tau propagation (Wu *et al.*, 2013). In vitro the best Tau particle size that can be taken up by cells is a decamer but if we look at the seeding

potency, bigger particle size have better properties (Mirbaha *et al.*, 2015) which suggest that a balance between transmissibility and propensity to aggregate is required for effective inter-neuronal propagation of pathogenic Tau species.

Prion diseases are also characterized by different strains of prions which induce distinct neurodegenerative phenotypes with reproducible patterns of neuropathology (Kaufman *et al.*, 2016). Tau protein seems to exhibit a similar behaviour when brain homogenates prepared from different types of Tauopathies (AD, PSP and CBD), are injected into the brains of Tau transgenic mice (Boluda *et al.*, 2015; Kaufman *et al.*, 2016). The Tau inclusions formed in the brains of injected mice closely look like those originally injected (Clavaguera *et al.*, 2009). Therefore, the nature of Tau seeds seems to be determinant for the structural characteristics of resultant Tau aggregates (Frost, Jacks and Diamond, 2009). The nature of Tau seeds could depend on its degree and/or pattern of hyperphosphorylation; dephosphorylation of hyperphosphorylated Tau from AD brain with protein phosphatase-2A was found to alter its ability to seed and propagate AD-like neurofibrillary tangles into argyrophilic grains when injected in the brains of human Tau transgenic mice (W. Hu *et al.*, 2016).

Increasing number of studies on the spread of Tau pathology are in favour of the prion-like hypothesis. Pathological Tau oligomers and/or aggregates potentially propagate through *trans-synaptic* transmission which explain how the occurrence of a nidus of aggregated pathological Tau may seed physiological Tau and induce its aggregation and spread to distant brain regions during the onset of Tauopathies (Goedert, Masuda-Suzukake and Falcon, 2017).

However, crucial distinctions remain between Tauopathies and prionopathies. Prion diseases are transmissible and despite decades of studies there is still no evidence that Tauopathies are transmitted from affected to unaffected individuals. Moreover, a species barrier is present in prion diseases but absent in Tauopathies where human mutated Tau can recruit mouse or rat endogenous Tau. Finally, most prion disorders exhibit a rapid progression within the CNS whereas most neurodegenerative diseases progress over many years. Nonetheless all these findings strongly support the fact that Tau protein and especially extracellular Tau is a viable target for treatment of AD and Tauopathies (Dai *et al.*, 2017; C. Dai *et al.*, 2018).

What biophysical state of Tau to target and why

As the main component of neuronal lesions of AD and Tauopathies, Tau represents a target of interest in therapeutics and clinical research against neurological disorders.

Tau occurs to be a highly flexible protein with no secondary structure (Jeganathan *et al.*, 2008) or few secondary structures, notably short sequences corresponding to the PHF6* and PHF6, which have a beta-strand tendency in soluble state (Mukrasch *et al.*, 2009). In addition, short secondary structure elements were shown to be stabilized by specific phosphorylations, interestingly corresponding to the AT8 or AT180 epitopes (Sibille *et al.*, 2012; Gandhi *et al.*, 2015; Schwalbe *et al.*, 2015).

When it becomes pathologic, Tau accumulates into oligomers and forms toxic intraneuronal aggregates that are notably highly phosphorylated (E. Köpke *et al.*, 1993). Moreover, it has been demonstrated that Tau phosphorylation and progression in AD correlate with the severity of dementia (Augustinack *et al.*, 2002). Thus, targeting Tau involves preventing and/or reducing its abnormal phosphorylation, oligomerization or disaggregating Tau inclusions. Phosphorylation is the main post-translational modification of Tau and its deregulation is proposed to be at the origin of Tau pathology (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). Although, the molecular role of Tau hyperphosphorylation in the process of PHF formation is still elusive and only few studies directly point out the intrinsic capacity of hyperphosphorylation to trigger aggregation (A. del C. Alonso *et al.*, 2001). Concerning the mechanism of phospho-dependent regulation of Tau functions, there is no precise evidence whether the pathological role of phosphorylation depends on specific phosphorylation sites or on an overall, not site-specific, increase of phosphorylation level. Moreover, the specific role of phospho-epitopes in the process of fiber formation is still under study to decipher the functional role of phosphorylation in Tau aggregation and to be able to give a better definition of what is a pathological “AD-Tau”. The identification of the phosphorylation patterns responsible for converting Tau into an AD-Tau is a first step to find new therapeutic kinase targets (Wang, Grundke-Iqbal and Iqbal, 2007; Despres *et al.*, 2017).

Thus, several studies have been focused on targeting kinases or phosphatases regulating Tau phosphorylation to treat AD and related dementia. Among them, inhibition of the serine-threonine kinase glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) has been by far the most studied as it is also involved in the production of A β peptides (Phiel *et al.*, 2003; Eldar-Finkelman and Martinez, 2011). Only a small number of molecules have been tested *in vivo* but they have

demonstrated interesting effects in transgenic mouse models of Tauopathies. Indeed, in these models, a reduction of both Tau phosphorylation and levels of aggregated insoluble Tau associated with cognitive improvements have been observed (Noble *et al.*, 2005; Caccamo *et al.*, 2007; Licht-Murava *et al.*, 2016). However, most GSK-3 inhibitors have not succeeded in clinic trials in human subjects yet because of lack of clinical improvements or therapeutic effects. Others are still undergoing clinical development (Hempel *et al.*, 2015; Lovestone *et al.*, 2015; Pandey and DeGrado, 2016). Given this and the non-specificity of kinases, other therapeutic approaches must be considered.

Prevention of Tau aggregation by inhibition of the formation of oligomers and fibrils represents a rational therapeutic approach as it seems to be specific to Tau protein and its toxic species. In this context, Tau aggregation/PHF inhibitors have been developed and have demonstrated efficiency in cellular and transgenic mice models such as methylthionium (methylene blue) or anthraquinone derivatives (Wischik *et al.*, 1996; Pickhardt *et al.*, 2005, 2007; Melis *et al.*, 2015). These kinds of molecules are able to disrupt Tau aggregates, to prevent Tau-Tau binding interactions without impairing its normal tubulin interactions as well as producing benefits in behaviour and Tau pathology. Only methylene blue, a Tau anti-aggregant, has been tested in humans and reached phase II clinical trials during which it suggested a positive therapeutic effect (Wischik *et al.*, 2015). However, a recent feedback on a phase III trial of the methylene blue derivate, Leuco-methylthionium bis(hydromethanesulfonate) reports negative results on disease progression in patients with mild to moderate AD (Gauthier *et al.*, 2016).

As the most toxic form of Tau is still in debate, proteins involved in both Tau phosphorylation and structural changes can be interesting for therapeutics. Notably, peptidyl-prolyl isomerases (PPIases) such as FKBP52 or Pin1 are able to regulate Tau structure and function before its Pro-residues (Blair *et al.*, 2015). In this sense, FKBP52 has been recently shown to play a role in Tau pathogenicity by inducing the aggregation of truncated forms of Tau *in vitro* (Giustiniani *et al.*, 2015) suggesting that FKBP52 could be a potential target in Tauopathies.

Another aspect for therapies targeting Tau involves degradation pathways. Cells are capable of handling misfolded proteins or aggregates through degradation pathways involving either the Ubiquitin-Proteasome System (UPS) or the Autophagy-Lysosome Pathway (Ciechanover and Kwon, 2017). These mechanisms are even more important for neurons to clear or recycle

cell components. Indeed, as they are post-mitotic cells, they are not able to clear toxic substances via mitosis and they are more sensitive to protein aggregation.

Tau is known to be degraded through the proteasome system associated with chaperones (Petrucci *et al.*, 2004; Tseng *et al.*, 2008) and recently also via autophagy (Kim *et al.*, 2017). Moreover, Tau interferes with the normal functions of UPS (Abisambra *et al.*, 2013; Myeku *et al.*, 2015) and impairment of protein homeostasis is associated with neurodegenerative diseases such as AD (Opattova *et al.*, 2015).

In this sense, approaches targeting chaperones of the UPS involved in Tau metabolism have been tested in mouse models. For example, EC102, an HSP90 inhibitor has shown significant results concerning the reduction of p-Tau species in a mouse model of Tauopathy (Dickey *et al.*, 2007). Furthermore, recent results confirm that induction of autophagy clearance system is also an interesting pathway to follow. Indeed, it has been demonstrated that activation of autophagy by the AMPK-ULK1 axis or by the AMPK-mTOR pathway can both rescue memory impairment and reduce Tau aggregates in AD mouse models (Kim *et al.*, 2017; Zhong-hao Zhang *et al.*, 2017). Together, these findings indicate the importance of degradation pathways in Tauopathies and suggest that they could offer a promising therapeutic target.

Recently, new alternatives to target Tau have seen the light of day such as immunization, using Tau polypeptides or antibodies, which may also target extracellular Tau.

Tau immunization

Why targeting Tau by immunotherapy?

A lot of different therapeutic strategies have been studied to evaluate their potential effectiveness in treatment of Tauopathies. Unfortunately, most of these approaches did not succeed to significantly rescue the cognitive deficits in patients. In view of the potential prion-like character of Tau protein, one of the best approaches to target the pathological Tau could be immunotherapy whereas these potential immunotherapeutic treatments still face several challenges. First, only a small percentage of antibodies (~0.1%) cross the blood brain barrier, thus it may be helpful to find ways to improve antibody penetration into the brain. This problem is partially solved by the fact that AD patients present a BBB disruption allowing a greater access to the CNS for peripheral IgG (Bowman *et al.*, 2007; Chalbot *et al.*, 2011). The use of chaperone proteins, transient opening of the BBB and direct infusion of antibodies into the

brain with a time-released pump are also considered. Second, it is known that the pathology of AD and other neurodegenerative diseases settle and evolve for several years or even decades before the appearance of the first symptoms suggesting that a development of early and sensitive biomarkers in order to be able to treat these patients as early as possible and test immunotherapies for longer periods of time. Finally, further studies are needed concerning the location and the mode of clearance of the antibody-antigen complexes to avoid clogging of the clearance pathway during long-term treatment.

Up to now, many research teams focused on immunotherapy targeting the amyloid beta peptide and showed a significant reduction in A β deposits (Schenk *et al.*, 1999; Bard *et al.*, 2000) as well as a significant decrease in cognitive decline in AD mouse models (Janus *et al.*, 2000; Morgan *et al.*, 2000). In view of its positive outcomes in mouse models, passive and active immunotherapy clinical trials began targeting A β peptide but some of them had to be halted because of inefficiency (Doody *et al.*, 2014; Salloway *et al.*, 2014) or toxicity (Orgogozo *et al.*, 2003).

It seems that in human AD patients, targeting only the A β peptide is not enough to reduce Tau pathology and enhance cognitive functions. In AD, the severity of cognitive decline correlates better with the evolution of neurofibrillary tangles (NFTs) than amyloid deposits (Wilcock and Esiri, 1982; Nelson *et al.*, 2012; Schwarz *et al.*, 2016). Moreover, a previous study conducted on a mouse model of AD that develop both aspect of the disease showed that anti- A β immunotherapy had no effect on Tau pathology and did not improve cognitive functions (Oddo *et al.*, 2006). Taken together, these studies strongly support that a reduction of Tau pathology is needed to enhance cognitive functions.

Results from anti-Tau immunotherapeutic studies in AD mouse models are promising. By targeting different pathological epitopes of Tau, immunotherapeutic studies showed a reduction of Tau pathology and cognitive deficit in different mouse models of Tauopathies or AD (Ayodeji A. Asuni *et al.*, 2007; Boutajangout, Quartermain and Sigurdsson, 2010; Troquier *et al.*, 2012; C. Dai *et al.*, 2018). Finally, it has been recently demonstrated that a passive anti-Tau immunotherapy in 3 \times Tg-AD mice could successfully reduce not only the Tau pathology but also inhibit the A β pathology (Dai *et al.*, 2017).

Recently, the use of a novel class of antibody called VHH (Variable Heavy chain of the Heavy chain only antibody) are also investigated as a new immunotherapeutic strategy. VHH are also called single domain antibodies or nanobodies. They are constituted of a unique chain which corresponds to the variable heavy chain from the Immunoglobulin G from *Camelidae*

(Hamers-Casterman *et al.*, 1993). Due to their small size and high stability, they have been described to cross the blood brain barrier more easily than classic antibodies. They can easily be modified to penetrate into the cytoplasm of cells and bind specifically to their target protein (T. Li, Bourgeois, *et al.*, 2016). Clinical trials are actually ongoing with bivalent and trivalent VHH to treat different diseases such as Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (Caplacizumab, Ablynx, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02553317) and Respiratory Syncytial Virus infection in infants (ALX-0171, Ablynx, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02979431). Different studies have been conducted to evaluate the potential of VHH to target the pathological amyloid form of different proteins such as lysozyme (Dumoulin *et al.*, 2003; De Genst *et al.*, 2010; Rutgers *et al.*, 2011). And recently, VHH showed their potential as diagnostic tool to target A β plaques and hyperphosphorylated Tau, with an affinity and specificity very close to antibodies already used for detecting these pathologic features (T. Li, Vandesquille, *et al.*, 2016). VHHs have a great potential in future diagnostic and therapeutic strategies for the treatment of Tau pathology.

Altogether, these results show the great potential of Tau protein as a target in immunotherapeutic trials for AD treatment.

Tau active versus Tau passive immunization

There are two types of immunotherapies. And even they both aim to slow down and prevent the cognitive decline associated with AD, active and passive immunotherapies have respective advantages and disadvantages.

Active immunization, known to stimulate the cellular and humoral immune system and promote the production of anti-antigen antibodies, consists in the injection of an antigen combined with an immune boosting adjuvant. The main advantage of this type of immunotherapy is the induction of a long-term antibody production in a large population. If effective, active immunotherapy can be considered as a minimally invasive and cost-effective treatment (Lemere and Masliah, 2010; Lemere, 2013). But it should also be borne in mind that active vaccination induces a T cell response that can increase the risk of a deleterious immune response through a release of pro-inflammatory cytokines (too strong and pro-inflammatory adjuvant) or even more problematic, a recognition of the antigen as a self-protein.

Active immunotherapy leads to a polyclonal antibody response, which generates loads of antibodies recognizing multiple and sometimes overlapping epitopes on the target protein. This broad coverage can be seen as a significant advantage but can also become a disadvantage when the targeted antigen is a specific pathological form of an intrinsic protein with major physiological functions.

Regarding anti-Tau immunotherapy, active immunization of C57BL/6 wild-type mice with full length recombinant human Tau led to an encephalomyelitis, which confirms potential autoimmune toxicity of active vaccinations targeting the physiological Tau. However, Asuni and Sigurdsson's Team showed that this autoimmune problem isn't systematic thanks to an active immunization with a Tau phosphopeptide which allowed a reduction of Tau pathology and improved cognitive phenotypes in Tau transgenic mice (JNPL3) (Ayodeji A. Asuni *et al.*, 2007; Panza *et al.*, 2016).

Among active vaccines in clinical trials, AADvac1 (Axon Neuroscience, Bratislava, Slovak Republic) was the first anti-Tau vaccine. It's a synthetic peptide targeting misfolded Tau derived from amino acids 294 to 305 (KDNIKHVPGGGS), coupled to keyhole limpet hemocyanin, and administered with an Alhydrogel alum adjuvant. Three single doses of AADvac1 were assessed every month to test its safety, tolerability and efficacy in mild-to-moderate AD patients (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01850238). The most common adverse events were injection site reactions but there were no cases of meningoencephalitis or vasogenic oedema. In this first-in-man study, AADvac1 showed a favourable safety profile as well as an excellent immunogenicity. It was pursued with an open-label phase, in which all patients received another three doses of AADvac1 at monthly intervals but, at present, no information is available about this part of the study. Patients completing this 24-week study had the opportunity to enter a further 18-month open-label extension (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02031198, FUNDAMANT). A separate 24-month Phase II study is currently on going using AADvac1 vaccine (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02579252, ADA-MANT) (Kontsekova *et al.*, 2014; Congdon and Sigurdsson, 2018).

Another active vaccine, ACI-35 (AC Immune AG and Janssen Pharmaceuticals) entered a Phase Ib clinical study. It is a liposomal-based phospho-Tau peptide including phosphorylated S396 and S404 residues. This trial compares the effect of two doses of ACI-35 in people with mild-to-moderate AD to investigate its safety, tolerability and immunogenicity (Theunis *et al.*, 2013; Congdon and Sigurdsson, 2018).

Passive immunization doesn't require a stimulation of the patient's immune system because it consists in regular injections of specific monoclonal antibodies. The main benefit of this treatment is that it directly targets the pathological epitope of the protein of interest without any risk to damage its physiological form (Lemere and Masliah, 2010; Lemere, 2013). On the downside, this treatment is invasive and less profitable due to the need of a large production of expensive humanized monoclonal antibodies. Thereby, at first glance, passive immunotherapy appears to be less feasible for long-term treatment of a large population. Repeated injection of antibodies over time may lead to the formation of anti-antibodies, which could potentially have a neutralizing effect or lead to side effects such as glomerulonephritis and vasculitis. However, since at the slightest sign of toxicity, passive immunotherapy can be stopped very easily, these clinical studies are amply justified and may help to target very promising pathological epitopes for AD treatment that can afterward be used in generating active vaccines.

One of the first Tau antibodies tested in clinical development for AD treatment was RG7345 (RO6926496, MAb86, F. Hoffmann-La Roche Ltd.). It's a human monoclonal antibody targeting the specific Tau-phosphorylated epitope "pS422". Unfortunately, after Phase 1, this antibody project was discontinued (Collin *et al.*, 2014; Panza *et al.*, 2016).

The antibody BMS-986168 (IPN007, Bristol-Myers Squibb Company) is a humanized monoclonal antibody recognising N-terminally fragmented forms of Tau (eTau). Although IPN007 isn't currently being tested for AD but for PSP, eTau was originally isolated from familial AD patient-derived pluripotent stem cells. After having controlled the safety and tolerability of this antibody in healthy subject, a Phase I trial began to evaluate BMS-986168 injections effects in 48 patients with PSP (Study CN002–003, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02460094). An extension study in PSP patients who participated to the previous study started to evaluate the long-term tolerability of multiple intravenous infusions of IPN007 (ClinicalTrials.gov identifier: NCT03068468).

A Phase I clinical study in PSP patients was carried out with the recombinant humanized anti-Tau C2N-8E12 antibody (C2N Diagnostics, LLC, MO, USA and AbbVie, IL, USA) which recognizes an aggregated and extracellular form of pathological Tau implicated in trans neuronal propagation of Tau pathology, according to the results obtained in cellular and mouse models (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02494024) (Yanamandra *et al.*, 2013, 2015;

Congdon and Sigurdsson, 2018). This trial is now recruiting for a phase II study (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02985879 and NCT02880956).

A Phase I trial with an antibody RO7105705 (AC Immune SA, Genentech, and Hoffmann-La Roche) targeting the phosphorylated serine 409 epitope is at present ongoing with patients with mild-to-moderate AD (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02820896).

Finally, two new antibodies are now entering for Phase I study: LY3303560 (Eli Lilly, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02754830 and NCT03019536) and JNJ-63733657 (Janssen Pharmaceuticals, ClinicalTrials.gov identifier: NCT03375697). There is still not precise data concerning the targeted epitope but LY3303560 seems to recognize a conformational epitope whereas JNJ-63733657 bind to the middle region of Tau.

Due to its minimally invasive and cost-effective properties, active immunotherapy seems to be the best potential immunological treatment. While less feasible for long-term treatment, passive immunotherapy may be very helpful to target promising pathological epitopes for AD treatment.

	Clinical Trials	Target epitopes	Status	Target Disease
Active tau-based immunotherapy	AADvac1 (Axon Neuroscience SE) NCT02579252	²⁹⁴ KDNIKHPGGGS ₃₀₅	Phase II	AD
	ACI-35 (AC Immune AG)	³⁹³ VYKpSPVWSGDTpSPRHL ₄₀₈	Phase Ib	AD
	C2N-8E12 (C2N Diagnostics) NCT02880956 NCT02985879	²⁵ DQGGYT ₃₀	Phase II	AD, PSP
Passive tau-based Immunotherapy	BMS-986168 (Bristol-Myers Squibb Company) NCT02658916	⁹ EVMEDHAGTY ₁₈	Phase I	PSP
	RO7105705 (AC Immune SA, Genentech, and Hoffmann-La Roche) NCT02820896	⁴⁰⁹ pS	Phase I	AD

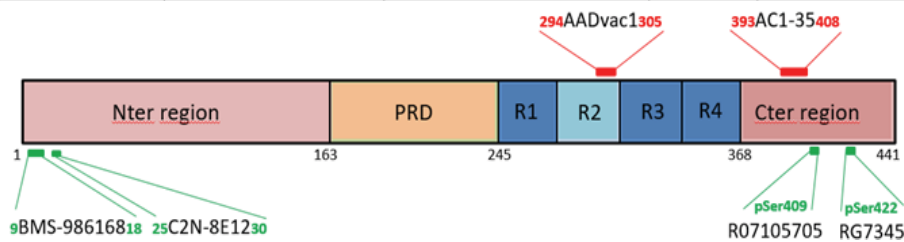


Table 1: Current active and passive Tau-based immunotherapies for Alzheimer’s disease (AD) and progressive supranuclear palsy (PSP).

Conclusions

Tau appears to be a pleiotropic protein. Besides, its established function to stabilize the microtubule network, there are several pools of Tau within neurons, which are differentially regulated and have multiple functions. New tools need to be developed to clearly understand the respective contributions of Tau in different cellular compartments. Functions and dysfunctions of Tau proteins are linked to their localization and state within neurons. As AD and other Tauopathies are characterized by Tau pathology, it appears well-founded to consider Tau proteins as ideal targets for therapeutic strategies. In spite of an unfortunate lack of information regarding the results of clinical studies that have been carried out so far, Tau immunotherapy seems to be a very promising way to treat patients with AD and other Tauopathies. Nevertheless, a better understanding of the mechanisms underlying Tau

aggregation and propagation as well as the development of biomarkers for early diagnosis are still missing to propose effective treatment.

Acknowledgments

The authors acknowledge the “Alzheimer & Tauopathies” Inserm group in the Jean-Pierre Aubert Research Center.

This article was conceived and written during Visiting Professorship of KI at the University of Lille with the support of the LabEx DISTALZ.

MA is supported by INSERM; KC, CE, MD, MH and CS are supported by Université de Lille; MG and CL are supported by CHRU de Lille et Région Hauts-de-France; CD is supported by Labex Distalz. VG is supported by Fondation pour la Recherche Médicale (SPF20160936000); LB is a CNRS research scientist.

Bibliography

- Abisambra, J. F., U. K. Jinwal, L. J. Blair, J. C. O’Leary, Q. Li, S. Brady, L. Wang, et al. 2013. “Tau Accumulation Activates the Unfolded Protein Response by Impairing Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation.” *Journal of Neuroscience* 33 (22): 9498–9507. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5397-12.2013>.
- Ahmed, Tariq, Ann Van der Jeugd, David Blum, Marie-Christine Galas, Rudi D’Hooge, Luc Buee, and Detlef Balschun. 2014. “Cognition and Hippocampal Synaptic Plasticity in Mice with a Homozygous Tau Deletion.” *Neurobiology of Aging* 35 (11): 2474–78. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.005>.
- Alafuzoff, I., K. Iqbal, H. Friden, R. Adolfsson, and B. Winblad. 1987. “Histopathological Criteria for Progressive Dementia Disorders: Clinical-Pathological Correlation and Classification by Multivariate Data Analysis.” *Acta Neuropathologica* 74 (3): 209–25. <https://doi.org/10.1007/BF00688184>.
- Albasanz, José L., Sandra Perez, Marta Barrachina, Isidro Ferrer, and Mairena Martín. 2008. “Up-Regulation of Adenosine Receptors in the Frontal Cortex in Alzheimer’s Disease.” *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 18 (2): 211–19. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00112.x>.
- Alonso, A. C., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1996. “Alzheimer’s Disease Hyperphosphorylated Tau Sequesters Normal Tau into Tangles of Filaments and Disassembles Microtubules.” *Nature Medicine* 2 (7): 783–87.
- Alonso, A. C., T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1994. “Role of Abnormally Phosphorylated Tau in the Breakdown of Microtubules in Alzheimer Disease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (12): 5562–66.
- Alonso, A., T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 2001. “Hyperphosphorylation Induces Self-Assembly of Tau into Tangles of Paired Helical Filaments/Straight Filaments.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12): 6923–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.121119298>.

- Alonso, Alejandra D., John Di Clerico, Bin Li, Christopher P. Corbo, Maria E. Alaniz, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2010. "Phosphorylation of Tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined Causes Neurodegeneration." *Journal of Biological Chemistry* 285 (40): 30851–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110957>.
- Alonso, Alejandra del C., Tanweer Zaidi, Michal Novak, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2001. "Hyperphosphorylation Induces Self-Assembly of Tau into Tangles of Paired Helical Filaments/Shaighat Filaments." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (12): 6923–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.121119298>.
- Arendt, Thomas, Jens Stieler, and Max Holzer. 2015. "Brain Hypometabolism Triggers PHF-like Phosphorylation of Tau, a Major Hallmark of Alzheimer's Disease Pathology." *Journal of Neural Transmission* 122 (4): 531–39. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1342-8>.
- Arriagada, P. V., J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte, and B. T. Hyman. 1992. "Neurofibrillary Tangles but Not Senile Plaques Parallel Duration and Severity of Alzheimer's Disease." *Neurology* 42 (3 Pt 1): 631–39.
- Asai, Hirohide, Seiko Ikezu, Satoshi Tsunoda, Maria Medalla, Jennifer Luebke, Tarik Haydar, Benjamin Wolozin, Oleg Butovsky, Sebastian Kügler, and Tsuneya Ikezu. 2015. "Depletion of Microglia and Inhibition of Exosome Synthesis Halt Tau Propagation." *Nature Neuroscience* 18 (11): 1584–93. <https://doi.org/10.1038/nn.4132>.
- Asuni, Ayodeji A., Allal Boutajangout, David Quartermain, and Einar M. Sigurdsson. 2007. "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers in a Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology with Associated Functional Improvements." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (34): 9115–29. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007>.
- Attwell, David, and Simon B. Laughlin. 2001. "An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21 (10): 1133–45. <https://doi.org/10.1097/00004647-200110000-00001>.
- Auer, Roland N., and Bo K. Siesjö. 1993. "Hypoglycaemia: Brain Neurochemistry and Neuropathology." *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism* 7 (3): 611–25. [https://doi.org/10.1016/S0950-351X\(05\)80210-1](https://doi.org/10.1016/S0950-351X(05)80210-1).
- Augustinack, Jean C., Anja Schneider, Eva Maria Mandelkow, and Bradley T. Hyman. 2002. "Specific Tau Phosphorylation Sites Correlate with Severity of Neuronal Cytopathology in Alzheimer's Disease." *Acta Neuropathologica* 103 (1): 26–35. <https://doi.org/10.1007/s004010100423>.
- Bard, F., C. Cannon, R. Barbour, R. L. Burke, D. Games, H. Grajeda, T. Guido, et al. 2000. "Peripherally Administered Antibodies against Amyloid Beta-Peptide Enter the Central Nervous System and Reduce Pathology in a Mouse Model of Alzheimer Disease." *Nature Medicine* 6 (8): 916–19. <https://doi.org/10.1038/78682>.
- Biernat, J., N. Gustke, G. Drewes, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1993. "Phosphorylation of Ser262 Strongly Reduces Binding of Tau to Microtubules: Distinction between PHF-like Immunoreactivity and Microtubule Binding." *Neuron* 11 (1): 153–63.
- Blair, Laura J., Jeremy D. Baker, Jonathan J. Sabbagh, and Chad A. Dickey. 2015. "The Emerging Role of Peptidyl-Prolyl Isomerase Chaperones in Tau Oligomerization, Amyloid Processing, and Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 133 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1111/jnc.13033>.
- Boluda, Susana, Michiyo Iba, Bin Zhang, Kevin M. Raible, Virginia M-Y. Lee, and John Q. Trojanowski. 2015. "Differential Induction and Spread of Tau Pathology in Young PS19 Tau Transgenic Mice Following Intracerebral Injections of Pathological Tau from Alzheimer's Disease or Corticobasal Degeneration Brains." *Acta Neuropathologica* 129 (2): 221–37. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1373-0>.
- Bou Samra, Elias, Géraldine Buhagiar-Labarchède, Christelle Machon, Jérôme Guitton, Rosine Onclercq-Delic, Michael R. Green, Olivier Alibert, Claude Gazin, Xavier Veaute, and Mounira Amor-Guélet. 2017. "A Role for Tau Protein in Maintaining Ribosomal DNA Stability and Cytidine Deaminase-Deficient Cell Survival." *Nature Communications* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00633-1>.
- Boutajangout, Allal, David Quartermain, and Einar M. Sigurdsson. 2010. "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline in a New Tangle Mouse Model." *The Journal of*

- Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (49): 16559–66. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-10.2010>.
- Bowman, G. L., J. A. Kaye, M. Moore, D. Waichunas, N. E. Carlson, and J. F. Quinn. 2007. "Blood-Brain Barrier Impairment in Alzheimer Disease: Stability and Functional Significance." *Neurology* 68 (21): 1809–14. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000262031.18018.1a>.
- Boxer, Adam L., Jin-Tai Yu, Lawrence I. Golbe, Irene Litvan, Anthony E. Lang, and Günter U. Höglinger. 2017. "Advances in Progressive Supranuclear Palsy: New Diagnostic Criteria, Biomarkers, and Therapeutic Approaches." *The Lancet. Neurology* 16 (7): 552–63. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30157-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30157-6).
- Boyne, L. J., A. Tessler, M. Murray, and I. Fischer. 1995. "Distribution of Big Tau in the Central Nervous System of the Adult and Developing Rat." *The Journal of Comparative Neurology* 358 (2): 279–93. <https://doi.org/10.1002/cne.903580209>.
- Braak, H., and E. Braak. 1991. "Neuropathological Stageing of Alzheimer-Related Changes." *Acta Neuropathologica* 82 (4): 239–59.
- Brion, J. P., A. M. Couck, E. Passareiro, and J. Flament-Durand. 1985. "Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease: An Immunohistochemical Study." *Journal of Submicroscopic Cytology* 17 (1): 89–96.
- Buée Scherrer, V., P. R. Hof, L. Buée, B. Leveugle, P. Vermersch, D. P. Perl, C. W. Olanow, and A. Delacourte. 1996. "Hyperphosphorylated Tau Proteins Differentiate Corticobasal Degeneration and Pick's Disease." *Acta Neuropathologica* 91 (4): 351–59.
- Buée-Scherrer, V., L. Buée, P. R. Hof, B. Leveugle, C. Gilles, A. J. Loerzel, D. P. Perl, and A. Delacourte. 1995. "Neurofibrillary Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism-Dementia Complex of Guam. Immunohistochemical Characterization of Tau Proteins." *The American Journal of Pathology* 146 (4): 924–32.
- Buée-Scherrer, V., L. Buée, B. Leveugle, D. P. Perl, P. Vermersch, P. R. Hof, and A. Delacourte. 1997. "Pathological Tau Proteins in Postencephalitic Parkinsonism: Comparison with Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders." *Annals of Neurology* 42 (3): 356–59. <https://doi.org/10.1002/ana.410420312>.
- Burnouf, Sylvie, Alberto Martire, Maxime Derisbourg, Cyril Laurent, Karim Belarbi, Antoine Leboucher, Francisco J. Fernandez-Gomez, et al. 2013. "NMDA Receptor Dysfunction Contributes to Impaired Brain-Derived Neurotrophic Factor-Induced Facilitation of Hippocampal Synaptic Transmission in a Tau Transgenic Model." *Aging Cell* 12 (1): 11–23. <https://doi.org/10.1111/accel.12018>.
- Caccamo, Antonella, Salvatore Oddo, Lana X. Tran, and Frank M. LaFerla. 2007. "Lithium Reduces Tau Phosphorylation but Not A β or Working Memory Deficits in a Transgenic Model with Both Plaques and Tangles." *The American Journal of Pathology* 170 (5): 1669–75. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061178>.
- Calafate, Sara, Arjan Buist, Katarzyna Miskiewicz, Vinoy Vijayan, Guy Daneels, Bart de Strooper, Joris de Wit, Patrik Verstreken, and Diederik Moechars. 2015. "Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation." *Cell Reports* 11 (8): 1176–83. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.043>.
- Calignon, Alix de, Manuela Polydoro, Marc Suárez-Calvet, Christopher William, David H. Adamowicz, Kathy J. Kopeikina, Rose Pittstick, et al. 2012. "Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease." *Neuron* 73 (4): 685–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.033>.
- Carling, David. 2004. "The AMP-Activated Protein Kinase Cascade - A Unifying System for Energy Control." *Trends in Biochemical Sciences* 29 (1): 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.005>.
- Cellai et al. in press. The adenosinergic signaling: a complex but promising therapeutic target for Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*.
- Chalbot, Sonia, Henrik Zetterberg, Kaj Blennow, Tormod Fladby, Niels Andreasen, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2011. "Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Permeability in Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 25 (3): 505–15. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101959>.
- Chen, Hsiuchen, Scott A. Detmer, Andrew J. Ewald, Erik E. Griffin, Scott E. Fraser, and David C. Chan. 2003. "Mitofusins Mfn1 and Mfn2 Coordinately Regulate Mitochondrial Fusion and Are Essential for

- Embryonic Development." *Journal of Cell Biology* 160 (2): 189–200. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211046>.
- Chen, Qian, Zhou Zhou, Lei Zhang, Yuan Wang, Yan-wen Zhang, Min Zhong, Shang-cheng Xu, Chun-hai Chen, Li Li, and Zheng-ping Yu. 2012. "Tau Protein Is Involved in Morphological Plasticity in Hippocampal Neurons in Response to BDNF." *Neurochemistry International* 60 (3): 233–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.12.013>.
- Chiu, Shu Ling, Chih Ming Chen, and Hollis T. Cline. 2008. "Insulin Receptor Signaling Regulates Synapse Number, Dendritic Plasticity, and Circuit Function In Vivo." *Neuron* 58 (5): 708–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.014>.
- Cho, Jae-Hyeon, and Gail V. W. Johnson. 2004. "Primed Phosphorylation of Tau at Thr231 by Glycogen Synthase Kinase 3beta (GSK3beta) Plays a Critical Role in Regulating Tau's Ability to Bind and Stabilize Microtubules." *Journal of Neurochemistry* 88 (2): 349–58.
- Ciechanover, Aaron, and Yong Tae Kwon. 2017. "Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration."
- Cipolat, S., O. M. de Brito, B. Dal Zilio, and L. Scorrano. 2004. "OPA1 Requires Mitofusin 1 to Promote Mitochondrial Fusion." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (45): 15927–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407043101>.
- Clavaguera, Florence, Hiroyasu Akatsu, Graham Fraser, R. Anthony Crowther, Stephan Frank, Jürgen Hench, Alphonse Probst, et al. 2013. "Brain Homogenates from Human Tauopathies Induce Tau Inclusions in Mouse Brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (23): 9535. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301175110>.
- Clavaguera, Florence, Tristan Bolmont, R. Anthony Crowther, Dorothee Abramowski, Stephan Frank, Alphonse Probst, Graham Fraser, et al. 2009. "Transmission and Spreading of Tauopathy in Transgenic Mouse Brain." *Nature Cell Biology* 11 (7): 909–13. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>.
- Cleveland, D. W., S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner. 1977. "Physical and Chemical Properties of Purified Tau Factor and the Role of Tau in Microtubule Assembly." *Journal of Molecular Biology* 116 (2): 227–47.
- Collin, Ludovic, Bernd Bohrmann, Ulrich Göpfert, Krisztina Oroszlan-Szovik, Laurence Ozmen, and Fiona Grüninger. 2014. "Neuronal Uptake of Tau/pS422 Antibody and Reduced Progression of Tau Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Brain: A Journal of Neurology* 137 (Pt 10): 2834–46. <https://doi.org/10.1093/brain/awu213>.
- Congdon, Erin E., and Einar M. Sigurdsson. 2018. "Tau-Targeting Therapies for Alzheimer Disease." *Nature Reviews. Neurology*, June. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0013-z>.
- Crary, John F., John Q. Trojanowski, Julie A. Schneider, Jose F. Abisambra, Erin L. Abner, Irina Alafuzoff, Steven E. Arnold, et al. 2014. "Primary Age-Related Tauopathy (PART): A Common Pathology Associated with Human Aging." *Acta Neuropathologica* 128 (6): 755–66. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1349-0>.
- Cuchillo-Ibanez, Inmaculada, Anjan Seereeram, Helen L. Byers, Kit-Yi Leung, Malcolm A. Ward, Brian H. Anderton, and Diane P. Hanger. 2008. "Phosphorylation of Tau Regulates Its Axonal Transport by Controlling Its Binding to Kinesin." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (9): 3186–95. <https://doi.org/10.1096/fj.08-109181>.
- Dai, Chun-ling, Wen Hu, Yunn Chyn Tung, Fei Liu, Cheng-Xin Gong, and Khalid Iqbal. 2018. "Tau Passive Immunization Blocks Seeding and Spread of Alzheimer Hyperphosphorylated Tau-Induced Pathology in 3 × Tg-AD Mice." *Alzheimer's Research & Therapy* 10 (January). <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0341-7>.
- Dai, Chun-Ling, Yunn Chyn Tung, Fei Liu, Cheng-Xin Gong, and Khalid Iqbal. 2017. "Tau Passive Immunization Inhibits Not Only Tau but Also Aβ Pathology." *Alzheimer's Research & Therapy* 9 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s13195-016-0227-5>.
- David, Della C., Susanne Hauptmann, Isabel Scherping, Katrin Schuessel, Uta Keil, Patrizia Rizzu, Rivka Ravid, et al. 2005. "Proteomic and Functional Analyses Reveal a Mitochondrial Dysfunction in P301L Tau Transgenic Mice." *Journal of Biological Chemistry* 280 (25): 23802–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500356200>.

- De Boni, U., and D. R. Crapper. 1978. "Paired Helical Filaments of the Alzheimer Type in Cultured Neurons." *Nature* 271 (5645): 566–68.
- De Genst, Erwin J., Tim Guillems, Joke Wellens, Elizabeth M. O'Day, Christopher A. Waudby, Sarah Meehan, Mireille Dumoulin, et al. 2010. "Structure and Properties of a Complex of α -Synuclein and a Single-Domain Camelid Antibody." *Journal of Molecular Biology* 402 (2): 326–43. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.001>.
- De Vos, Kurt J., Andrew J. Grierson, Steven Ackerley, and Christopher C. J. Miller. 2008. "Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases." *Annual Review of Neuroscience* 31 (1): 151–73. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090711>.
- Delacourte, A., and A. Defossez. 1986. "Alzheimer's Disease: Tau Proteins, the Promoting Factors of Microtubule Assembly, Are Major Components of Paired Helical Filaments." *Journal of the Neurological Sciences* 76 (2–3): 173–86.
- Despres, Clément, Cillian Byrne, Haoling Qi, François-Xavier Cantrelle, Isabelle Huvent, Béatrice Chambraud, Etienne-Emile Baulieu, et al. 2017. "Identification of the Tau Phosphorylation Pattern That Drives Its Aggregation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (34): 201708448. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708448114>.
- Dickey, Chad A., Adeela Kamal, Karen Lundgren, Natalia Klosak, Rachel M. Bailey, Judith Dunmore, Peter Ash, et al. 2007. "The High-Affinity HSP90-CHIP Complex Recognizes and Selectively Degrades Phosphorylated Tau Client Proteins." *Journal of Clinical Investigation* 117 (3): 648–58. <https://doi.org/10.1172/JCI29715>.
- Domise, Manon, Sébastien Didier, Claudia Marinangeli, Haitian Zhao, Pallavi Chandakkar, Luc Buée, Benoit Viollet, Peter Davies, Philippe Marambaud, and Valérie Vingtdeux. 2016. "AMP-Activated Protein Kinase Modulates Tau Phosphorylation and Tau Pathology in Vivo." *Scientific Reports* 6 (February): 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep26758>.
- Doody, Rachele S., Ronald G. Thomas, Martin Farlow, Takeshi Iwatsubo, Bruno Vellas, Steven Joffe, Karl Kieburtz, et al. 2014. "Phase 3 Trials of Solanezumab for Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease." *The New England Journal of Medicine* 370 (4): 311–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312889>.
- Drechsel, D N, A A Hyman, M H Cobb, and M W Kirschner. 1992. "Modulation of the Dynamic Instability of Tubulin Assembly by the Microtubule-Associated Protein Tau." *Molecular Biology of the Cell* 3 (10): 1141–54.
- Drewes, G., A. Ebner, U. Preuss, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1997. "MARK, a Novel Family of Protein Kinases That Phosphorylate Microtubule-Associated Proteins and Trigger Microtubule Disruption." *Cell* 89 (2): 297–308.
- Drewes, G., B. Trinczek, S. Illenberger, J. Biernat, G. Schmitt-Ulms, H. E. Meyer, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1995. "Microtubule-Associated Protein/Microtubule Affinity-Regulating Kinase (p110mark). A Novel Protein Kinase That Regulates Tau-Microtubule Interactions and Dynamic Instability by Phosphorylation at the Alzheimer-Specific Site Serine 262." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (13): 7679–88.
- Dujardin, Simon, Katia Lécolle, Raphaëlle Caillierez, Séverine Bégard, Nadège Zommer, Cédric Lachaud, Sébastien Carrier, et al. 2014. "Neuron-to-Neuron Wild-Type Tau Protein Transfer through a Trans-Synaptic Mechanism: Relevance to Sporadic Tauopathies." *Acta Neuropathologica Communications* 2 (January): 14. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-14>.
- Dumoulin, Mireille, Alexander M. Last, Aline Desmyter, Klaas Decanniere, Denis Canet, Göran Larsson, Andrew Spencer, et al. 2003. "A Camelid Antibody Fragment Inhibits the Formation of Amyloid Fibrils by Human Lysozyme." *Nature* 424 (6950): 783–88. <https://doi.org/10.1038/nature01870>.
- Duyckaerts, C., M. Bennefib, Y. Grignon, T. Uchihara, Y. He, F. Piette, and J. J. Hauw. 1997. "Modeling the Relation between Neurofibrillary Tangles and Intellectual Status." *Neurobiology of Aging* 18 (3): 267–73.
- Duyckaerts, Charles, Heiko Braak, Jean-Pierre Brion, Luc Buée, Kelly Del Tredici, Michel Goedert, Glenda Halliday, et al. 2015. "PART Is Part of Alzheimer Disease." *Acta Neuropathologica* 129 (5): 749–56. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1390-7>.

- Eldar-Finkelman, Hagit, and Ana Martinez. 2011. "GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 4 (October): 32. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00032>.
- Escobar-Khondiker, M., M. Hollerhage, M.-P. Muriel, P. Champy, A. Bach, C. Depienne, G. Respondek, et al. 2007. "Annonacin, a Natural Mitochondrial Complex I Inhibitor, Causes Tau Pathology in Cultured Neurons." *Journal of Neuroscience* 27 (29): 7827–37. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1644-07.2007>.
- Fischer, Daniela, Marco D. Mukrasch, Jacek Biernat, Stefan Bibow, Martin Blackledge, Christian Griesinger, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2009. "Conformational Changes Specific for Pseudophosphorylation at Serine 262 Selectively Impair Binding of Tau to Microtubules." *Biochemistry* 48 (42): 10047–55. <https://doi.org/10.1021/bi901090m>.
- Flaten, Vanessa, Cyril Laurent, Joana E. Coelho, Ursula Sandau, Vânia L. Batalha, Sylvie Burnouf, Malika Hamdane, et al. 2014. "From Epidemiology to Pathophysiology: What about Caffeine in Alzheimer's Disease?" *Biochemical Society Transactions* 42 (2): 587–92. <https://doi.org/10.1042/BST20130229>.
- Frank, Stephan, Brigitte Gaume, Elke S. Bergmann-Leitner, Wolfgang W. Leitner, Everett G. Robert, Frédéric Catez, Carolyn L. Smith, and Richard J. Youle. 2001. "The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis." *Developmental Cell* 1 (4): 515–25. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00055-7).
- Frappier, T. F., I. S. Georgieff, K. Brown, and M. L. Shelanski. 1994. "Tau Regulation of Microtubule-Microtubule Spacing and Bundling." *Journal of Neurochemistry* 63 (6): 2288–94.
- Fraser, Paul E. 2014. "Prions and Prion-like Proteins." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (29): 19839–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.583492>.
- Frost, Bess, Martin Hemberg, Jada Lewis, and Mel B. Feany. 2014. "Tau Promotes Neurodegeneration through Global Chromatin Relaxation." *Nature Neuroscience* 17 (3): 357–66. <https://doi.org/10.1038/nn.3639>.
- Frost, Bess, Rachel L. Jacks, and Marc I. Diamond. 2009. "Propagation of Tau Misfolding from the Outside to the Inside of a Cell." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (19): 12845–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>.
- Gandhi, Neha S., Isabelle Landrieu, Cillian Byrne, Predrag Kukic, Laziza Amniai, François Xavier Cantrelle, Jean Michel Wieruszkeski, Ricardo L. Mancera, Yves Jacquot, and Guy Lippens. 2015. "A Phosphorylation-Induced Turn Defines the Alzheimer's Disease AT8 Antibody Epitope on the Tau Protein." *Angewandte Chemie - International Edition* 54 (23): 6819–23. <https://doi.org/10.1002/anie.201501898>.
- Gauthier, Serge, Howard H. Feldman, Lon S. Schneider, Gordon K. Wilcock, Giovanni B. Frisoni, Jiri H. Hardlund, Hans J. Moebius, et al. 2016. "Efficacy and Safety of Tau-Aggregation Inhibitor Therapy in Patients with Mild or Moderate Alzheimer's Disease: A Randomised, Controlled, Double-Blind, Parallel-Arm, Phase 3 Trial." *The Lancet* 388 (10062): 2873–84. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31275-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31275-2).
- Giustiniani, Julien, Kevin Guillemeau, Omar Dounane, Elodie Sardin, Isabelle Huvent, Alain Schmitt, Malika Hamdane, et al. 2015. "The FK506-Binding Protein FKBP52 In Vitro Induces Aggregation of Truncated Tau Forms with Prion-like Behavior." *FASEB Journal* 29 (8): 3171–81. <https://doi.org/10.1096/fj.14-268243>.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, and R. A. Crowther. 1989. "Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease." *Neuron* 3 (4): 519–26.
- Goedert, Michel, Masami Masuda-Suzukake, and Benjamin Falcon. 2017. "Like Prions: The Propagation of Aggregated Tau and α -Synuclein in Neurodegeneration." *Brain: A Journal of Neurology* 140 (2): 266–78. <https://doi.org/10.1093/brain/aww230>.
- Gómez de Barreda, Elena, Hana N. Dawson, Michel P. Vitek, and Jesús Avila. 2010. "Tau Deficiency Leads to the Upregulation of BAF-57, a Protein Involved in Neuron-Specific Gene Repression." *FEBS Letters* 584 (11): 2265–70. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.032>.
- Goode, B. L., P. E. Denis, D. Panda, M. J. Radeke, H. P. Miller, L. Wilson, and S. C. Feinstein. 1997. "Functional Interactions between the Proline-Rich and Repeat Regions of Tau Enhance Microtubule Binding and Assembly." *Molecular Biology of the Cell* 8 (2): 353–65.

- Grober, E., D. Dickson, M. J. Sliwinski, H. Buschke, M. Katz, H. Crystal, and R. B. Lipton. 1999. "Memory and Mental Status Correlates of Modified Braak Staging." *Neurobiology of Aging* 20 (6): 573–79.
- Grundke-Iqbal, I, K Iqbal, Y C Tung, M Quinlan, H M Wisniewski, and L I Binder. 1986. "Abnormal Phosphorylation of the Microtubule-Associated Protein Tau (Tau) in Alzheimer Cytoskeletal Pathology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (13): 4913–17.
- Guo, Tong, Wendy Noble, and Diane P. Hanger. 2017. "Roles of Tau Protein in Health and Disease." *Acta Neuropathologica* 133 (5): 665–704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>.
- Gustke, N., B. Trinczek, J. Biernat, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1994. "Domains of Tau Protein and Interactions with Microtubules." *Biochemistry* 33 (32): 9511–22.
- Hamdane, Malika, Anne-Véronique Sambo, Patrice Delobel, Séverine Bégard, Anne Violleau, André Delacourte, Philippe Bertrand, Jesus Benavides, and Luc Buée. 2003. "Mitotic-like Tau Phosphorylation by p25-Cdk5 Kinase Complex." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (36): 34026–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302872200>.
- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. B. Songa, N. Bendahman, and R. Hamers. 1993. "Naturally Occurring Antibodies Devoid of Light Chains." *Nature* 363 (6428): 446–48. <https://doi.org/10.1038/363446a0>.
- Hampel, Harald, Lon S. Schneider, Ezio Giacobini, Miia Kivipelto, Shireen Sindi, Bruno Dubois, Karl Broich, Robert Nisticò, Paul S. Aisen, and Simone Lista. 2015. "Advances in the Therapy of Alzheimer's Disease: Targeting Amyloid Beta and Tau and Perspectives for the Future." *Expert Review of Neurotherapeutics* 15 (1): 83–105. <https://doi.org/10.1586/14737175.2015.995637>.
- Ho, Lap, Weiping Qin, Patrick N. Pompl, Zhongmin Xiang, Jun Wang, Zhong Zhao, Yuanzhen Peng, et al. 2004. "Diet-Induced Insulin Resistance Promotes Amyloidosis in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease." *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (7): 902–4. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0978fje>.
- Hof, P. R., A. Charpiot, A. Delacourte, L. Buée, D. Purohit, D. P. Perl, and C. Bouras. 1992. "Distribution of Neurofibrillary Tangles and Senile Plaques in the Cerebral Cortex in Postencephalitic Parkinsonism." *Neuroscience Letters* 139 (1): 10–14.
- Hof, P. R., E. A. Nimchinsky, V. Buée-Scherrer, L. Buée, J. Nasrallah, A. F. Hottinger, D. P. Purohit, A. J. Loerzel, J. C. Steele, and A. Delacourte. 1994. "Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism-Dementia Complex of Guam: Quantitative Neuropathology, Immunohistochemical Analysis of Neuronal Vulnerability, and Comparison with Related Neurodegenerative Disorders." *Acta Neuropathologica* 88 (5): 397–404.
- Höglinger, Günter U., Annie Lannuzel, Myriam Escobar Khondiker, Patrick P. Michel, Charles Duyckaerts, Jean Féger, Pierre Champy, et al. 2005. "The Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Triggers a Cerebral Tauopathy." *Journal of Neurochemistry* 95 (4): 930–39. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03493.x>.
- Höllerhage, Matthias, Andreas Matusch, Pierre Champy, Anne Lombès, Merle Ruberg, Wolfgang H. Oertel, and Günter U. Höglinger. 2009. "Natural Lipophilic Inhibitors of Mitochondrial Complex I Are Candidate Toxins for Sporadic Neurodegenerative Tau Pathologies." *Experimental Neurology* 220 (1): 133–42. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.08.004>.
- Holmes, Brandon B., Sarah L. DeVos, Najla Kfoury, Mei Li, Rachel Jacks, Kiran Yanamandra, Mohand O. Ouidja, et al. 2013. "Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate Internalization and Propagation of Specific Proteopathic Seeds." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (33): E3138–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301440110>.
- Holmes, Brandon B., and Marc I. Diamond. 2014. "Prion-like Properties of Tau Protein: The Importance of Extracellular Tau as a Therapeutic Target." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (29): 19855–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.549295>.
- Holtzman, David M., Maria C. Carrillo, James A. Hendrix, Lisa J. Bain, Ana M. Catafau, Laura M. Gault, Michel Goedert, et al. 2016. "Tau: From Research to Clinical Development." *Alzheimer's & Dementia* 12 (10): 1033–39. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.03.018>.

- Hoover, Brian R., Miranda N. Reed, Jianjun Su, Rachel D. Penrod, Linda A. Kotilinek, Marianne K. Grant, Rose Pitstick, et al. 2010. "Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration." *Neuron* 68 (6): 1067–81. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.030>.
- Hu, Wen, Xinhua Zhang, Yunn Chyn Tung, Shutao Xie, Fei Liu, and Khalid Iqbal. 2016. "Hyperphosphorylation Determines Both the Spread and the Morphology of Tau Pathology." *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 12 (10): 1066–77. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.014>.
- Hu, Yu, Xia-Chun Li, Zhi-hao Wang, Yu Luo, Xiangnan Zhang, Xiu-Ping Liu, Qiong Feng, et al. 2016. "Tau Accumulation Impairs Mitophagy via Increasing Mitochondrial Membrane Potential and Reducing Mitochondrial Parkin." *Oncotarget* 7 (14): 17356–68. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7861>.
- Hua, Qian, and Rong Qiao He. 2003. "Tau Could Protect DNA Double Helix Structure." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1645 (2): 205–11. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(02\)00538-1](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(02)00538-1).
- Iqbal, K., I. Grundke-Iqbal, T. Zaidi, P. A. Merz, G. Y. Wen, S. S. Shaikh, H. M. Wisniewski, I. Alafuzoff, and B. Winblad. 1986. "Defective Brain Microtubule Assembly in Alzheimer's Disease." *Lancet (London, England)* 2 (8504): 421–26.
- Iqbal, K., H. M. Wiśniewski, M. L. Shelanski, S. Brostoff, B. H. Liwnicz, and R. D. Terry. 1974. "Protein Changes in Senile Dementia." *Brain Research* 77 (2): 337–43.
- Iqbal, Khalid, Fei Liu, and Cheng-Xin Gong. 2016. "Tau and Neurodegenerative Disease: The Story so Far." *Nature Reviews. Neurology* 12 (1): 15–27. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.225>.
- Ittner, Lars M., Yazid 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>.
- Janus, C., J. Pearson, J. McLaurin, P. M. Mathews, Y. Jiang, S. D. Schmidt, M. A. Chishti, et al. 2000. "A Beta Peptide Immunization Reduces Behavioural Impairment and Plaques in a Model of Alzheimer's Disease." *Nature* 408 (6815): 979–82. <https://doi.org/10.1038/35050110>.
- Jeganathan, Sadasivam, Martin Von Bergen, Eva Maria Mandelkow, and Eckhard Mandelkow. 2008. "The Natively Unfolded Character of Tau and Its Aggregation to Alzheimer-like Paired Helical Filaments." *Biochemistry* 47 (40): 10526–39. <https://doi.org/10.1021/bi800783d>.
- Jho, Y. S., E. B. Zhulina, M. W. Kim, and P. A. Pincus. 2010. "Monte Carlo Simulations of Tau Proteins: Effect of Phosphorylation." *Biophysical Journal* 99 (8): 2387–97. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.06.056>.
- Jiao, S.-S., L.-L. Shen, C. Zhu, X.-L. Bu, Y.-H. Liu, C.-H. Liu, X.-Q. Yao, et al. 2016. "Brain-Derived Neurotrophic Factor Protects against Tau-Related Neurodegeneration of Alzheimer's Disease." *Translational Psychiatry* 6 (10): e907. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.186>.
- Jimenez-Palomares, M., J. J. Ramos-Rodriguez, J. F. Lopez-Acosta, M. Pacheco-Herrero, A. M. Lechuga-Sancho, G. Perdomo, M. Garcia-Alloza, and I. Cozar-Castellano. 2012. "Increased A Production Prompts the Onset of Glucose Intolerance and Insulin Resistance." *AJP: Endocrinology and Metabolism* 302 (11): E1373–80. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00500.2011>.
- Kadavath, Harindranath, Mariusz Jaremko, Łukasz Jaremko, Jacek Biernat, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2015. "Folding of the Tau Protein on Microtubules." *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 54 (35): 10347–51. <https://doi.org/10.1002/anie.201501714>.
- Kandimalla, Ramesh, Maria Manczak, David Fry, Yeguvapalli Suneetha, Hiromi Sesaki, and P. Hemachandra Reddy. 2016. "Reduced Dynamin-Related Protein 1 Protects against Phosphorylated Tau-Induced Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Damage in Alzheimer's Disease." *Human Molecular Genetics* 25 (22): 4881–97. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw312>.
- Kang, Jian-Sheng, Jin-Hua Tian, Ping-Yue Pan, Philip Zald, Cuiqing Li, Chuxia Deng, and Zu-Hang Sheng. 2008. "Docking of Axonal Mitochondria by Syntaphilin Controls Their Mobility and Affects Short-Term Facilitation." *Cell* 132 (1): 137–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.024>.
- Kar, Santwana, Juan Fan, Michael J. Smith, Michel Goedert, and Linda A. Amos. 2003. "Repeat Motifs of Tau Bind to the Insides of Microtubules in the Absence of Taxol." *The EMBO Journal* 22 (1): 70–77. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg001>.

- Katsinelos, Taxiarchis, Marcel Zeitler, Eleni Dimou, Andromachi Karakatsani, Hans-Michael Müller, Eliana Nachman, Julia P. Steringer, Carmen Ruiz de Almodovar, Walter Nickel, and Thomas R. Jahn. 2018. "Unconventional Secretion Mediates the Trans-Cellular Spreading of Tau." *Cell Reports* 23 (7): 2039–55. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.056>.
- Kaufman, Sarah K., David W. Sanders, Talitha L. Thomas, Allison Ruchinskas, Jaime Vaquer-Alicea, Apurwa M. Sharma, Timothy M. Miller, and Marc I. Diamond. 2016. "Tau Prion Strains Dictate Patterns of Cell Pathology, Progression Rate, and Regional Vulnerability in Vivo." *Neuron* 92 (4): 796–812. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.055>.
- Khatoun, S., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1994. "Levels of Normal and Abnormally Phosphorylated Tau in Different Cellular and Regional Compartments of Alzheimer Disease and Control Brains." *FEBS Letters* 351 (1): 80–84.
- Kim, YoungDoo, Eun Il Jeong, Jihoon Nah, Seung-Min Yoo, WonJae Lee, Youbin Kim, Seowon Moon, Se-Hoon Hong, and Yong-keun Jung. 2017. "Pimozide Reduces Toxic Forms of Tau in TauC3 Mice via AMPK-Mediated Autophagy." *Journal of Neurochemistry* 38 (1): 42–49. <https://doi.org/10.1111/jnc.14109>.
- Kimura, Tetsuya, Daniel J. Whitcomb, Jihoon Jo, Philip Regan, Thomas Piers, Seonghoo Heo, Christopher Brown, et al. 2014. "Microtubule-Associated Protein Tau Is Essential for Long-Term Depression in the Hippocampus." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 369 (1633): 20130144. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0144>.
- Kolarova, Michala, Francisco García-Sierra, Ales Bartos, Jan Ricny, and Daniela Ripova. 2012. "Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease." *International Journal of Alzheimer's Disease* 2012: 731526. <https://doi.org/10.1155/2012/731526>.
- Kontsekova, Eva, Norbert Zilka, Branislav Kovacech, Petr Novak, and Michal Novak. 2014. "First-in-Man Tau Vaccine Targeting Structural Determinants Essential for Pathological Tau–tau Interaction Reduces Tau Oligomerisation and Neurofibrillary Degeneration in an Alzheimer's Disease Model." *Alzheimer's Research & Therapy* 6 (4): 44. <https://doi.org/10.1186/alzrt278>.
- Kopeikina, Katherine J., George A. Carlson, Rose Pitstick, Adam E. Ludvigson, Alan Peters, Jennifer I. Luebke, Robert M. Koffie, Matthew P. Frosch, Bradley T. Hyman, and Tara L. Spires-Jones. 2011. "Tau Accumulation Causes Mitochondrial Distribution Deficits in Neurons in a Mouse Model of Tauopathy and in Human Alzheimer's Disease Brain." *The American Journal of Pathology* 179 (4): 2071–82. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.004>.
- Köpke, E., Y. C. Tung, S. Shaikh, A. C. Alonso, K. Iqbal, and I. Grundke-Iqbal. 1993. "Microtubule-Associated Protein Tau. Abnormal Phosphorylation of a Non-Paired Helical Filament Pool in Alzheimer Disease." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (32): 24374–84.
- Lau, Dawn H. W., Marte Hogseth, Emma C. Phillips, Michael J. O'Neill, Amy M. Pooler, Wendy Noble, and Diane P. Hanger. 2016. "Critical Residues Involved in Tau Binding to Fyn: Implications for Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease." *Acta Neuropathologica Communications* 4 (May). <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0317-4>.
- Laurent, C., S. Burnouf, B. Ferry, V. L. Batalha, J. E. Coelho, Y. Baqi, E. Malik, et al. 2016. "A2A Adenosine Receptor Deletion Is Protective in a Mouse Model of Tauopathy." *Molecular Psychiatry* 21 (1): 97–107. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.151>.
- Laurent, Cyril, Sabiha Eddarkaoui, Maxime Derisbourg, Antoine Leboucher, Dominique Demeyer, Sébastien Carrier, Marion Schneider, et al. 2014. "Beneficial Effects of Caffeine in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease-like Tau Pathology." *Neurobiology of Aging* 35 (9): 2079–90. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.027>.
- Lauretti, E., J. G. Li, A. Di Meco, and D. Praticò. 2017. "Glucose Deficit Triggers Tau Pathology and Synaptic Dysfunction in a Tauopathy Mouse Model." *Translational Psychiatry* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/tp.2016.296>.
- Lauretti, Elisabetta, and Domenico Praticò. 2015. "Glucose Deprivation Increases Tau Phosphorylation via P38 Mitogen-Activated Protein Kinase." *Aging Cell* 14 (6): 1067–74. <https://doi.org/10.1111/acel.12381>.
- Lemere, Cynthia A. 2013. "Immunotherapy for Alzheimer's Disease: Hoops and Hurdles." *Molecular Neurodegeneration* 8 (October): 36. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-36>.

- Lemere, Cynthia A., and Eliezer Masliah. 2010. "Can Alzheimer Disease Be Prevented by Amyloid- β Immunotherapy?" *Nature Reviews. Neurology* 6 (2): 108–19. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2009.219>.
- Li, Bin, Muhammad Omar Chohan, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2007. "Disruption of Microtubule Network by Alzheimer Abnormally Hyperphosphorylated Tau." *Acta Neuropathologica* 113 (5): 501–11. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0207-8>.
- Li, Tengfei, Jean-Pierre Bourgeois, Susanna Celli, Fabienne Glacial, Anne-Marie Le Sourd, Salah Mecheri, Babette Weksler, et al. 2016. "Cell-Penetrating Anti-GFAP VHH and Corresponding Fluorescent Fusion Protein VHH-GFP Spontaneously Cross the Blood-Brain Barrier and Specifically Recognize Astrocytes: Application to Brain Imaging." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (10): 3969–79. <https://doi.org/10.1096/fj.11-201384>.
- Li, Tengfei, Matthias Vandesquille, Fani Koukoulis, Clémence Duffeffant, Ihsen Youssef, Pascal Lenormand, Christelle Ganneau, et al. 2016. "Camelid Single-Domain Antibodies: A Versatile Tool for in Vivo Imaging of Extracellular and Intracellular Brain Targets." *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 243 (December): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.019>.
- Li, Xia-Chun, Yu Hu, Zhi-hao Wang, Yu Luo, Yao Zhang, Xiu-Ping Liu, Qiong Feng, et al. 2016. "Human Wild-Type Full-Length Tau Accumulation Disrupts Mitochondrial Dynamics and the Functions via Increasing Mitofusins." *Scientific Reports* 6 (April): 24756. <https://doi.org/10.1038/srep24756>.
- Li, Xiaoyu, Yatender Kumar, Hans Zempel, Eva-Maria Mandelkow, Jacek Biernat, and Eckhard Mandelkow. 2011. "Novel Diffusion Barrier for Axonal Retention of Tau in Neurons and Its Failure in Neurodegeneration." *The EMBO Journal* 30 (23): 4825–37. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.376>.
- Licht-Murava, Avital, Rom Paz, Lilach Vaks, Limor Avrahami, Batya Plotkin, Miriam Eisenstein, and Hagit Eldar-Finkelman. 2016. "A Unique Type of GSK-3 Inhibitor Brings New Opportunities to the Clinic." *Science Signaling* 9 (454): ra110 LP-ra110. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aah7102>.
- Lindwall, G., and R. D. Cole. 1984. "Phosphorylation Affects the Ability of Tau Protein to Promote Microtubule Assembly." *The Journal of Biological Chemistry* 259 (8): 5301–5.
- Liu, Chang, and Jürgen Götz. 2013. "Profiling Murine Tau with 0N, 1N and 2N Isoform-Specific Antibodies in Brain and Peripheral Organs Reveals Distinct Subcellular Localization, with the 1N Isoform Being Enriched in the Nucleus." *PLoS ONE* 8 (12): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084849>.
- Liu, Fei, Bin Li, E.-Jan Tung, Inge Grundke-Iqbal, Khalid Iqbal, and Cheng-Xin Gong. 2007. "Site-Specific Effects of Tau Phosphorylation on Its Microtubule Assembly Activity and Self-Aggregation." *The European Journal of Neuroscience* 26 (12): 3429–36. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05955.x>.
- Liu, Li, Valerie Drouet, Jessica W. Wu, Menno P. Witter, Scott A. Small, Catherine Clelland, and Karen Duff. 2012. "Trans-Synaptic Spread of Tau Pathology In Vivo." *PLoS ONE* 7 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031302>.
- Loomis, P A, T H Howard, R P Castleberry, and L I Binder. 1990. "Identification of Nuclear Tau Isoforms in Human Neuroblastoma Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (21): 8422–26.
- Lovestone, Simon, Mercè Boada, Bruno Dubois, Michael Hüll, Juha O. Rinne, Hans-Jürgen Huppertz, Miguel Calero, et al. 2015. "A Phase II Trial of Tideglusib in Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease : JAD* 45 (1): 75–88. <https://doi.org/10.3233/JAD-141959>.
- Lu, Yang, Hai Jin He, Jun Zhou, Jun Ye Miao, Jing Lu, Ying Ge He, Rong Pan, Yan Wei, Ying Liu, and Rong Qiao He. 2013. "Hyperphosphorylation Results in Tau Dysfunction in DNA Folding and Protection." *Journal of Alzheimer's Disease* 37 (3): 551–63. <https://doi.org/10.3233/JAD-130602>.
- Maass, Anne, Susan Landau, Suzanne L. Baker, Andy Horng, Samuel N. Lockhart, Renaud La Joie, Gil D. Rabinovici, William J. Jagust, and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. 2017. "Comparison of Multiple Tau-PET Measures as Biomarkers in Aging and Alzheimer's Disease." *NeuroImage* 157 (August): 448–63. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.05.058>.
- Maina, Mahmoud Bukar, Youssra K. Al-Hilaly, and Louise C. Serpell. 2016. "Nuclear Tau and Its Potential Role in Alzheimer's Disease." *Biomolecules* 6 (1): 2–20. <https://doi.org/10.3390/biom6010009>.

- Malmqvist, Tony, Karen Anthony, and Jean-Marc Gallo. 2014. "Tau mRNA Is Present in Axonal RNA Granules and Is Associated with Elongation Factor 1A." *Brain Research* 1584 (October): 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.033>.
- Manczak, Maria, and P. Hemachandra Reddy. 2012. "Abnormal Interaction of VDAC1 with Amyloid Beta and Phosphorylated Tau Causes Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease." *Human Molecular Genetics* 21 (23): 5131–46. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds360>.
- Mandelkow, E. M., G. Drewes, J. Biernat, N. Gustke, J. Van Lint, J. R. Vandenheede, and E. Mandelkow. 1992. "Glycogen Synthase Kinase-3 and the Alzheimer-like State of Microtubule-Associated Protein Tau." *FEBS Letters* 314 (3): 315–21.
- Mandelkow, Eva Maria, Edda Thies, Bernhard Trinczek, Jacek Biernat, and Eckard Mandelkow. 2004. "MARK/PAR1 Kinase Is a Regulator of Microtubule-Dependent Transport in Axons." *Journal of Cell Biology* 167 (1): 99–110. <https://doi.org/10.1083/jcb.200401085>.
- Mansuroglu, Zeyni, Houda Benhelli-Mokrani, Vasco Marcato, Audrey Sultan, Marie Violet, Alban Chauderlier, Lucie Delattre, et al. 2016. "Loss of Tau Protein Affects the Structure, Transcription and Repair of Neuronal Pericentromeric Heterochromatin." *Scientific Reports* 6: 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep33047>.
- Marciniak, Elodie, Antoine Leboucher, Emilie Caron, Tariq Ahmed, Anne Tailleur, Julie Dumont, Tarik Issad, et al. 2017. "Tau Deletion Promotes Brain Insulin Resistance." *The Journal of Experimental Medicine* 214 (8): 2257–69. <https://doi.org/10.1084/jem.20161731>.
- Mastroeni, Diego, Elaine Delvaux, Jennifer Nolz, Yuyan Tan, Andrew Grover, Salvatore Oddo, and Paul D. Coleman. 2015. "Aberrant Intracellular Localization of H3k4me3 Demonstrates an Early Epigenetic Phenomenon in Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 36 (12): 3121–29. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.017>.
- Matsumoto, Shin-Ei, Yumiko Motoi, Koichi Ishiguro, Takeshi Tabira, Fuyuki Kametani, Masato Hasegawa, and Nobutaka Hattori. 2015. "The Twenty-Four kDa C-Terminal Tau Fragment Increases with Aging in Tauopathy Mice: Implications of Prion-like Properties." *Human Molecular Genetics* 24 (22): 6403–16. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv351>.
- Melis, Valeria, Mandy Magbagbeolu, Janet E. Rickard, David Horsley, Kathleen Davidson, Kathleen A. Harrington, Keith Goatman, et al. 2015. "Effects of Oxidized and Reduced Forms of Methylthionium in Two Transgenic Mouse Tauopathy Models." *Behavioural Pharmacology* 26 (4): 353–68. <https://doi.org/10.1097/FBP.000000000000133>.
- Metuzals, Jams, Yves Robitaille, Susan Houghton, Serge Gauthier, and Richard Leblanc. 1988. "Paired Helical Filaments and the Cytoplasmic-Nuclear Interface in Alzheimer's Disease." *Journal of Neurocytology* 17 (6): 827–33. <https://doi.org/10.1007/BF01216709>.
- Mirbaha, Hilda, Brandon B. Holmes, David W. Sanders, Jan Bieschke, and Marc I. Diamond. 2015. "Tau Trimers Are the Minimal Propagation Unit Spontaneously Internalized to Seed Intracellular Aggregation." *The Journal of Biological Chemistry* 290 (24): 14893–903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652693>.
- Mondragón-Rodríguez, Siddhartha, Emilie Trillaud-Doppia, Anthony Dudilot, Catherine Bourgeois, Michel Lauzon, Nicole Leclerc, and Jannic Boehm. 2012. "Interaction of Endogenous Tau Protein with Synaptic Proteins Is Regulated by N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Dependent Tau Phosphorylation." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (38): 32040–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401240>.
- Morgan, D., D. M. Diamond, P. E. Gottschall, K. E. Ugen, C. Dickey, J. Hardy, K. Duff, et al. 2000. "A Beta Peptide Vaccination Prevents Memory Loss in an Animal Model of Alzheimer's Disease." *Nature* 408 (6815): 982–85. <https://doi.org/10.1038/35050116>.
- Mosconi, Lisa, Alberto Pupi, and Mony J. De Leon. 2008. "NIH Public Access." *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 1147 (4): 180–95. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.007.Brain>.
- Mukrasch, Marco D., Stefan Bibow, Jegannath Korukottu, Sadasivam Jegannathan, Jacek Biernat, Christian Griesinger, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2009. "Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution." *PLoS Biology* 7 (2): 0399–0414. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000034>.

- Muntané, G., E. Dalfó, A. Martinez, and I. Ferrer. 2008. "Phosphorylation of Tau and Alpha-Synuclein in Synaptic-Enriched Fractions of the Frontal Cortex in Alzheimer's Disease, and in Parkinson's Disease and Related Alpha-Synucleinopathies." *Neuroscience* 152 (4): 913–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.030>.
- Myeku, Natura, Catherine L. Clelland, Sheina Emrani, Nikolay V. Kukushkin, Wai Haung Yu, Alfred L. Goldberg, and Karen E. Duff. 2015. "Tau-Driven 26S Proteasome Impairment and Cognitive Dysfunction Can Be Prevented Early in Disease by Activating cAMP-PKA Signaling." *Nature Medicine* 6 (December): 1–11. <https://doi.org/10.1038/nm.4011>.
- Narendra, Derek P., Seok Min Jin, Atsushi Tanaka, Der Fen Suen, Clement A. Gautier, Jie Shen, Mark R. Cookson, and Richard J. Youle. 2010. "PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin." *PLoS Biology* 8 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000298>.
- Narendra, Derek, Atsushi Tanaka, Der Fen Suen, and Richard J. Youle. 2008. "Parkin Is Recruited Selectively to Impaired Mitochondria and Promotes Their Autophagy." *Journal of Cell Biology* 183 (5): 795–803. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>.
- Nelson, Peter T., Irina Alafuzoff, Eileen H. Bigio, Constantin Bouras, Heiko Braak, Nigel J. Cairns, Rudolph J. Castellani, et al. 2012. "Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 71 (5): 362–81. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825018f7>.
- Noble, Wendy, Emmanuel Planel, Cindy Zehr, Vicki Olm, Jordana Meyerson, Farhana Suleman, Kate Gaynor, et al. 2005. "Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 by Lithium Correlates with Reduced Tauopathy and Degeneration in Vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (19): 6990–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500466102>.
- Oddo, Salvatore, Vitaly Vasilevko, Antonella Caccamo, Masashi Kitazawa, David H. Cribbs, and Frank M. LaFerla. 2006. "Reduction of Soluble Abeta and Tau, but Not Soluble Abeta Alone, Ameliorates Cognitive Decline in Transgenic Mice with Plaques and Tangles." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (51): 39413–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608485200>.
- Opatova, Alena, Martin Cente, Michal Novak, and Peter Filipcik. 2015. "The Ubiquitin Proteasome System as a Potential Therapeutic Target for Treatment of Neurodegenerative Diseases." *Gen. Physiol. Biophys* 34: 337–52. https://doi.org/10.4149/gpb_2015024.
- Orgogozo, J.-M., S. Gilman, J.-F. Dartigues, B. Laurent, M. Puel, L. C. Kirby, P. Jouanny, et al. 2003. "Subacute Meningoencephalitis in a Subset of Patients with AD after Abeta42 Immunization." *Neurology* 61 (1): 46–54.
- Orr, Anna G., Edward C. Hsiao, Max M. Wang, Kaitlyn Ho, Daniel H. Kim, Xin Wang, Weikun Guo, et al. 2015. "Astrocytic Adenosine Receptor A2A and Gs-Coupled Signaling Regulate Memory." *Nature Neuroscience* 18 (3): 423–34. <https://doi.org/10.1038/nn.3930>.
- Ott, A., R. P. Stolk, F. van Harskamp, H. A. P. Pols, A. Hofman, and M. M. B. Breteler. 1999. "Diabetes Mellitus and the Risk of Dementia: The Rotterdam Study." *Neurology* 53 (9): 1937–1937. <https://doi.org/10.1212/WNL.53.9.1937>.
- Oyama, Fumitaka, Svetlana Kotliarova, Akihiro Harada, Mamoru Ito, Haruko Miyazaki, Yoshito Ueyama, Nobutaka Hirokawa, Nobuyuki Nukina, and Yasuo Ihara. 2004. "Gem GTPase and Tau: Morphological Changes Induced by Gem GTPase in CHO Cells Are Antagonized by Tau." *Journal of Biological Chemistry* 279 (26): 27272–77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401634200>.
- Panda, Dulal, Jonathan C. Samuel, Michelle Massie, Stuart C. Feinstein, and Leslie Wilson. 2003. "Differential Regulation of Microtubule Dynamics by Three- and Four-Repeat Tau: Implications for the Onset of Neurodegenerative Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (16): 9548–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633508100>.
- Pandey, Mukesh K., and Timothy R. DeGrado. 2016. "Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3)-Targeted Therapy and Imaging."
- Panza, Francesco, Vincenzo Solfrizzi, Davide Seripa, Bruno P. Imbimbo, Madia Lozupone, Andrea Santamato, Rosanna Tortelli, et al. 2016. "Tau-Based Therapeutics for Alzheimer's Disease: Active and Passive Immunotherapy." *Immunotherapy* 8 (9): 1119–34. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0019>.

- Perez, Mar, Ismael Santa-Maria, Elena Gomez De Barreda, Xiongwei Zhu, Raquel Cuadros, Jose Roman Cabrero, Francisco Sanchez-Madrid, et al. 2009. "Tau - An Inhibitor of Deacetylase HDAC6 Function." *Journal of Neurochemistry* 109 (6): 1756–66. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06102.x>.
- Petrucci, Leonard, Dennis Dickson, Kathryn Kehoe, Julie Taylor, Heather Snyder, Andrew Grover, Michael De Lucia, et al. 2004. "CHIP and Hsp70 Regulate Tau Ubiquitination, Degradation and Aggregation." *Human Molecular Genetics* 13 (7): 703–14. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh083>.
- Phiel, Christopher J., Christina A. Wilson, Virginia M.-Y. Lee, and Peter S. Klein. 2003. "GSK-3 α Regulates Production of Alzheimer's Disease Amyloid-Beta Peptides." *Nature* 423 (lane 2): 435–39. <https://doi.org/10.1038/nature01640>.
- Pickhardt, Marcus, Zuzana Gazova, Martin von Bergen, Inna Khlistunova, Yipeng Wang, Antje Hascher, Eva-Maria Mandelkow, Jacek Biernat, and Eckhard Mandelkow. 2005. "Anthraquinones Inhibit Tau Aggregation and Dissolve Alzheimer's Paired Helical Filaments in Vitro and in Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (5): 3628–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410984200>.
- Pickhardt, Marcus, Gregor Larbig, Inna Khlistunova, Atilla Coksezen, Bernd Meyer, Eva-Maria Mandelkow, Boris Schmidt, and Eckhard Mandelkow. 2007. "Phenylthiazolyl-Hydrazide and Its Derivatives Are Potent Inhibitors of Tau Aggregation and Toxicity in Vitro and in Cells." *Biochemistry* 46 (35): 10016–23. <https://doi.org/10.1021/bi700878g>.
- Pilling, Aaron D., Dai Horiuchi, Curtis M. Lively, and William M. Saxton. 2006. "Kinesin-1 and Dynein Are the Primary Motors for Fast Transport of Mitochondria in Drosophila Motor Axons." *Molecular Biology of the Cell* 17 (4): 2057–68. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0526>.
- Pinheiro, Sara, Joana Silva, Cristina Mota, João Vaz-Silva, Ana Veloso, Vítor Pinto, Nuno Sousa, João Cerqueira, and Ioannis Sotiropoulos. 2016. "Tau Mislocation in Glucocorticoid-Triggered Hippocampal Pathology." *Molecular Neurobiology* 53 (7): 4745–53. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9356-2>.
- Planel, E. 2004. "Alterations in Glucose Metabolism Induce Hypothermia Leading to Tau Hyperphosphorylation through Differential Inhibition of Kinase and Phosphatase Activities: Implications for Alzheimer's Disease." *Journal of Neuroscience* 24 (10): 2401–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5561-03.2004>.
- Pooler, Amy M, Emma C Phillips, Dawn H W Lau, Wendy Noble, and Diane P Hanger. 2013. "Physiological Release of Endogenous Tau Is Stimulated by Neuronal Activity." *EMBO Reports* 14 (4): 389–94. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.15>.
- Prince, Martin J., A Commas-Herrera, M Knapp, M Guerchet, and M Karagiannidou. 2016. "World Alzheimer Report 2016 - Improving Healthcare for People Living with Dementia: Coverage, Quality and Costs Now and in the Future." September 20, 2016. <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016>.
- Qi, Haoling, François-Xavier Cantrelle, Houda Benhelli-Mokrani, Caroline Smet-Nocca, Luc Buée, Guy Lippens, Eliette Bonnefoy, Marie-Christine Galas, and Isabelle Landrieu. 2015. "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Characterization of Interaction of Tau with DNA and Its Regulation by Phosphorylation." *Biochemistry* 54 (7): 1525–33. <https://doi.org/10.1021/bi5014613>.
- Rapoport, Mark, Hana N. Dawson, Lester I. Binder, Michael P. Vitek, and Adriana Ferreira. 2002. "Tau Is Essential to Beta -Amyloid-Induced Neurotoxicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (9): 6364–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.092136199>.
- Regan, Philip, Thomas Piers, Jee-Hyun Yi, Dong-Hyun Kim, Seonghoo Huh, Se Jin Park, Jong Hoon Ryu, Daniel J. Whitcomb, and Kwangwook Cho. 2015. "Tau Phosphorylation at Serine 396 Residue Is Required for Hippocampal LTD." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (12): 4804–12. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2842-14.2015>.
- Roberson, Erik D., Kimberly Scarce-Levie, Jorge J. Palop, Fengrong Yan, Irene H. Cheng, Tiffany Wu, Hilary Gerstein, Gui-Qiu Yu, and 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>.
- Rodríguez-Martín, Teresa, Amy M. Pooler, Dawn H. W. Lau, Gábor M. Mórotz, Kurt J. De Vos, Jonathan Gilley, Michael P. Coleman, and Diane P. Hanger. 2016. "Reduced Number of Axonal Mitochondria and Tau

- Hypophosphorylation in Mouse P301L Tau Knockin Neurons." *Neurobiology of Disease* 85: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.10.007>.
- Rossi, Giacomina, Donatella Conconi, Elena Panzeri, Serena Redaelli, Elena Piccoli, Laura Paoletta, Leda Dalprà, and Fabrizio Tagliavini. 2013. "Mutations in MAPT Gene Cause Chromosome Instability and Introduce Copy Number Variations Widely in the Genome." *Journal of Alzheimer's Disease* 33 (4): 969–82. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121633>.
- Rutgers, K. S., R. J. A. Nabuurs, S. a. A. van den Berg, G. J. Schenk, M. Rotman, C. T. Verrips, S. G. van Duinen, et al. 2011. "Transmigration of Beta Amyloid Specific Heavy Chain Antibody Fragments across the in Vitro Blood-Brain Barrier." *Neuroscience* 190 (September): 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.076>.
- Ruthel, Gordon, and Peter J. Hollenbeck. 2003. "Response of Mitochondrial Traffic to Axon Determination and Differential Branch Growth." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (24): 8618–24. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23/24/8618> [pii].
- Salloway, Stephen, Reisa Sperling, Nick C. Fox, Kaj Blennow, William Klunk, Murray Raskind, Marwan Sabbagh, et al. 2014. "Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease." *The New England Journal of Medicine* 370 (4): 322–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304839>.
- Saman, Sudad, WonHee Kim, Mario Raya, Yvonne Visnick, Suhad Miro, Sarmad Saman, Bruce Jackson, et al. 2012. "Exosome-Associated Tau Is Secreted in Tauopathy Models and Is Selectively Phosphorylated in Cerebrospinal Fluid in Early Alzheimer Disease." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (6): 3842–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.277061>.
- Sanders, David W., Sarah K. Kaufman, Sarah L. DeVos, Apurwa M. Sharma, Hilda Mirbaha, Aimin Li, Scarlett J. Barker, et al. 2014. "Distinct Tau Prion Strains Propagate in Cells and Mice and Define Different Tauopathies." *Neuron* 82 (6): 1271–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.047>.
- Santarella, Rachel A., Georgios Skiniotis, Kenneth N. Goldie, Peter Tittmann, Heinz Gross, Eva-Maria Mandelkow, E. Mandelkow, and Andreas Hoenger. 2004. "Surface-Decoration of Microtubules by Human Tau." *Journal of Molecular Biology* 339 (3): 539–53. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.04.008>.
- Saxton, W. M., and P. J. Hollenbeck. 2012. "The Axonal Transport of Mitochondria." *Journal of Cell Science* 125 (9): 2095–2104. <https://doi.org/10.1242/jcs.053850>.
- Schenk, D., R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, et al. 1999. "Immunization with Amyloid-Beta Attenuates Alzheimer-Disease-like Pathology in the PDAPP Mouse." *Nature* 400 (6740): 173–77. <https://doi.org/10.1038/22124>.
- Schwalbe, Martin, Harindranath Kadavath, Jacek Biernat, Valery Ozenne, Martin Blackledge, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2015. "Structural Impact of Tau Phosphorylation at Threonine 231." *Structure* 23 (8): 1448–58. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.06.002>.
- Schwarz, Adam J., Peng Yu, Bradley B. Miller, Sergey Shcherbinin, James Dickson, Michael Navitsky, Abhinav D. Joshi, Michael D. Devous, and Mark S. Mintun. 2016. "Regional Profiles of the Candidate Tau PET Ligand 18F-AV-1451 Recapitulate Key Features of Braak Histopathological Stages." *Brain: A Journal of Neurology* 139 (Pt 5): 1539–50. <https://doi.org/10.1093/brain/aww023>.
- Seitz-Tutter, D., G. M. Langford, and D. G. Weiss. 1988. "Dynamic Instability of Native Microtubules from Squid Axons Is Rare and Independent of Gliding and Vesicle Transport." *Experimental Cell Research* 178 (2): 504–12.
- Sengupta, A., J. Kabat, M. Novak, Q. Wu, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1998. "Phosphorylation of Tau at Both Thr 231 and Ser 262 Is Required for Maximal Inhibition of Its Binding to Microtubules." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 357 (2): 299–309. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0813>.
- Sergeant, N., A. Watzek, and A. Delacourte. 1999. "Neurofibrillary Degeneration in Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration: Tau Pathologies with Exclusively 'exon 10' isoforms." *Journal of Neurochemistry* 72 (3): 1243–49.
- Sergeant, Nicolas, Alexis Bretteville, Malika Hamdane, Marie-Laure Caillet-Boudin, Pierre Grognet, Stephanie Bombois, David Blum, et al. 2008. "Biochemistry of Tau in Alzheimer's Disease and Related

- Neurological Disorders." *Expert Review of Proteomics* 5 (2): 207–24. <https://doi.org/10.1586/14789450.5.2.207>.
- Shipton, Olivia A., Julie R. Leitz, Jenny Dworzak, Christine E. J. Acton, Elizabeth M. Tunbridge, Franziska Denk, Hana N. Dawson, et al. 2011. "Tau Protein Is Required for Amyloid {beta}-Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (5): 1688–92. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2610-10.2011>.
- Sibille, Nathalie, Isabelle Huvent, Caroline Fauquant, Dries Verdegem, Laziza Amniai, Arnaud Leroy, Jean Michel Wieruszkeski, Guy Lippens, and Isabelle Landrieu. 2012. "Structural Characterization by Nuclear Magnetic Resonance of the Impact of Phosphorylation in the Proline-Rich Region of the Disordered Tau Protein." *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 80 (2): 454–62. <https://doi.org/10.1002/prot.23210>.
- Sjoberg, M. K. 2006. "Tau Protein Binds to Pericentromeric DNA: A Putative Role for Nuclear Tau in Nucleolar Organization." *Journal of Cell Science* 119 (10): 2025–34. <https://doi.org/10.1242/jcs.02907>.
- Snow, A. D., T. N. Wight, D. Nochlin, Y. Koike, K. Kimata, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1990. "Immunolocalization of Heparan Sulfate Proteoglycans to the Prion Protein Amyloid Plaques of Gerstmann-Straussler Syndrome, Creutzfeldt-Jakob Disease and Scrapie." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 63 (5): 601–11.
- Sokolow, Sophie, Kristen M. Henkins, Tina Bilousova, Bianca Gonzalez, Harry V. Vinters, Carol A. Miller, Lindsey Cornwell, Wayne W. Poon, and Karen H. Gylys. 2015. "Pre-Synaptic C-Terminal Truncated Tau Is Released from Cortical Synapses in Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 133 (3): 368–79. <https://doi.org/10.1111/jnc.12991>.
- Spillantini, M. G., T. D. Bird, and B. Ghetti. 1998. "Frontotemporal Dementia and Parkinsonism Linked to Chromosome 17: A New Group of Tauopathies." *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 8 (2): 387–402.
- Spillantini, Maria Grazia, and Michel Goedert. 2013. "Tau Pathology and Neurodegeneration." *The Lancet. Neurology* 12 (6): 609–22. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70090-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5).
- Spillantini, Maria Grazia, Jill R. Murrell, Michel Goedert, Martin R. Farlow, Aaron Klug, and Bernardino Ghetti. 1998. "Mutation in the Tau Gene in Familial Multiple System Tauopathy with Presenile Dementia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (13): 7737–41.
- Spires-Jones, Tara L., and Bradley T. Hyman. 2014. "The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease." *Neuron* 82 (4): 756–71. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.004>.
- Sultan, Audrey, Fabrice Nessler, Marie Violet, Séverine Bégard, Anne Loyens, Smail Talahari, Zeyni Mansuroglu, et al. 2011. "Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection." *Journal of Biological Chemistry* 286 (6): 4566–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976>.
- Sun, Tao, Haifa Qiao, Ping Yue Pan, Yanmin Chen, and Zu Hang Sheng. 2013. "Motile Axonal Mitochondria Contribute to the Variability of Presynaptic Strength." *Cell Reports* 4 (3): 413–19. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.040>.
- Suzuki, Mamiko, and Tetsuya Kimura. 2017. "Microtubule-Associated Tau Contributes to Intra-Dendritic Trafficking of AMPA Receptors in Multiple Ways." *Neuroscience Letters* 653 (July): 276–82. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.056>.
- Tai, Hwan-Ching, Alberto Serrano-Pozo, Tadafumi Hashimoto, Matthew P. Frosch, Tara L. Spires-Jones, and Bradley T. Hyman. 2012. "The Synaptic Accumulation of Hyperphosphorylated Tau Oligomers in Alzheimer Disease Is Associated with Dysfunction of the Ubiquitin-Proteasome System." *The American Journal of Pathology* 181 (4): 1426–35. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.033>.
- Takahashi, Reisuke H., Estibaliz Capetillo-Zarate, Michael T. Lin, Teresa A. Milner, and Gunnar K. Gouras. 2010. "Co-Occurrence of Alzheimer's Disease β -Amyloid and τ Pathologies at Synapses." *Neurobiology of Aging* 31 (7): 1145–52. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.021>.
- Tardivel, Meryem, Séverine Bégard, Luc Bousset, Simon Dujardin, Audrey Coens, Ronald Melki, Luc Buée, and Morvane Colin. 2016. "Tunneling Nanotube (TNT)-Mediated Neuron-to Neuron Transfer of Pathological Tau Protein Assemblies." *Acta Neuropathologica Communications* 4 (November). <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0386-4>.

- Tashiro, K., M. Hasegawa, Y. Ihara, and T. Iwatsubo. 1997. "Somatodendritic Localization of Phosphorylated Tau in Neonatal and Adult Rat Cerebral Cortex." *Neuroreport* 8 (12): 2797–2801.
- Tatebayashi, Yoshitaka, Niloufar Haque, Yunn-Chyn Tung, Khalid Iqbal, and Inge Grundke-Iqbal. 2004. "Role of Tau Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 β in the Regulation of Organelle Transport." *Journal of Cell Science* 117 (9): 1653–63. <https://doi.org/10.1242/jcs.01018>.
- Temido-Ferreira, Mariana, Diana G. Ferreira, Vânia L. Batalha, Inês Marques-Morgado, Joana E. Coelho, Pedro Pereira, Rui Gomes, et al. 2018. "Age-Related Shift in LTD Is Dependent on Neuronal Adenosine A2A Receptors Interplay with mGluR5 and NMDA Receptors." *Molecular Psychiatry*, June. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0110-9>.
- Teune, Laura K., Anna L. Bartels, Bauke M. de Jong, Antoon T. M. Willemsen, Silvia A. Eshuis, Jeroen J. de Vries, Joost C. H. van Oostrom, and Klaus L. Leenders. 2010. "Typical Cerebral Metabolic Patterns in Neurodegenerative Brain Diseases." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 25 (14): 2395–2404. <https://doi.org/10.1002/mds.23291>.
- Theunis, Clara, Natalia Crespo-Biel, Valérie Gafner, Maria Pihlgren, María Pilar López-Deber, Pedro Reis, David T. Hickman, et al. 2013. "Efficacy and Safety of A Liposome-Based Vaccine against Protein Tau, Assessed in Tau.P301L Mice That Model Tauopathy." *PLoS ONE* 8 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072301>.
- Thornton, Claire, Nicola J. Bright, Magdalena Sastre, Phillip J. Muckett, and David Carling. 2011. "AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is a Tau Kinase, Activated in Response to Amyloid β -Peptide Exposure." *Biochemical Journal* 434 (3): 503–12. <https://doi.org/10.1042/BJ20101485>.
- Tiwari, Sachin S., Marie d'Orange, Claire Troakes, Badrun N. Shurovi, Olivia Engmann, Wendy Noble, Tibor Hortobágyi, and Karl P. Giese. 2015. "Evidence That the Presynaptic Vesicle Protein CSPalpha Is a Key Player in Synaptic Degeneration and Protection in Alzheimer's Disease." *Molecular Brain* 8 (January): 6. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0096-z>.
- Tracy, Tara E., Peter Dongmin Sohn, S. Sakura Minami, Chao Wang, Sang-Won Min, Yaqiao Li, Yungui Zhou, et al. 2016. "Acetylated Tau Obstructs KIBRA-Mediated Signaling in Synaptic Plasticity and Promotes Tauopathy-Related Memory Loss." *Neuron* 90 (2): 245–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.005>.
- Trinczek, B., J. Biernat, K. Baumann, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1995. "Domains of Tau Protein, Differential Phosphorylation, and Dynamic Instability of Microtubules." *Molecular Biology of the Cell* 6 (12): 1887–1902.
- Troquier, Laetitia, Raphaëlle Caillierez, Sylvie Burnouf, Francisco J. Fernandez-Gomez, Marie-Eve Grosjean, Nadege Zommer, Nicolas Sergeant, Susanna Schraen-Maschke, David Blum, and Luc Buee. 2012. "Targeting Phospho-Ser422 by Active Tau Immunotherapy in the THY Tau22 Mouse Model: A Suitable Therapeutic Approach." *Current Alzheimer Research* 9 (4): 397–405.
- Tseng, Bertrand P., Kim N. Green, Julie L. Chan, Mathew Blurton-Jones, and Frank M. LaFerla. 2008. "A β Inhibits the Proteasome and Enhances Amyloid and Tau Accumulation." *Neurobiology of Aging* 29 (11): 1607–18. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.014>.
- Tsuboi, Yoshio, Katsumi Doh-Ura, and Tatsuo Yamada. 2009. "Continuous Intraventricular Infusion of Pentosan Polysulfate: Clinical Trial against Prion Diseases." *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 29 (5): 632–36. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2009.01058.x>.
- Vingtdeux, Valérie, Peter Davies, Dennis W. Dickson, and Philippe Marambaud. 2011. "AMPK Is Abnormally Activated in Tangle- and Pre-Tangle-Bearing Neurons in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies." *Acta Neuropathologica* 121 (3): 337–49. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0759-x>.
- Violet, Marie, Alban Chauderlier, Lucie Delattre, Meryem Tardivel, Meliza Sendid Chouala, Audrey Sultan, Elodie Marciniak, et al. 2015. "Prefibrillar Tau Oligomers Alter the Nucleic Acid Protective Function of Tau in Hippocampal Neurons in Vivo." *Neurobiology of Disease* 82: 540–51. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.09.003>.
- Violet, Marie, Lucie Delattre, Meryem Tardivel, Audrey Sultan, Alban Chauderlier, Raphaëlle Caillierez, Smail Talahari, et al. 2014. "A Major Role for Tau in Neuronal DNA and RNA Protection in Vivo under

- Physiological and Hyperthermic Conditions." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (March). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00084>.
- Wan, Q., Z. G. Xiong, H. Y. Man, C. A. Ackerley, J. Branton, W. Y. Lu, L. E. Becker, J. F. MacDonald, and Y. T. Wang. 1997. "Recruitment of Functional GABA(A) Receptors to Postsynaptic Domains by Insulin." *Nature* 388 (6643): 686–90. <https://doi.org/10.1038/41792>.
- Wang, Jian Zhi, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2007. "Kinases and Phosphatases and Tau Sites Involved in Alzheimer Neurofibrillary Degeneration." *European Journal of Neuroscience* 25 (1): 59–68. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05226.x>.
- Wang, Yipeng, and Eckhard Mandelkow. 2016. "Tau in Physiology and Pathology." *Nature Reviews. Neuroscience* 17 (1): 5–21. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>.
- Wei, Yan, Mei Hua Qu, Xing Sheng Wang, Lan Chen, Dong Liang Wang, Ying Liu, Qian Hua, and Rong Qiao He. 2008. "Binding to the Minor Groove of the Double-Strand, Tau Protein Prevents DNA Damage by Peroxidation." *PLoS ONE* 3 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002600>.
- Wei, Yu Ping, Jin Wang Ye, Xiong Wang, Li Ping Zhu, Qing Hua Hu, Qun Wang, Dan Ke, Qing Tian, and Jian Zhi Wang. 2018. "Tau-Induced Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase-IV Activation Aggravates Nuclear Tau Hyperphosphorylation." *Neuroscience Bulletin* 34 (2): 261–69. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0148-8>.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner. 1975. "A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (5): 1858–62.
- Werth, J. L., and S. A. Thayer. 1994. "Mitochondria Buffer Physiological Calcium Loads in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 14 (1): 348–56.
- Wilcock, G. K., and M. M. Esiri. 1982. "Plaques, Tangles and Dementia. A Quantitative Study." *Journal of the Neurological Sciences* 56 (2–3): 343–56.
- Wischik, C. M., P. C. Edwards, R. Y. Lai, M. Roth, and C. R. Harrington. 1996. "Selective Inhibition of Alzheimer Disease-like Tau Aggregation by Phenothiazines." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (20): 11213–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11213>.
- Wischik, Claude M., Roger T. Staff, Damon J. Wischik, Peter Bentham, Alison D. Murray, John M. D. Storey, Karin A. Kook, and Charles R. Harrington. 2015. "Tau Aggregation Inhibitor Therapy: An Exploratory Phase 2 Study in Mild or Moderate Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease* 44 (2): 705–20. <https://doi.org/10.3233/JAD-142874>.
- Witman, G. B., D. W. Cleveland, M. D. Weingarten, and M. W. Kirschner. 1976. "Tubulin Requires Tau for Growth onto Microtubule Initiating Sites." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (11): 4070–74.
- Wu, Jessica W., Mathieu Herman, Li Liu, Sabrina Simoes, Christopher M. Acker, Helen Figueroa, Joshua I. Steinberg, et al. 2013. "Small Misfolded Tau Species Are Internalized via Bulk Endocytosis and Anterogradely and Retrogradely Transported in Neurons." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (3): 1856–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.394528>.
- Wu, Jessica W., Syed A. Hussaini, Isle M. Bastille, Gustavo A. Rodriguez, Ana Mrejeru, Kelly Rilett, David W. Sanders, et al. 2016. "Neuronal Activity Enhances Tau Propagation and Tau Pathology in Vivo." *Nature Neuroscience* 19 (8): 1085–92. <https://doi.org/10.1038/nn.4328>.
- Yagishita, Sosuke, Miyuki Murayama, Tomoe Ebihara, Kei Maruyama, and Akihiko Takashima. 2015. "Glycogen Synthase Kinase 3 β -Mediated Phosphorylation in the Most C-Terminal Region of Protein Interacting with C Kinase 1 (PICK1) Regulates the Binding of PICK1 to Glutamate Receptor Subunit GluA2." *The Journal of Biological Chemistry* 290 (49): 29438–48. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619668>.
- Yamada, Elizabeth S., Gesine Respondek, Stefanie Müssner, Anderson de Andrade, Matthias Höllerhage, Christel Depienne, Agnès Rastetter, et al. 2014. "Annonacin, a Natural Lipophilic Mitochondrial Complex I Inhibitor, Increases Phosphorylation of Tau in the Brain of FTDP-17 Transgenic Mice." *Experimental Neurology* 253: 113–25. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.12.017>.

- Yamada, K. M., B. S. Spooner, and N. K. Wessells. 1970. "Axon Growth: Roles of Microfilaments and Microtubules." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 66 (4): 1206–12.
- Yamada, Kaoru, Jerrah K. Holth, Fan Liao, Floy R. Stewart, Thomas E. Mahan, Hong Jiang, John R. Cirrito, et al. 2014. "Neuronal Activity Regulates Extracellular Tau in Vivo." *The Journal of Experimental Medicine* 211 (3): 387–93. <https://doi.org/10.1084/jem.20131685>.
- Yanamandra, Kiran, Hong Jiang, Thomas E. Mahan, Susan E. Maloney, David F. Wozniak, Marc I. Diamond, and David M. Holtzman. 2015. "Anti-Tau Antibody Reduces Insoluble Tau and Decreases Brain Atrophy." *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2 (3): 278–88. <https://doi.org/10.1002/acn3.176>.
- Yanamandra, Kiran, Najla Kfoury, Hong Jiang, Thomas E. Mahan, Shengmei Ma, Susan E. Maloney, David F. Wozniak, Marc I. Diamond, and David M. Holtzman. 2013. "Anti-Tau Antibodies That Block Tau Aggregate Seeding in Vitro Markedly Decrease Pathology and Improve Cognition in Vivo." *Neuron* 80 (2): 402–14. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.046>.
- Youle, Richard J., and Derek P. Narendra. 2011. "Mechanisms of Mitophagy." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (1): 9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>.
- Zempel, Hans, and Eva-Maria Mandelkow. 2015. "Tau Missorting and Spastin-Induced Microtubule Disruption in Neurodegeneration: Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia." *Molecular Neurodegeneration* 10 (December). <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0064-1>.
- Zempel, Hans, Edda Thies, Eckhard Mandelkow, and Eva-Maria Mandelkow. 2010. "Abeta Oligomers Cause Localized Ca(2+) Elevation, Missorting of Endogenous Tau into Dendrites, Tau Phosphorylation, and Destruction of Microtubules and Spines." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (36): 11938–50. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2357-10.2010>.
- Zhang, Zhong-hao, Qiu-yan Wu, Rui Zheng, Chen Chen, Yao Chen, Qiong Liu, Peter R. Hoffmann, Jia-zuan Ni, and Guo-Li Song. 2017. "Selenomethionine Mitigates Cognitive Decline by Targeting Both Tau Hyperphosphorylation and Autophagic Clearance in an Alzheimer's Disease Mouse Model." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 37 (9): 3229–16. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3229-16.2017>.
- Ziviani, E., R. N. Tao, and A. J. Whitworth. 2010. "Drosophila Parkin Requires PINK1 for Mitochondrial Translocation and Ubiquitinates Mitofusin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (11): 5018–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913485107>.

Annexe 2 : Article « *New piperazine multi-effect drugs prevent neurofibrillary degeneration and amyloid deposition, and preserve memory in animal models of Alzheimer's disease* »

Article soumis le 16/08/18 dans le journal *Neurobiology of disease*

New piperazine multi-effect drugs prevent neurofibrillary degeneration and amyloid deposition, and preserve memory in animal models of Alzheimer's disease

Nicolas Sergeant^{a,*}, Valérie Vingtdeux^{a,§}, Sabiha Eddarkaoui^{a,§}, Marion Gay^a, Caroline Evrard^a, Nicolas Le Fur^a, Cyril Laurent^a, Raphaëlle Caillierez^a, Hélène Obriot^a, Paul-Emmanuel Larchanché^a, Amaury Farce^b, Mathilde Coevoet^a, Pascal Carato^{a,1}, Mostafa Kouach^c, Amandine Descat^c, Patrick Dallemagne^d, Valérie Buée-Scherrer^a, David Blum^a, Malika Hamdane^a, Luc Buée^a, Patricia Melnyk^{a,*}

a. Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, UMR-S1172 – JPArc – Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert Neurosciences et Cancer, F-59000 Lille, France.

b. Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U995 – LIRIC – Lille Inflammation Research International Center, F-59000 Lille, France.

c. Univ. Lille, CUMA – Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses, F-59000 Lille, France.

d. UNICAEN, UFR des Sciences Pharmaceutiques, EA 4258 CERMN, F-14032 Caen, France.

1. Present address: Univ Poitiers, CNRS IC2MP UMR 7285, F-86073 Poitiers, France.

[§]Equal contribution

Running title: New multi-effect drug candidates against Alzheimer's disease

Abstract

Alzheimer's Disease is a devastating dementing disease involving amyloid deposits, neurofibrillary tangles, progressive and irreversible cognitive impairment. Today, only symptomatic drugs are available and therapeutic treatments, possibly acting at a multiscale level, are thus urgently needed. To that purpose, we designed multi-effects compounds by synthesizing drug candidates derived by substituting a novel *N,N'*-disubstituted piperazine anti-amyloid scaffold and adding acetylcholinesterase inhibition property. Two compounds were synthesized and evaluated. The most promising hybrid molecule reduces both the amyloid pathology and the Tau pathology as well as the memory impairments in a preclinical model of Alzheimer's disease. *In vitro* also, the compound reduces the phosphorylation of Tau and inhibits the release of A β peptides while preserving the processing of other metabolites of the amyloid precursor protein.

We synthesized and tested the first drug capable of ameliorating both the amyloid and Tau pathology in animal models of AD as well as preventing the major brain lesions and associated memory impairments. This work paves the way for future compound medicines against both Alzheimer's-related brain lesions development and the associated cognitive impairments.

Key words: Alzheimer's disease / Amyloid / Microtubule-associated protein tau / Multi-effect drugs / Neurofibrillary tangles / Tauopathies / Acetylcholinesterase

Abbreviations: AChE, acetylcholinesterase; AD, Alzheimer's Disease; ADME, Absorption Distribution Metabolism Excretion; AICD, APP Intra Cellular Domain; APP, amyloid precursor protein; BACE 1, Beta-site Amyloid-precursor-protein-Cleaving Enzyme 1; Baf, Bafilomycin; BBB, Blood Brain Barrier; CQ, Chloroquine; CTF, carboxy-terminal fragment; NFT, neurofibrillary tangles; NICD, Notch Intra Cellular Domain; PS1, Pre-Senilin 1.

Introduction

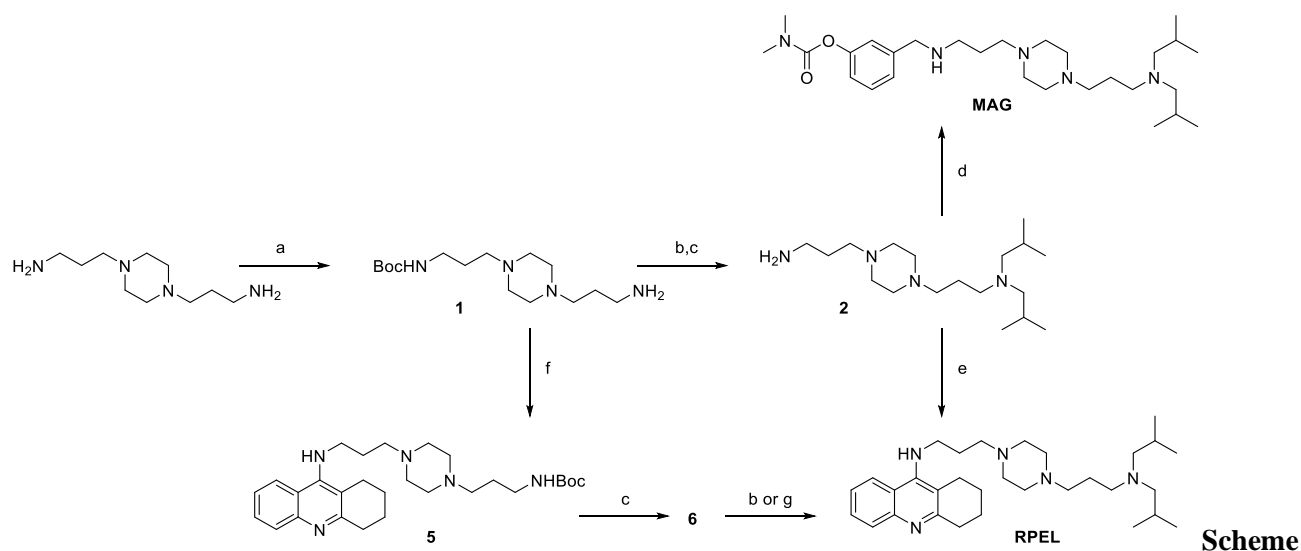
Alzheimer's disease (AD) is a disease that entails neurodegeneration and dementia and has no cure yet. AD associates two principal neuropathological components, namely extracellular amyloid deposits and neurofibrillary tangles (NFTs). The amyloid pathology is characterized by abnormal production of pro-aggregative and synaptotoxic amyloid- β (A β) species that are the building blocks of extracellular amyloid deposits. NFTs result from the abnormal phosphorylation of isoforms of the microtubule-associated protein Tau and their progressive accumulation and aggregation into fibrils in neurons (Dubois, Feldman et al. (2010)). NFTs are known to affect the cholinergic system in AD and their spatiotemporal distribution is tightly correlated with cognitive impairments. Moreover, progression of 'Tau pathology' is also correlated with increased concentrations of brain A β peptides and the loss of APP metabolites (Sergeant, Watzel et al. (1999)). A growing body of evidence supports the notion that these two pathological processes are both causative of the disease and might even have a synergistic effect on the progression of the symptoms (Sergeant, David et al. (2002), Ittner, Ke et al. (2010), Takahashi, Miyata et al. (2015), Pooler, Polydoro et al. (2015)). Thereby, a promising therapeutic approach could be to tackle the causes and effects of both amyloid and Tau pathologies (Mangialasche, Solomon et al. (2010)). Nevertheless, disease-modifying small molecules currently in clinical trials only act on either one or the other of these processes or are supposed to cure the symptoms (Cummings, Lee et al. (2017)). A multi-target directed ligands strategy has already been suggested for multifactorial diseases (Capurro, Busquet et al. (2013)).

We previously described *N,N'*-disubstituted piperazine scaffold (Melnyk, Sergeant et al. (2006), Melnyk, Vingtdoux et al. (2015)) which are able to reduce the release of A β species and increase the amount of APP metabolites. These compounds targeted both amyloid and tau pathologies as well as the cognitive functions in well-characterized mouse models of either amyloid or Tau pathology (Barrier et al. (2012)). The lead compound of this family, **AZP2006**, is in clinical phase 1. On the other hand, acetylcholinesterase inhibitors are anti-Alzheimer's drugs available in the market. We describe herein multi-effect molecules that combine an *N,N'*-disubstituted piperazine scaffold and acetylcholinesterase (AChE) inhibitors in a single molecule. Thus, as proof-of-concept, two multi-effect molecules were synthesized, starting from AChE inhibitors Tacrine and Rivastigmine. Notably, one of the compounds substituted with Tacrine (**RPEL**) not only preserved AD mice from cognitive deterioration and reduced the amyloid pathology but also significantly reduced the Tau pathology. No adverse effect related to cholinergic toxicity could be

registered. This work validates the challenging strategy for the design of multi-effect drugs as a substantial breakthrough and identifies **RPEL** as a lead compound for the development of a multi-faceted treatment for AD.

Material and methods

Synthesis of compounds. Both mixed compounds **RPEL** and **MAG** were obtained from a common intermediate **1**, synthesized from commercially available 3-[4-(3-aminopropyl)piperazin-1-yl]propan-1-amine (Scheme 1). The synthetic pathway is characterized by protection, deprotection reactions, Palladium cross couplings and reductive aminations ((Hu (2001), Ryckebusch, Deprez-Poulain et al. (2003)). This pathway allows also the synthesis of **RPEL-d₁₄**, used as the internal standard in quantitative dosage.



1: Synthesis of MAG and RPEL compounds

Reagents and conditions : (a) Boc_2O (0.3 eq), DCM, 20°C, 2 days, 99%; (b) isobutyraldehyde (4.1 eq), TEA (1.2 eq), NaBH_4 (6.0 eq), MeOH, 20°C, 24 h, 50-58%; (c) dioxane saturated with HCl_g , 20°C, 12 h, 99%; (d) 3-formylphenyl-*N,N*-dimethylcarbamate **3** (1.1 eq), NaBH_4 (6.5 eq), MeOH, 20°C, 2 days, 76%; (e) (+/-) BINAP (0.15 eq), Cs_2CO_3 (0.8 eq), Pd_2dba_3 (0.3 eq), dioxane, reflux, 12 h, 75%; (f) 9-chloro-1,2,3,4-tetrahydroacridine **2** (1.2 eq), Cs_2CO_3 (1.4 eq), Xantphos (0.15 eq), Pd_2dba_3 (0.05 eq), dioxane, reflux, 1 day, 90%; (g) isobutyraldehyde- d_7 (4.0 eq), $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (4.0 eq), DCM, 20°C, 15 h, 34%.

AChE inhibition. The inhibitory capacity of compounds on AChE biological activity was evaluated using the spectrometric method of Ellman (Ellman, Courtney et al. (1961)). Acetylthiocholine iodide and 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) were purchased from Sigma Aldrich. AChE from human erythrocytes (buffered aqueous solution, ≥ 500 units/mg protein (BCA), Sigma Aldrich) was diluted in 20 mM HEPES buffer pH 8, with 0.1% Triton X-100 such as to obtain an enzyme solution with 0.25 unit/mL enzyme activity. In a 96-well

plate, 100 μ L of 0.3 mM DTNB dissolved in phosphate buffer pH 7.4 was added followed by 50 μ L of test compound solution and 50 μ L of enzyme (0.05 U final). After 5 min of pre-incubation at 25°C, the reaction was initiated by the injection of 50 μ L of 10 mM acetylthiocholine iodide solution. The hydrolysis of acetylthiocholine was monitored by the formation of yellow 5-thio-2-nitrobenzoate anion as the result of the reaction of DTNB with thiocholine, released by the enzymatic hydrolysis of acetylthiocholine, at a wavelength of 412 nm, using a 96-well microplate reader (TECAN Infinite M200, Lyon, France). Test compounds were dissolved in analytical grade DMSO. The rate of increase of absorbance at 412 nm was followed every minute for 10 min. Assays were performed with a blank containing all components except acetylthiocholine, in order to account for non-enzymatic reactions. The reaction slopes were compared and the percent inhibition due to the presence of test compounds was calculated by the following expression: $100 - (v_i/v_0 \times 100)$ where v_i is the rate calculated in the presence of inhibitor and v_0 is enzyme activity. IC₅₀ values were determined graphically by plotting the percentage of inhibition versus the logarithm of six inhibitor concentrations in the assay solution, using Origin software.

Antibodies. The primary antibodies used herein included: a rabbit antiserum against the last 17 amino acids of APP, named APP-C17 (Sergeant, David et al. (2002), Vingtdeux, Hamdane et al. (2007)). The Myc-Tag (9B11) monoclonal antibody (Cell Signaling) was used to study Δ E Notch processing (Vingtdeux, Hamdane et al. (2007)). The WO-2 (Millipore) or 6E8 (Covance) antibodies were directed against the N-terminal region of the human A β peptide. The APP-8E5 antibody was kindly provided by Peter Seubert (Elan Pharmaceutical) and recognizes the APP sequence 444-592 (numbering according to the APP695 isoform). The BACE1 antibody was a rabbit purified polyclonal antibody raised against a synthetic peptide of the human BACE1 sequence 458-501 (Millipore). Pan-Tau and phospho-dependent Tau antibodies included Tau-Nter (M19G, 1/10 000, Tau-Cter (1/10 000) (Sergeant, David et al. (2007)), Tau-1 (1/5000, Merck Millipore), S199P (directed against phosphoserine 199, 1/4000, Sergeant, David et al. (2007)), Tau-Phospho 396 (1/10 000, Life Technologies), Tau-Phospho 404 (1/10 000, Life Technologies), 422 (clone 2H9, a monoclonal antibody developed against a phospho-peptide containing the phosphorylated serine 422 residue of Tau, numbering according to the longest human brain tau-441 isoform), AT8 (1/1000) and AT270 (1/2000), AT100 (1/1000) were purchased from

Thermo Scientific. Neuron-specific enolase (1/10 000), β -actin (1/5000) and β -tubulin (1/10 000) were from Sigma-Aldrich.

Cell culture and transfection. The human neuroblastoma cell line SKNSH-SY5Y (SY5Y) was maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM non-essential amino acids, penicillin/streptomycin (Life Sciences Technology) in a 5% CO₂ humidified incubator at 37°C. Human APP695 cDNA was sub-cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen), allowing for antibiotic selection with G418. This plasmid was transfected into SY5Y cells using the ethyleneimine polymer ExGen 500 (Euromedex) according to the manufacturer's instructions. SY5Y-expressing the WT APP695 isoforms were selected by the addition of 200 μ g/ml G418 to the cell culture medium and one clone, named SY5Y-APP^{695WT}, was used. For the transient expression of Δ E Notch (Notch I lacking the extracellular domain), SY5Y cells were transfected with Myc-tagged Δ E Notch (kindly provided by Pr. Raphael Kopan; Washington University, St. Louis, MO, USA) using the FuGENE® HD transfection reagent according to the manufacturer's instructions (Roche). Cells were collected 24 h after drug treatment. The inducible SY5Y-Tau46 (corresponding to the human brain isoform of 412 amino acids, including coding sequences for exon 2 and 10) has been described previously (Bretteville, Ando et al. (1999)). Briefly, to induce human Tau 412 protein expression, SY5Y-Tau46 cells were treated for 24 h with 1 μ g/mL of tetracycline and induced SY5Y-Tau46 cells were further treated for 24 h with drugs at the indicated concentrations. Protein lysates were obtained as indicated under drug treatment. Cell culture and treatment conditions were the same as for the SY5Y-APP^{695WT} cell-line.

In vitro metabolic stability (mouse liver microsomes). RPEL stock solutions were diluted in 100 mM potassium phosphate buffer (KPi, 1 μ M final concentrations) pH = 7.4, and test compounds were then incubated for 60 min in an incubator-shaker (Eppendorf) at 37 °C and 1400 rpm with regenerating system (NADPH) and microsomal preparation (male mice, BD Biosciences, final concentration 0.3 mg/mL in KPi buffer). Reactions were stopped with cold acetonitrile and Internal Standard (IS) CQ diphosphate was then added for further quantification (based upon Test compound/IS ratio area). Samples were mixed thoroughly and then centrifuged at 13000 rpm for 10 min. Supernatants were evaporated with an under-vacuum system (Speedvac) at medium

drying rate for 2 hrs and reconstitution of residues was achieved in water + 0.1 % TFA. 10 μ L injections were finally performed in the LC/MS system. Microsomal stability was calculated upon area ratio of parent compounds at different times.

The LC/MS system consisted of an Orbitrap Exactive instrument (Thermo) equipped with an electrospray ionization source used in positive mode ($M+H^+$). The apparatus was managed with Xcalibur software. Tune parameters were set as: Sheet gas flow rate at 70 L/min, Aux gas flow rate at 20 L/min, spray voltage at 3.00 kV, capillary temperature at 275°C, capillary voltage at 95 V, tube lens voltage at 165 V and skimmer voltage at 36 V. Tray temperature was fixed at 4 °C and oven at 30 °C. The analytical column was a C18 Hypersil Gold Thermo 50 x 2 mm, 1.9 μ m (Thermo). The mobile phase consisted of water + 0.05 % TFA (A) and acetonitrile + 0.05 % TFA (B). The linear gradient elution program was as follows: 0-100 % of B over 3.5 min, followed by an isocratic hold at 100% B for 1 min and 2 min of reequilibration with 100 % A for a total run of 6 min at a flow rate of 400 μ L/min. Due to the basicity of polyamines, good sensitivity was achieved using TFA in the mobile phase.

Drug treatment. For the drug treatment, SY5Y-APP^{695WT} cells were maintained in 75 cm² culture flasks (Falcon) until they reached 80% confluency. The cells were recovered with Trypsin-EDTA, split and plated on 12-well plates (Falcon), 24 h before drug exposure. Preceding the addition of the drugs, cultures were quickly rinsed once with warm (37°C) phosphate-buffered saline (PBS) solution and then exposed to drugs at the indicated concentrations for 24 h. Drugs from a 10 mM stock solution in water were diluted at the desired final concentrations in supplemented DMEM without antibiotic. After 24, 48, or 72 h, the conditioned-cell medium was collected in polypropylene tubes (Eppendorf) and directly frozen at -80°C while awaiting the eventual measurement of its A β peptide content. The drugs used were as follows: the lysosomotropic and autophagic flux inhibitor CQ (Sigma-Aldrich), the vacuolar type H⁺ ATPase inhibitor Baf (Merck Millipore), the γ -secretase inhibitors L685 and Compound E (Enzo Life Sciences), the γ -secretase inhibitor XVI/DAPM (Merck Millipore), DAPT (Sigma-Aldrich). Treated SY5Y-APP^{695WT} cells were rinsed once with warm PBS. The PBS was discarded and 100 μ L of warm (60°C) LDS-lysis buffer (Invitrogen) with protease inhibitors (Complete Mini EDTA-Free, Roche Molecular Biochemicals) was added. Cells were scraped with a rubber policeman, the lysate was recovered and rapidly sonicated before heat treatment for 10 min at 100°C. Protein concentration was

determined using the Pierce BCA Protein Assay, Reducing Agent Compatible (RAC) (Thermoscientific) and samples were kept at -80°C until used.

Cytotoxicity. Cytotoxicity was measured using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) tests. SY5Y-APP^{695WT} cells were plated in 96-wells plate at 3.10⁴ cells per well and allowed to attach for 24 h. Cells were then incubated with 100 µL of DMEM medium with 10% SVF containing (or not) the defined concentration of drugs. Cytotoxicity was determined by using the colorimetric MTS assay (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay-MTS Promega) according to the manufacturer's instructions. Absorbance was read at 490 nm.

In vitro assay for γ -secretase. *Three* 75 cm² flasks of SY5Y-APP^{695WT} cells were rinsed once with PBS at 37°C before the addition of 1 mL of hypotonic MOPS buffer [10 mM MOPS (Sigma-Aldrich), 10 mM KCl (Merck)]. Cells were scraped with a rubber policeman and lysed using a glass Potter homogenizer. Cell homogenates were spun at 1000 g at 4°C for 15 min and the protein concentration in post-nuclear supernatant was determined with a BCA protein concentration assay kit (BioRad) according to the manufacturer's instructions. Each condition was carried out in triplicate and the whole assay was repeated independently three times. Post-nuclear supernatant was fractionated in aliquots containing a total of 1 mg of protein and then centrifuged at 16,000×g at 4°C for 40 min. Supernatants were discarded and the pellets were re-suspended in 100 µL of γ -secretase assay buffer [Sodium Citrate 150 mM (Sigma-Aldrich) and Complete mini EDTA-Free Protease inhibitor (Roche)]. Drugs were added as follows: L685 (100 nM), DAPT (200 nM), DAPM (200 nM), CpdE (200 nM), Baf (100 nM), CQ (5 µM) and **RPEL** or **MAG** at 3, 5 and 10 µM. For the control reaction in which the γ -secretase is inhibited, the homogenates were incubated at 4°C whereas the γ -secretase reaction was carried out at 37°C for 6 h. Homogenates were placed on ice and 25 µL of 2x SDS-PAGE loading buffer (20 mM Tris-HCl pH 6.8, 20 mM DTT, 5% SDS and 20% glycerol) was added to 50 µL of the homogenates which were boiled for 10 min at 100°C.

Primary neuronal cultures and drug treatment. Primary neuron cultures were realised from the dissection of foetuses' forebrains obtained from C57BL6 wild-type female mice that were sacrificed at 18,5 days of gestation

as described previously (Domise, Didier et al. (2016)). **RPEL** treatments at 5 or 10 μM were realized directly in the cultured media for 24 hours at div 17.

Study approval. All *in vivo* protocols were approved by the local ethics committee (n°342012, CEEA).

Animals treatment. 3-month-old WT C57Bl/6J mice were purchased from Charles Rivers Laboratories (France) and were allowed to acclimatize to the animal facility for at least one week before any treatment. Thy-Tau22 or APPxPS1 transgenic colonies (C57Bl/6J genetic background) were obtained by crossing heterozygous males with C57Bl/6J WT females. All animals were housed in a pathogen-free facility at 5 to 6 animals per cage (Techniplast Cages 1284L), with ad libitum access to food and water in a 12/12-hour light-dark cycle and maintained under a constant temperature of 22°C.

For treatment, animals were randomly distributed and **RPEL** was provided in the drinking water at a final concentration of 0.5 and 1 mg/kg, ie 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for drinking solutions taking into account an average weight of 25g/mouse drinking 4 mL/day. Drinking bottles were changed once per week as aqueous solutions of **RPEL** were stable during more than one week, and the volume consumed was measured throughout the treatment period. Food consumption and body weight were also assessed. In WT animals, a pilot study of drug treatment was performed for one month to establish the innocuousness of **RPEL** treatment, based on physiological, social and behavioral assessments. Thy-Tau22 or APPxPS1 males were treated for 4 months, starting at 3 months of age.

Spatial memory assessment using the Y-maze and Morris water maze. Before any behavioral test, exploratory behavior and locomotion were evaluated in treated and untreated animals in an Open field (OF) 25 cm x 25 cm arena. Four acquisitions in 4 joined arenas were performed simultaneously. Each mouse was placed in the arena and allowed to explore for at least 5 min. Parameters including distance, speed and velocity were acquired by video recording using EthoVision video-tracking equipment and software (Noldus Information Technology, Paris, France) in a dedicated room. Anxiety, which could interfere with the memory test, was evaluated using the elevated plus maze (EPM). Mice were placed in the center of a plus-shaped maze consisting of two 10-cm-wide open arms and two enclosed arms elevated to 50 cm from the floor. Locomotion, distance, speed and

velocity were measured, as well as the number of entries into each arm, time spent in open versus closed arms, percentage of open arm entries and time spent in the open arms during a 5 min test.

Y-maze. Short-term memory was tested on a Y-maze. The Y-maze consists of three enclosed arms surrounded by spatial clues. One arm was closed off during the learning phase. Each mouse was randomly positioned in the center or in one of the two open arms. Mice were allowed to explore the maze for at least 5 min. During 2 min of retention time, the closed arm was opened and the mouse was re-placed in the starting arm. The previously closed arm was named the "new arm" and the third arm was named the "other arm". Parameters - total distance travelled, velocity, alternation between the arms, entries into the new, starting or other arm - were measured over 5 minutes. The short-term memory test was considered successful when the proportion of entries into the new arm was significantly higher than into the other two.

Morris Water Maze. Spatial learning and memory abilities were assessed in a standard hidden-platform acquisition-and-retention version of the Morris water maze task (Van der Jeugd, Ahmed et al. (2011)). A 90-cm circular pool was filled with water opacified with nontoxic white paint and kept at 21°C. A 10-cm round rescue platform was hidden 1 cm beneath the surface of the water at a fixed position. Four positions around the edge of the tank were arbitrarily designated as the four cardinal points (North, East, West and South) in order to divide the pool into four quadrants. The "target" quadrant (T) contained the rescue platform, and was surrounded by the two "adjacent" quadrants (Right: R; Left: L) and an "opposite" quadrant (O). In the acquisition trial, each mouse was given four swimming trials per day with at least 10 min of inter trial interval, for four consecutive training days. The start position was pseudo-randomized across trials. Mice that failed to find the hidden platform within 2 min were manually positioned on the platform. They were allowed to remain on it for 15 s before being put back into their cages. The time required to find the hidden rescue platform (escape latency) was used as a spatial learning index and was recorded using the Ethovision XT video tracking system (Noldus France). Swimming speed and total distance were also measured. The hidden platform was removed 72 h after the acquisition phase, and spatial memory was evaluated in a 90 s probe trial. The proportion of time spent in the target quadrant vs. the other quadrants (R, L and O) was considered as a spatial memory index.

Mouse brain samples. After behavioral assessment, blood was collected in 1.5 mL polypropylene tubes (Eppendorf, France) and mice were sacrificed by cervical dislocation to avoid any modifications due to anesthesia (Le Freche, Brouillette et al. (2012)). Hippocampi and cortices were dissected and snap-frozen in 1.5 mL tubes (Eppendorf). Tissue was homogenized in Tris-HCl buffer (10 mM pH 7.4) containing 320 mM sucrose plus protease inhibitors (Complete mini EDTA-free, Roche) and sonicated and spun at 12,000×g for 10 min at 4°C. The supernatant was recovered; protein concentration was measured with the BCA Protein quantification assay kit (Pierce) according to the manufacturer's instruction. The supernatant was further processed for biochemical analyses or stored at -80°C. The same lysis buffer was used for 1D or 2D gels. A solution containing 7 M urea, 2 M thiourea and 2% SDS was added to equal amounts protein in Tris buffer, and sonicated at 60 Hz for 30 pulses.

Mouse brain extraction. 50 mg of brain were defrosted in Eppendorf tubes purchased by GE Healthcare (Grinding Kit). 500 µL of HCl 1 % were added and the mixture was crushed until obtaining a homogenate. The appropriate quantity of internal standard was added. The Eppendorf tubes were centrifuged at 14 000 tr/min for 10 min at 4°C. 450 µL of the supernatant were placed on polypropylene tubes and 4.5 mL of acetonitrile at -20°C were added. Tubes were stirred for 30s and placed 1 h at -20°C for proteins precipitation. The tubes were centrifuged for 10 min at 4°C at 4 000 tr/min and the supernatant was evaporated under N₂ at 50°C. The residue was dissolved in acetonitrile and evaporated once again. The final residue was dissolved in 200 µL of methanol, filtrated and placed in polypropylene vials for analysis.

Mouse plasma extraction. 50 µL of plasma were homogenised in Eppendorf tubes purchased by GE Healthcare (Grinding Kit). 25 µL of internal standard (10nM in cooled methanol) and 225 µL of cooled methanol with 1% formic acid were added. The mixture was vortexed for 10 s three times then cooled to -20°C for 20 minutes. The tubes were centrifuged for 10 min at 4°C at 10 000 g and the supernatant was evaporated under N₂. The final residue was dissolved in 50 µL of methanol and placed in polypropylene vials for analysis

SDS-PAGE and western blotting. To analyze the carboxy-terminal product of APP metabolism, equal quantities of proteins (20 µg per lane) were loaded onto a 16.5% Tris-Tricine polyacrylamide Criterion XT gel using Criterion XT Tris-Tricine Buffer (Bio-Rad). The XT Tricine buffer was precooled to 4°C and the electrophoresis tank was placed on ice. Electrophoresis was carried out at 200V for 65 min. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane of 0.2µm pore size (G&E Healthcare) at a constant current intensity of 2.5 mA/cm² using a Criterion liquid transfer unit (Bio-Rad). For the western blotting of other proteins, SDS-PAGE was performed according to the manufacturer's instructions using a Bis-Tris 4-12% gradient acrylamide gel (NuPage® Bis-Tris PreCast 12 wells, Life Technologies). Apparent molecular weights were calibrated using molecular weight markers (Novex and Magic Marks, Life Technologies). Electrophoresis was performed under a continuous tension of 100 V/per gel for 1 h. Proteins were reversibly stained with Ponceau Red to check the quality and efficacy of protein transfer. For western blot analysis, the membranes were blocked in 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20 (v/v) (TBS-T) and 5% (w/v) of skimmed milk (TBS-M) for 30 min and then incubated overnight at 4°C with the primary antibody. The nitrocellulose membrane was rinsed three times for 10 min each in TBS-T with gentle shaking. The membrane was then incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody (peroxidase-labeled goat anti-rabbit IgG (H+L chains), Vector Laboratories). The immunoreactive complexes were visualised using the ECL™ Western Blotting kit and image acquisition was performed with the LAS-3000 Luminescence Image Analyzer (FujiFilm Lifesciences) or by exposure to Amersham Hyperfilm ECL™ (G&E healthcare). Digitized images were processed with ImageJ Software (NIH).

Two-dimensional gel electrophoresis. Two-dimensional gel electrophoresis was performed as recently described (Fernandez-Gomez, Jumeau et al. (2014)). Briefly, cells were rinsed once with PBS and lysed in UTS buffer (7M urea, 2M thiourea, 2% SDS) and sonicated at 60 Hz for 30 pulses. Lysates containing 50 µg of proteins were precipitated with methanol/chloroform, and the pellet dissolved in 2D buffer [urea 7 M, thiourea 2 M, 4% CHAPS, and 0.6% Pharmalytes 3-10 (G&E healthcare)]. Immobilized pH 3–11 gradient strips (Immobiline™ DryStrip of 11 cm; G&E Healthcare) were rehydrated with 200 µL of buffer containing a final amount of 50 µg of protein and isoelectric focusing was achieved with an IPGPhor III apparatus (G&E

Healthcare) according to the manufacturer's instructions. The strips were layered onto a Criterion XT™ Precast 4–12% Bis-Tris Polyacrylamide Gel (Bio-Rad) and run under a constant tension of 100V.

Quantification of secreted A β in cell media and Tau in mouse plasma. Conditioned media were briefly centrifuged at 200g to eliminate cell debris and A β ₄₂ concentration was determined using INNOTEST™ beta-Amyloid (1-42) (Innogenetics, Ghent, Belgium). A β ₄₃, A β ₄₀ and A β ₃₈ concentrations were determined using ELISA kits (IBL, Japan) according to the manufacturer's instructions. For plasma dosage of A β ₄₀ and A β ₄₂, blood was recovered following a tail incision under a red heating lamp in Microvette® CB 300 LH tubes (SARSTEDT, Marney, France). The blood was spun at 4000 rpm for 15 min at 4°C. The plasma was recovered and kept at -20°C. For the dosage of A β ₄₀ and A β ₄₂ peptides, the plasma was diluted 1/5 in ELISA buffer according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). hTau concentrations were measured using the total Tau and phospho-181 hTau Innostest® ELISA kits (Fujirebio Europe) according to the manufacturer's instructions. hTau and phospho-Tau measurements were performed using 25 or 75 μ L of plasma.

Immunofluorescence. SY5Y-APP^{695WT} neuroblastoma cells were plated in cell culture chamber slides (Labtek) and allowed to grow in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum. Treatment with compounds was performed following the same protocol described in the drug treatment paragraph. After 48 h, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PBS) for 15 min at room temperature. Cells were washed 3 times with ice-cold PBS and blocked with PBS supplemented with 1% BSA, then incubated with primary antibodies overnight at 4°C in PBS-BSA, rinsed 3 times with ice-cold PBS and incubated with an FITC or rhodamine-conjugated secondary antibody (Life Technologies). The coverslips were mounted onto slides with Vectashield mounting medium with DAPI (Vector laboratories). Images were acquired with a Zeiss Apotome or Confocal light scanning microscope Zeiss LSM 710. For Apotome image acquisition, the Axio Imager was used with an optical plan-apochromat 63x/1.4 oil M27 at room temperature. For confocal, images were acquired with the same optic at room temperature and a camera PMT 32 channels (photomultiplier) with the acquisition software ZEN 2011. All data were analyzed using Photoshop Element 6 Software (Adobe) without any modification of raw images.

Immunohistochemistry. Animals were sacrificed by cervical dislocation after the completion of behavioral tests. Brains were removed on ice in a cold room. Brain hemispheres (APPxPS1; untreated n = 9 and treated n = 10; Thy-Tau22: untreated n = 6 and treated n = 5) were post-fixed for 7 days in PBS with 4% paraformaldehyde, immersed in PBS with 20% sucrose for 24 hours and finally frozen and stored at -80°C until use. Serial free-floating coronal sections of 40 µm thickness were obtained using a cryostat (Leica Microsystems GmbH, Germany). Amyloid deposits or neurofibrillary tangles were visualized after free-floating immunohistochemistry using the antibodies AT8 (Pierce MN-120, against pS202/T205, 1/200), AT100 (Pierce MN-1060, against pT212/S214, 1/400) and 4G8 (Covance, 1/500, according to the manufacturer instructions), followed by diaminobenzidine labeling. Sections were then mounted on gelatin slides. The labeled surface as a proportion of the entire brain region surface was quantified (Mercator software; Explora Nova) in the hippocampus and cortex by two investigators blind to treatment group, on a minimum of 5 slices per animal separated by 400 µm. A threshold intensity was set and kept constant and the number of pixels, representing labeling density, was determined for all groups of mice.

Experimental design and Statistical analysis. For animal experimentation, males were housed at 5 to 6 animals per cage and randomly distributed for RPEL treatment. The experimental design and number of animals per treatment condition were approved by the local ethics committee (n°342012). For behavioral tests a minimum of 5 and a maximum of 9 animals per conditions were included. A number was attributed to each animals and experiments were made blind without knowing to which experimental condition each animal was belonging. For statistical analysis, behavioral test results were re-organized according to each treatment condition and WT were compared to transgenic animals. For biochemical analyses, 5 animals per conditions were included. Duplicates were made for ELISA and western-blot analyses. A minimum of 5 brain slices per animals were analyzed. Quantification of labelling was averaged for each animal and a minimum of 5 animals per experimental condition were compared. Results were reported as means ± SEM. Differences between mean values were evaluated using the Student's t-test and one way-ANOVA followed by a post hoc Fisher's LSD test, using GraphPad Prism 6 Software. P values <0.05 were considered to indicate a significant difference.

Results

Design of compounds. We previously developed *N,N'*-disubstituted piperazine compounds (MSBD, Figure 1A) for the design of amyloid metabolism modulators as chloroquine (CQ) derivatives (Melnyk, Sergeant et al. (2006), Melnyk, Vingtdeux et al. (2015)). Compound **AZP2006** (**29** in Melnyk, Vingtdeux et al. (2015), *R* = benzimidazole) is currently under development as a potential anti-Alzheimer drug candidate. With the aim of developing a composite drug for the treatment of the symptoms of AD, we substituted the *R* group of these compounds with two well-known AChE inhibitors, tacrine and rivastigmine, to create two constructs, named **RPEL** and **MAG** respectively (Figure 1A) (Melnyk, Sergeant et al. (2006), Melnyk, Vingtdeux et al. (2015)). The rationale for using AChE inhibitors relies on the hypothesis that the substitution of *N,N'*-disubstituted piperazine preserves the activity of our compounds, respect structure-activity relationships of our family of MSBD compounds as well as the AChE inhibition, having in mind that the latter does not occur inside the cell. Chemically more simple dimethyl carbamate moiety was chosen for **MAG** compound. We therefore first verified that **RPEL** and **MAG** could preserve the AChE inhibitory activity of their adducts by docking both molecules with the catalytic pocket of hAChE (Figure 1B) and *in vitro* measurement of the activity. Aromatic part of **RPEL** superimposed perfectly with tacrine and interacts with Trp86 (Figure 1B left). Carbamate part of **MAG** interacts with catalytic triad (Ser203, Glu334 and His447) as rivastigmine (Figure 1B right). Both **RPEL** and **MAG** present their piperazine chain along the gorge and interact with AChE peripheral site (Trp286) as donepezil.

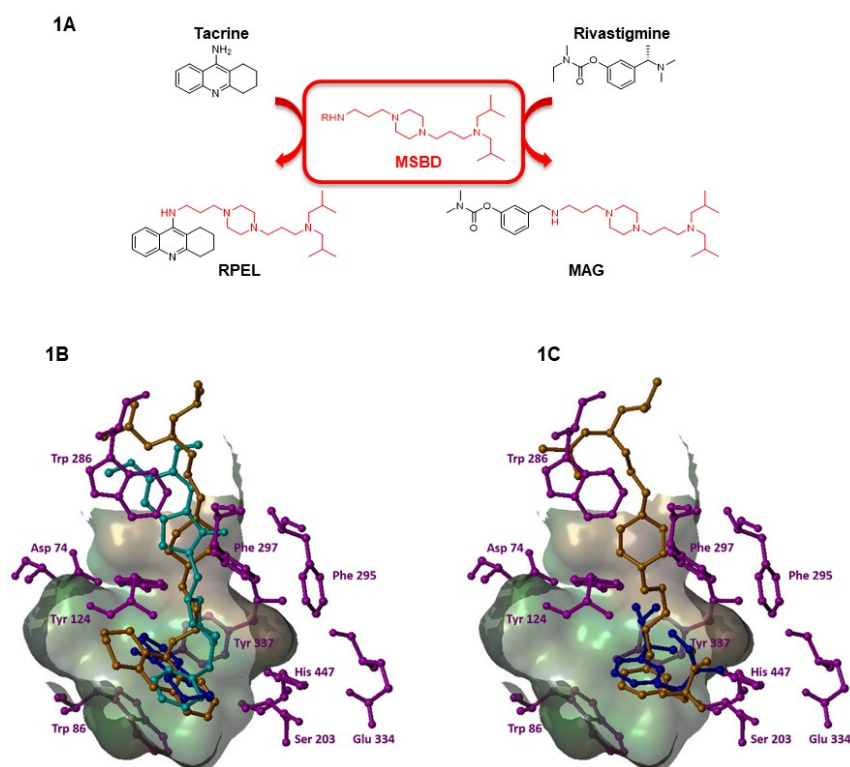


Figure 1: Chemical structures and probable binding modes of RPEL and MAG at human acetylcholinesterase. **A.** Chemical structure of **RPEL** and **MAG**. The topographical formula of **RPEL** and **MAG** results from the linking of tacrine and rivastigmine respectively to the N,N'-disubstituted piperazine pharmacophore (Melnik, Sergeant et al. (2006), Melnyk, Vingtdoux et al. (2015)). **B. Left:** Superposition of the predicted binding mode of **RPEL** (in brown), tacrine (blue) and donepezil (cyan) within the active site of hAChE. **Right:** Superposition of the predicted binding mode of **MAG** (in brown) and rivastigmine (blue) within the active site of hAChE. **RPEL**, **MAG** and structures were docked within the known binding site of hAChE (PDB 4EY7) using GOLD software. Important amino acid residues (in pink) are indicated.

In silico prediction of ADME and BBB permeability of compounds **RPEL** and **MAG** were performed using ACD/ADME Suite 5.0 software. Both compounds were predicted to have good bioavailability (between 30 and 70%) and a sufficient BBB permeability for CNS drug candidates.

***In vitro* evaluation**

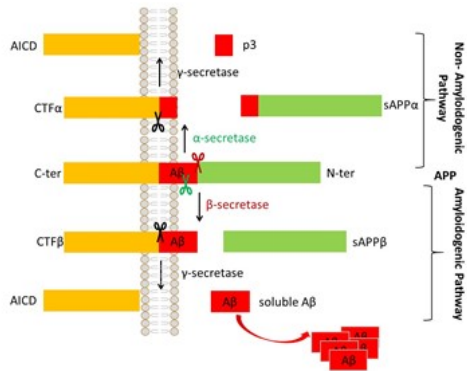
Acetylcholinesterase activity. The hAChE inhibitory activity of **RPEL** and **MAG** was then evaluated *in vitro* using tacrine and rivastigmine as reference compounds (Ellman, Courtney et al. (1961)). **RPEL**, with an IC_{50} of 0.84 nM, was 135 times more potent as an AChE inhibitor than tacrine ($IC_{50} = 115$ nM) while **MAG** was 85 times more inhibitory than rivastigmine (**MAG** $IC_{50} = 398$ nM versus rivastigmine $IC_{50} = 33\ 800$ nM). As a comparison, compounds bearing only a N,N'-disubstituted piperazine chain provide IC_{50} higher than 30 μ M

(compound **2** or **MAF** in supplementary information). Substitution of the two AChE inhibitors with MSBD chain allows a better interaction with AChE and thus a real boost in efficacy.

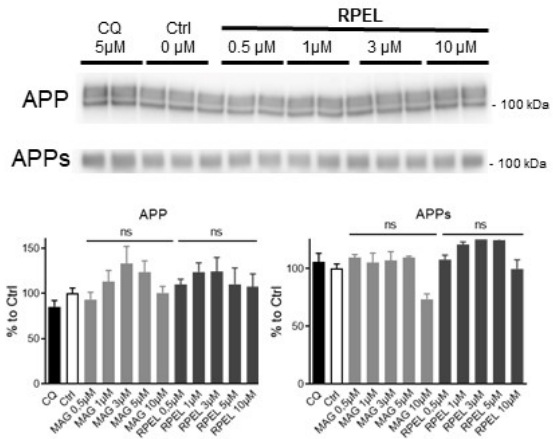
APP metabolites and A β production. APP metabolism is the target of N,N'-disubstituted piperazine compounds, we next investigated the consequences of **RPEL** or **MAG** treatment on APP metabolism. First, we verify that no cytotoxicity could be measured up to 10 μ M (see supplementary Figure S1). The proteolytic processing of APP consists of a sequence of cleavages involving either α - or β -secretase followed by γ -secretase cleavage (De Strooper (2010)). The α -secretase cleaves APP within the A β sequence, producing a soluble fragment (sAPP α) and a carboxy-terminal fragment (CTF α), and precludes A β production (Vingtdeux, Marambaud (2012)). The β -secretase cleaves APP at the first amino acid residue of the A β sequence, producing a soluble fragment (sAPP β) and a transmembrane carboxy-terminal fragment (CTF β), which is further cleaved by γ -secretase to produce A β peptide (Pardossi-Piquard, Checler (2012)) (Schematic representation on Figure 2A). Following **RPEL** treatment of SKNSH-SY5Y APP^{695WT} neuroblastoma cells with concentrations ranging from 0.5 to 10 μ M, the cell content of APP was not different from the control condition (Figure 2B). We next analyzed soluble-APP fragments (APPs) shedded by either α - or β -secretase. The global sAPP content was reduced by 20% at 10 μ M of **RPEL** (Figure 2B) but neither **RPEL** nor **MAG** significantly modified the shedding of APP (Figure 2B). The carboxy-terminal fragments of APP (APP-CTFs), which are transmembrane fragments resulting from α - or β - secretase cleavage, were also analyzed. At the basal level, the APP-CTFs observed were mostly the α CTFs. β CTFs were only observed on exposure to saturating concentrations of the drugs and using a specific antibody detecting the A β epitope 5-15 (Figure 2C). The APP intracytoplasmic fragment (AICD) which is released following the endopeptidase activity of γ -secretase on APP-CTFs was detected and measure following long-time exposure. At 5 μ M of **RPEL**, the amount of APP-CTFs was similar to that observed with 5 μ M of CQ (Figure 2D). Notably, the western blot profiles of APP-CTFs were very similar following CQ and **RPEL** treatment. Moreover, both **RPEL** and **MAG** increased the basal level of AICD up to 8-fold (Figure 2D). Tacrine was also evaluated alone as well as a simple MSBD compound or the mixture of both compounds. The western blot profiles of APP-CTFs were very similar to that of CQ or control and showed lower efficiency when compared to **RPEL** (see supplementary Figure S2). Thus, **RPEL** activity could not be explained by either tacrine or the MSBD alone or the simple addition of both effects.

We next measured the effect of both **RPEL** and **MAG** on A β production. Following β CTF cleavage of APP at the ϵ -site by the endopeptidase activity of γ -secretase, the resulting fragment is processed by the exopeptidase activity of γ -secretase to release the A β peptides (A β ₃₈, A β ₄₀, A β ₄₂ and A β ₄₃ species) (Acx, Chávez-Gutiérrez et al. (2014)). Compounds modulating such proteolytic processing can lead to a preferential activation or repression of one of the two exopeptidase pathways or preferentially repress the release of long forms of A β peptides. Therefore, we quantified the amount of A β ₃₈, A β ₄₀ and A β ₄₂ (Figure 2E). Notably, the amount of A β ₃₈ and A β ₄₂ was significantly reduced to more than three-fold after treatment with 0.5 μ M of **RPEL**. In contrast, at the same **RPEL** concentration, the amount of A β ₄₀ was only reduced by half. A similar trend was obtained with **MAG** although the effect was 10 times less pronounced (Figure 2E). These results suggest that both **RPEL** and **MAG** have a modulatory effect on γ -secretase activity, repressing the A β ₄₂-producing pathway to a greater extent than the A β ₄₀-producing pathway. This phenomenon is also illustrated by a dose-dependent reduction of the A β _{42/38} ratio whereas the A β _{43/40} ratio is almost unchanged (see Supplementary Figure S3). These results were verified by western blot analysis of the release of A β peptides into the cell medium (Figure 2F). Tacrine alone, a simple MSBD compound or the mixture of both compounds were also evaluated. The A β concentrations remained unchanged even at 10 μ M (see Supplementary Figure S2). To further assess whether γ -secretase activity was directly modified by **RPEL** or **MAG**, the *in vitro* cleavage of APP-CTFs into A β and AICD as well as the cleavage of Δ E Notch (Notch lacking the extracellular domain) into the Notch intracellular domain (NICD) were investigated (Figure 2H). The γ -secretase inhibitors DAPT and L685,458 alleviated both AICD and NICD production (Figure 2H) whereas neither **MAG** nor **RPEL** treatment modified the *in vitro* release of AICD (Figure 2F) or NICD (Figure 2H).

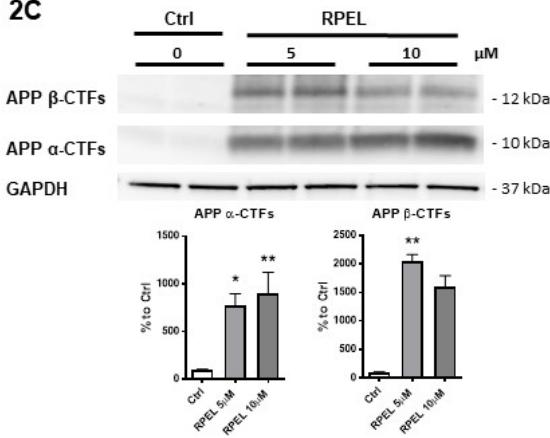
2A



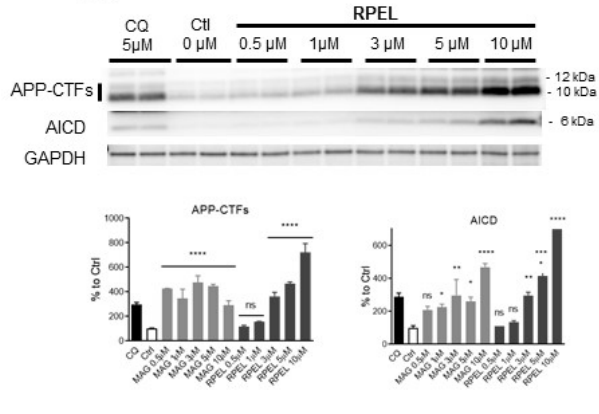
2B



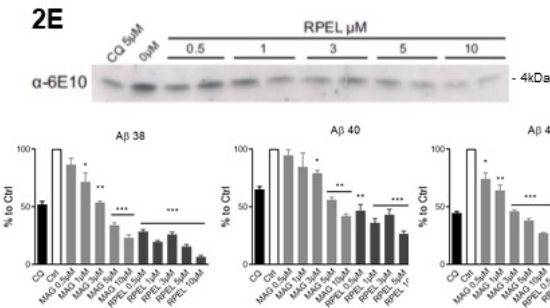
2C



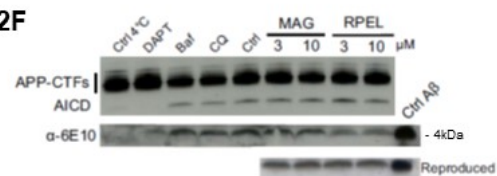
2D



2E



2F



2G



2H

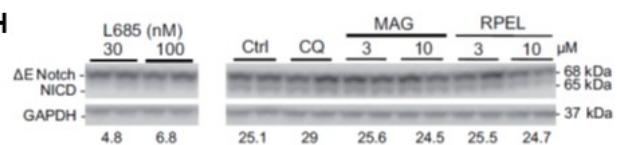


Figure 2: RPEL promotes APP-CTFs and AICD accumulation and reduces Aβ production through a γ-secretase-independent mechanism. A. Schematic representation of APP metabolism B. Full-length APP, but not APPs accumulate in a dose-dependent manner following RPEL and MAG treatment. SKNSH-SY5Y APP695 neuroblastoma cells were treated with 5 μM CQ or concentrations ranging from 0.5 to 10 μM of RPEL for 24 h. Levels of full-length APP were determined following western blotting using an APP-Cter-C17 polyclonal antibody. Levels of total APPs were determined in the medium after western blotting using the 8E5 monoclonal antibody. APP levels are not significantly diminished by RPEL treatment. C. Increase of both α- and β-carboxy-terminal fragments of APP in SY5Y-APP695WT treated with RPEL. SY5Y-APP695WT cells were treated with 5 or 10 μM of RPEL for 24 hrs. Proteins were

resolved by SDS-PAGE and β -CTFs were detected using 6E10 monoclonal antibody raised against the A β epitope 5-15. The APP-C17 antiserum was used to label the α -CTFs. **D.** APP-CTFs and AICD accumulation in presence of **RPEL** or **MAG**. SKNSH-SY5Y APP695 protein lysates were resolved using Tris-Tricine gels. APP-CTFs and AICD were detected with an APP-Cter- C17 antiserum. **E.** **RPEL** reduces the amount of A β peptides released without affecting BACE1 expression or γ -secretase endoprotease activity. A β ₃₈, A β ₄₀, and A β ₄₂ concentrations are diminished in a dose-dependent manner after **RPEL** or **MAG** treatment. SKNSH-SY5Y APP695 cell medium was recovered 24 h post-treatment and A β concentrations were determined by ELISA. Although the calibration curve of the ELISA kits was constructed with the media containing **RPEL** or **MAG**, a western blot of A β released into the medium was performed with the pan-A β 6E10 antibody. **F.** Ex cellulo APP-processing γ -secretase is unmodified by **MAG** and **RPEL**. The release of AICD and A β peptides was evaluated by western blotting following incubation of total membrane extracts of SKNSH-SY5Y APP695 at 37°C for 6 h in the presence or absence of selective γ -secretase inhibitor DAPT (200 nM), Baf (100 nM) or 3 or 10 μ M of **MAG** and **RPEL**. APP-CTFs and AICD were immunolabeled with an APP-Cter-C17 antiserum and A β peptides with the N-terminal 6E10 monoclonal antibody. As a control for A β peptide labeling, 10 ng of A β ₄₂ peptide was also loaded (Ctrl A β lane). The effect of **MAG** and **RPEL** on in vitro A β production is shown twice (Reproduced). **G.** Unaltered BACE1 expression. The total concentration of full-length BACE1 protein was determined by western blotting. **H.** SKNSH-SY5Y APPWT695 cells were transiently transfected with a eukaryotic DeltaE Notch (Notch lacking the extracellular domain)-expressing vector, and after 24 h, cells were treated with the indicated concentration of the γ -secretase inhibitor L685, 5 μ M of CQ or 3 or 10 μ M of either **MAG** or **RPEL**. Protein extracts were prepared 24 h post-treatment. DeltaE Notch and NICD were labeled with an antibody against c-myc, which binds to them. GAPDH staining was used to verify the protein amounts loaded and used to normalize changes in expression. Histograms represent means \pm SEM of three individual experiments and values are expressed as the percentage of control levels. Statistical differences were calculated by One-way ANOVA followed by a post hoc Fisher LSD test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

The expression of the β -secretase BACE1 was then analyzed by western blotting. The increase quantity of β CTFs following treatments was not related to change of BACE1 protein levels; this, also suggests that **RPEL** and **MAG** have no inhibitory effect on lysosome-dependent BACE1 degradation (Figure 2G). These results suggest, overall, that the pharmacological effects of **MAG** and **RPEL** on APP metabolism do not stem from a direct modulation of the proteolytic activities of secretases.

Thus, we showed that mixed compounds upsurge APP metabolites and decrease A β production without a direct effect on secretases. Moreover, the **RPEL** or **MAG** activity is not simply explained by the activity of the separate moieties.

Autophagy modulation. Since APP metabolism and the autophagy-lysosomal degradation pathway are tightly linked (Nixon (2013)) and BACE1 degradation occurs through a lysosome-dependent mechanism (Ye, Cai (2014)), we investigated whether autophagic flux was modified by **RPEL** or **MAG** (Figures 3A and 3B). Our previous study suggested that the *N,N'*-disubstituted piperazine pharmacophore structure may act on lysosomes (Melnik, Vingtdoux et al. (2015)). Indeed, its action is similar to that of chloroquine (CQ), a lysosomotropic compound, and Bafilomycin A1 (Baf), a potent inhibitor of the autophagy (Jiang, Mizushima et al. (2015)), which is a catabolic cellular process that is necessary for maintenance of cell protein homeostasis and possibly also deficient in several neurodegenerative

diseases including AD (Nixon (2013)). Early-, intermediate- and late-stage autophagic flux markers were analyzed under normal growth conditions.

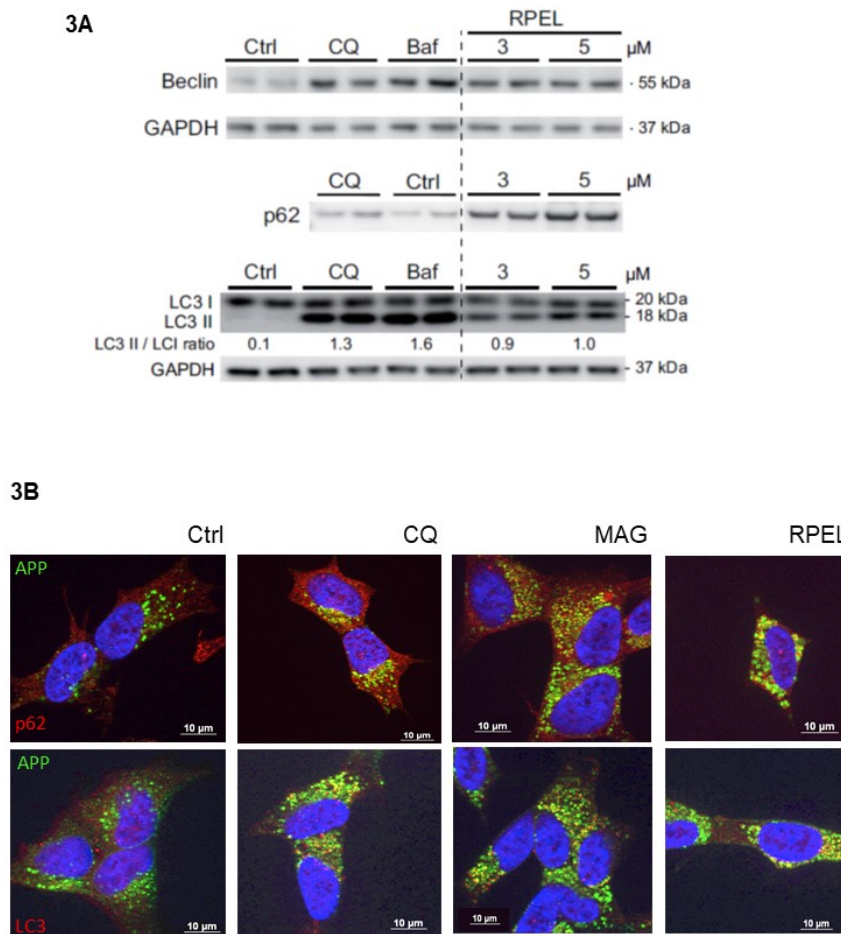


Figure 3: RPEL does not repress autophagy. **A.** Comparison between **RPEL**, chloroquine (CQ) and Bafilomycin A1 (Baf) on autophagic flux. The effect of CQ 5 μM, Baf 100nM and **RPEL** at 3 and 5 μM on protein expression of Beclin 1, p62 and LC3 was evaluated by western blotting. GAPDH labeling was used to normalize the amount of protein loaded. **B.** Representative confocal immunofluorescence labeling for APP (FITC-conjugated secondary antibody in green) and p62 or LC3 (Rhodamine-conjugated secondary antibody in red). Data were collected from a minimum of three individual experiments.

RPEL treatment induced the accumulation of Beclin 1 and p62 (Figure 3A) as well as causing an increase in the number of p62-positive vesicles and the formation of large LC3-positive autophagosomes (Figure 3B). Beclin 1 expression is known to be downregulated in AD (Pickford, Masliah et al. (2008)). In contrast, Beclin 1 overexpression activates autophagy and positively contributes to intra-neuronal aggregate clearance (Spencer, Potkar et al. (2009)). Next, we analyzed the LC3-dependent autophagic pathway. Following the activation of autophagy, LC3-I is coupled to a phosphatidylethanolamine residue, leading to LC3-II, which subsequently associates with the autophagosome membrane. Mature autophagosomes fuse with lysosomes, which leads to the degradation of their contents. Both CQ

and Baf inhibit this late stage and thus the autophagic flux. Following treatment of SY5Y-APP^{WT} cells with CQ and Baf, a robust accumulation LC3-II and numerous LC3-positive autophagosomes were observed (Figures 3A and 3B). In sharp contrast, only a modest accumulation of LC3-positive autophagosomes and a diffuse cytosolic signal were observed, following **RPEL** treatment at 3 and 5 μ M, suggesting that the autophagic flux was not completely repressed by **RPEL** (Figure 3A, data not shown for **MAG**). Thus, we showed that mixed compounds modulate autophagy without complete inhibition.

Tau hyperphosphorylation and proteolysis. Modulation of the autophagy-lysosomal pathway may also impact the metabolism of the microtubule-associated protein Tau. This impaired activity of autophagy-lysosomal degradation likely contributes to AD (Inoue, Rispoli et al. (2012), Polito, Li et al. (2014), Zhang, Song et al. (2014)). We therefore investigated the effects of **RPEL** and **MAG** on Tau metabolism and phosphorylation. SKNSH-SY5Y neuroblastoma cells expressing the human Tau isoform 412 were treated with 5 μ M of either **RPEL** or **MAG**. Tau expression and total phosphorylation were assessed by 1D and 2D gel electrophoresis using phospho-specific and pan-Tau antibodies (Figures 4A and 4B).

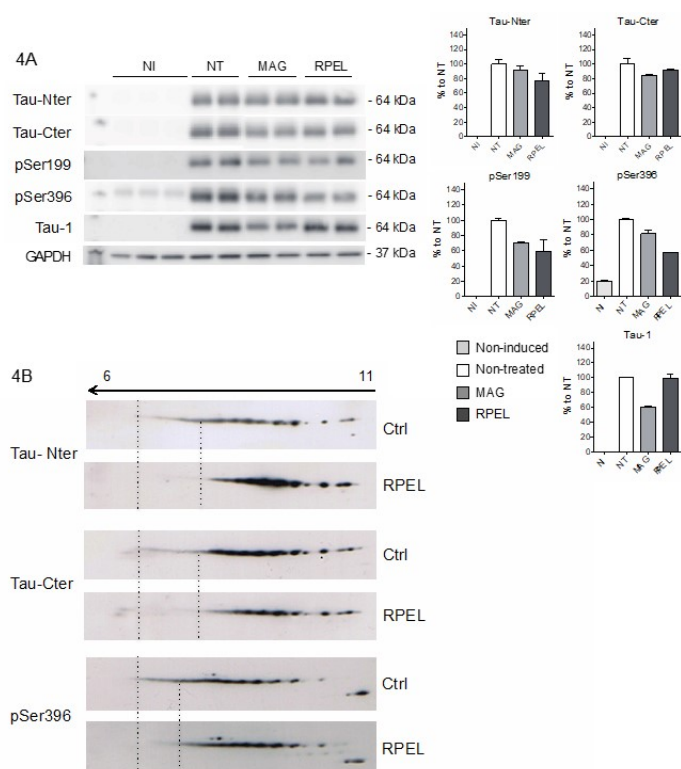


Figure 4: Phosphorylation of Tau protein is diminished in SKNSH-SY5Y Tau⁴¹² expressing cells. A. MAG and RPEL treatments reduce Tau phosphorylation. A SKNSH-SY5Y Tau⁴¹² inducible cell line was induced (NT) or not

(NI) for 24 h with tetracycline and further treated with 10 μ M of **MAG** or **RPEL** for 24 h. 10 μ g of protein lysates were resolved by 1D SDS-PAGE and Tau protein expression was analyzed by western blotting using two antisera against the N-terminus (Tau-Nter) and C-terminus (Tau-Cter) of the protein. Phosphorylation at serine 199 or serine 396 of unphosphorylated Tau (amino acids 199 to 208) were revealed using S199P and S396P antisera or a Tau-1 monoclonal antibody. GAPDH labeling was used to normalize the amount of protein loaded. Histograms are representative of the quantification of western-blots **B**. Tau proteins are less phosphorylated following **RPEL** treatment. Total protein extracts were resolved by 2D-gel electrophoresis and Tau isovariants were revealed with antibodies to phospho-S396, pan-Tau-Nter and pan-Tau-Cter. Immobilized pH gradient strips covering isoelectric points (pI) between 3 and 11 were used, and the pI gradient indicated by the arrow above the first 2D Tau profile. Tau isovariants displayed a pI between 6 and 10.5. For each antibody used, the labeling profiles of Tau under control conditions (Ctrl) and following **RPEL** treatment (10 μ M) were aligned and compared. The vertical dotted lines indicate the most neutral or acidic isovariants of Tau under the two conditions.

Tau expression was reduced following treatment with **MAG**, but was not significantly modified after **RPEL** treatment, although Tau phosphorylation at serine 199 and serine 396 was reduced in **RPEL**-treated cells (Figure 4A). These results were corroborated using 2D-gel electrophoresis. Under control conditions, isovariants of Tau were resolved between pI 6.5 and 10.5. Following treatment with **RPEL**, a reduction in isovariants was observed at neutral pI with the Tau^{396P} phospho-specific antibody as well as with both the N- and C-terminal-directed pan-Tau antibodies (Fig. 3B α -Tau^{Nter} and α -Tau^{Cter}).

RPEL effects on Tau phosphorylation were also investigated in primary neuronal culture (Figure 5). While Tau expression did not appear to be changed following **RPEL** treatment, Tau phosphorylation was significantly reduced at serine 396 and serine 422 in **RPEL**-treated primary neurons. These observations were comforted by 2D-gel electrophoresis where a change in the distribution of Tau polypeptides toward more positively charged isovariants was observed (Figure 5B). Indeed, Tau isovariants are delocalized to the neutral and the basic part of the gel following **RPEL** treatment, suggesting a global reduction of Tau phosphorylation following **RPEL** treatment.

Together, our results suggest that **RPEL** and **MAG** modify the metabolism of both Tau and APP through a modulatory effect on autophagy-lysosomal activity. **RPEL** or **MAG** activity are proper effects unrelated to individual moieites (Tacrine or *N,N'*-disubstituted piperazine) and as *in vitro* results are more potent with **RPEL** than those of **MAG**, *in vivo* experiments were conducted with **RPEL**.

Stability of RPEL compound. Before *in vivo* experiments, chemical and metabolic stabilities of **RPEL** compound were checked. We first verify that aqueous solutions of **RPEL** were stable at room temperature for

more than one week. Then metabolic stability of **RPEL** compound was evaluated using mice liver microsomes.

After one hour at 37°C, at least 40% of **RPEL** remained in the media.

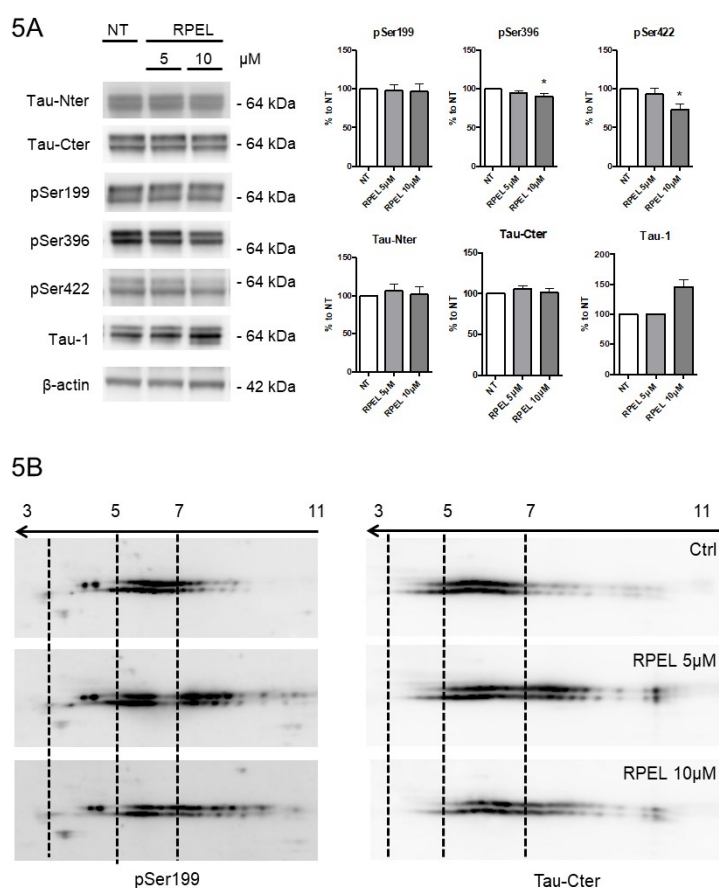


Figure 5: Reduced phosphorylation of Tau protein in primary neuronal culture cells treated with 5 or 10 μM of RPEL. Primary neuronal culture cells at div 17 were treated for 24 hrs with 5 or 10 μM of **RPEL**. Total proteins were recovered and resolved by either 1D or 2D gel electrophoresis. **A.** **RPEL** treatment reduce Tau phosphorylation at serines 396 and 422. Mouse Tau proteins were stained with pan-Tau N-terminal (Nter) and C-terminal (Cter) antibodies as well as with several phospho-dependent Tau antibodies including pSer199, pSer 396, pSer 422 and Tau-1 which respectively recognize Tau phosphorylation at serine 199, 396 and 422 while Tau-1 recognizes Tau at an unphosphorylated epitope 198-205. Molecular weights are indicated. A Student t-test was applied to compare means and statistical differences were considered as significant with a $p < 0.05$. **B.** Accumulation of neutral and basic isovariants of Tau in **RPEL** treated primary neuronal culture cells. Primary neuronal culture cells were treated at div17 with 5 or 10 μM of **RPEL** for 24 hours. Total proteins were resolved by 2D gel electrophoresis and Tau were stained using the phospho-dependant pSer199 or the pan-Tau-Cter antisera. Isoelectric points are indicated on the arrow at the top of the 2D images. The dotted line indicated the distribution of Tau isovariants in non-treated (Ctrl), and treated conditions.

In vivo evaluation

Safety on wide-type mice. We verify that **RPEL** had no adverse effects after one month of treatment in WT animals (**RPEL** solubilized in drinking water, $n=9$, males). No difference could be measured between treated or not animals on the weight, the assumption of water or the food intake. No abnormal behavior, altered velocity, motility nor anxiety could be noticed. This was also confirmed with the two transgenic mice experiments. No muscular changes could be

observed. We next examined whether the modulatory effect of **RPEL** on Tau and APP metabolism could have beneficial effects *in vivo*.

Thy-Tau transgenic mice model of Tau pathology. Thy-Tau22 (n=9, males) mice were treated with **RPEL** (solubilized in drinking water). The development of hippocampal NFTs in Thy-Tau22 mice is correlated with an impairment of spatial memory (Belarbi, Schindowski et al. (2009), Belarbi, Burnouf et al. (2011), Troquier, Caillierez et al. (2012), Laurent, Burnouf et al. (2016)) making the Thy-Tau22 mouse a good model in which to test the beneficial or detrimental effects of drugs. Mice were treated for four months with 0.5 and 1 mg/kg of **RPEL** (drinking water) without any difference between mice (WT or Thy-Tau22), treated or not, regarding behavior, food and beverage intake or weight evolution. Spatial memory was subsequently assessed using the Morris water maze. Results are shown for the 0.5 mg/kg dose. All groups of animals successfully learned after the 5-day acquisition phase (Figure 6A). In wild-type (WT) animals, independently of the treatment, animals had a significant preference for the target quadrant than for the three other quadrants (right, left and opposite, Figure 6A). Thus, **RPEL** did not impact the cognitive performance of WT animals. Untreated Thy-Tau22 animals had no preference for the target quadrant versus the others, showing a failure to successfully complete the probe trial. In sharp contrast, **RPEL**-treated Thy-Tau22 animals succeeded in completing the probe trial after a retention period of 72 hours following the learning phase, and showed a significant preference for the target quadrant (Figure 6A). The burden of neurofibrillary tangles in the hippocampal CA1 was investigated by immunohistochemistry. As shown in Figure 6B, the average labeled surface measured after AT100 immunolabeling was significantly reduced in **RPEL**-treated animals, whereas no significant difference was observed after AT8 immunolabeling. AT100 recognized a pathological Tau epitope, suggesting that **RPEL** impacts the development of Tau pathology but not necessarily hyperphosphorylated Tau proteins. Notably, increased AT8 labelling is also in relationship to overexpression of the Tau transgene and not solely related to a modified phosphorylation rate at the AT8 site. To further explore this possibility, Tau expression and phosphorylation were investigated by western blotting (Figure 6C). A significant reduction in Tau phosphorylation at sites 396 was observed in Thy-Tau22 **RPEL**-treated animals when compared to untreated mice, whereas other phosphorylation sites were not significantly modified (Figure 6C). More interestingly, a 43 kDa Tau C-terminal catabolite was significantly increased whereas N-terminal catabolites were significantly decreased (Figure 6C).

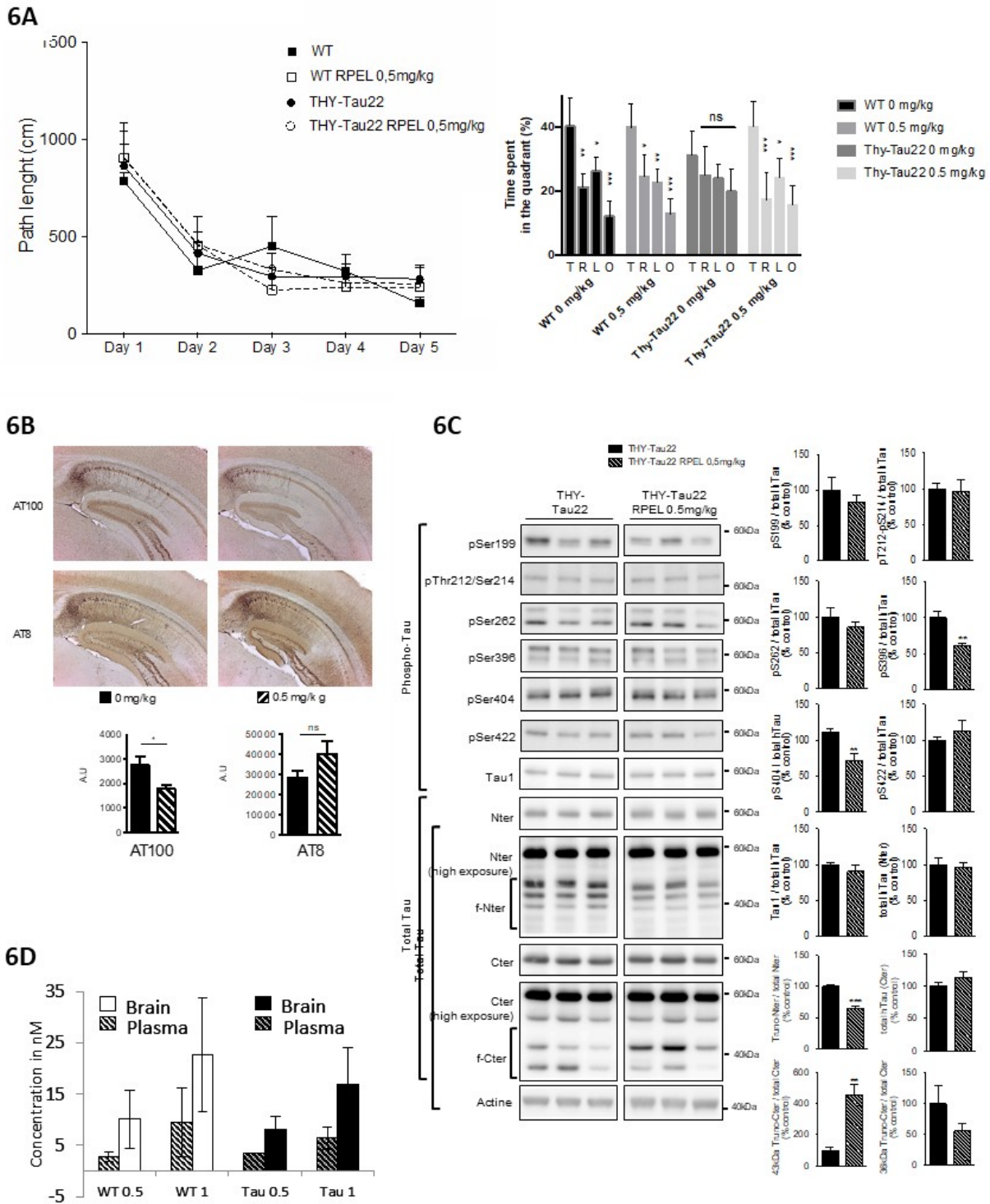


Figure 6: RPEL improves spatial memory, reduces tau pathology and tau phosphorylation and promotes Tau catabolism in Thy-Tau22 mice. A. RPEL treatment of WT (open square, $n = 9$, males) and Thy-Tau22 (open circle, $n = 9$, males) mice (a model of neurofibrillary degeneration) with 0.5 mg/kg of RPEL did not modify the learning curves, expressed as path length (cm), to reach the immersed platform in the Morris Water Maze, compared to untreated animals (WT, black square, $n = 9$, males and Thy-Tau22, black circle, $n = 9$, males). Velocity and time to reach the platform were not modified in treated animals (not shown). After 5 days of training and 72 h of retention, animals were subjected to the probe test, in which the hidden platform is removed and the percentage of time spent in the target quadrant (T, where the platform was located during the learning phase) versus the other quadrants (indicated by R, L, or O for Right, Left or Opposite Quadrant) was analyzed. Histograms represent the means \pm SEM ($n = 9$ animals per condition), *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ for WT H₂O (WT 0 mg/kg) versus WT RPEL 0.5 mg/kg (WT 0.5 mg/kg) or Thy-Tau22 H₂O (Thy-

Tau22 0 mg/kg) versus Thy-Tau22 RPEL 0.5 mg/kg (Thy-Tau22 0.4 mg/kg), using Tukey's Two-way ANOVA multiple comparison test followed. Abbreviations: LSD, least significant difference; SEM, standard error of the mean. **B.** Stereological analysis of neurofibrillary degeneration using phospho-dependent antibodies against pathological epitopes (AT100) or phospho-epitopes (AT8). The total volume (expressed in arbitrary units, A.U.) of labeling calculated from five brain slices in $n = 5$ animals showed significantly reduced AT100 labeling (*: $p < 0.05$, Student's t-test) but no significant modification of AT8 labeling. **C.** Tau phosphorylation was reduced and catabolic products increased in Thy-Tau22 animals treated with the test compounds. Western blotting of protein lysates from Thy-Tau22 mice ($n = 5$) or Thy-Tau22 mice treated with 0.5 mg/kg of **RPEL** ($n = 5$) were used to assess the phosphorylation of Tau at serine 199 (pSer199), serine 262 (pSer262), serine 396 (pSer396), serine 404 (pSer 404) or serine 422 (pSer422), unphosphorylated Tau consisting of residues 198-205 (Tau-1) and overall Tau expression (pan-Tau antibodies against the N-terminus (Nter) and C-terminus (Cter)). Results are represented as histograms of the mean \pm SEM of the ratio of phosphorylated Tau to total Tau. The mean difference was statistically analyzed using a Student's t-test: *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$. The ratio of catabolic fragments of Tau to total Tau were also analyzed (f-Nter or f-Cter). The N-terminal ratio was significantly diminished ($p < 0.001$, $n = 5$) whereas the C-terminal ratio of the 43 kDa catabolic fragment was increased 4-fold ($p < 0.01$, $n = 5$). **D.** RPEL was extracted from brain and plasma and quantified thanks to LC-MS/MS procedure, showing the presence of the compound in both matrix and the accumulation of the compound in brain (WT 0.5 mg/kg $n = 6$, WT 1 mg/kg $n = 9$, Thy-Tau22 0.5 mg/kg $n = 4$, Thy-Tau22 1mg/kg $n = 8$).

These results suggest that treatment with **RPEL** reduces the burden of Tau pathology by reducing the phosphorylation of Tau at selective phospho-sites and by increasing the catabolism of Tau, which are associated with the protection of Thy-Tau22 animals from developing spatial memory impairments. We also verified the presence of **RPEL** in mice plasma and brain. Mass spectrometry experiments using coupled HPLC to Q-Trap instrument was performed using wild type mouse as model. Brain and plasma extraction procedures of the analyte from sacrificed mouse was carried out to quantify **RPEL** and an analytical method was validated with specificity, linearity, fidelity and accuracy criteria. Quantified results confirmed the presence and accumulation of **RPEL** in brain tissue (Figure 6D).

APPxPS1 transgenic mice model of amyloid pathology. Finally, to further assess the modulatory effect of **RPEL** on amyloid pathology in vivo, APPxPS1 double transgenic animals ($n = 9$, males) were treated with 1mg/kg of **RPEL** (solubilized in drinking water). APPxPS1 mice contain human transgenes for both APP bearing the 'Swedish mutation' and presenilin 1 (PS1) containing an L166P mutation, both under the control of the Thy1 promoter. Using the Y-maze, no alteration in short-term memory was observed in untreated or **RPEL**-treated WT animals (Figure 7A). As already observed, treatment with **RPEL** induced no particular modification in behaviour. Short-term spatial memory was impaired in APPxPS1 animals; these mice did not preferentially explore the new arm versus the other arms (Figure 7A). In sharp contrast, in **RPEL**-treated animals, spatial memory was preserved and animals preferentially explored the new arm (Figure 7A).

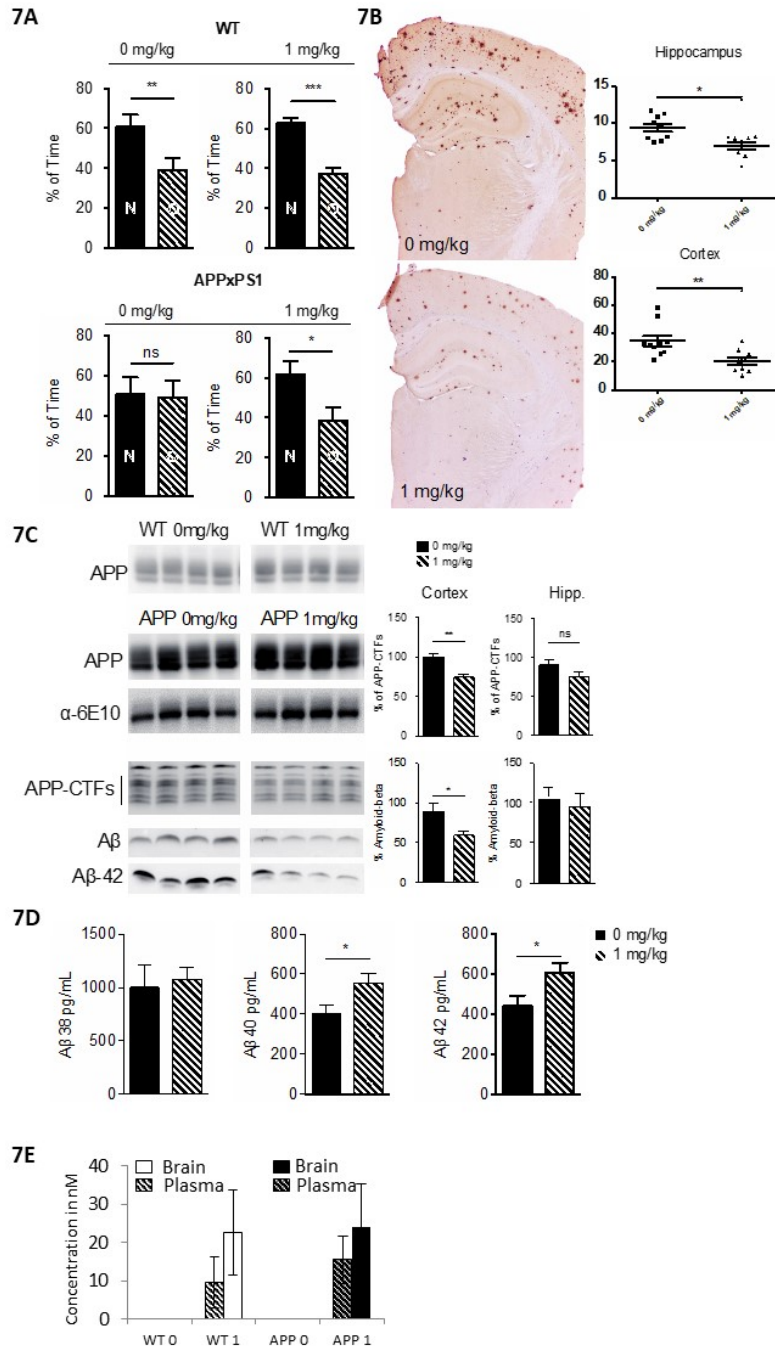


Figure 7: *In vivo* treatment of a APPxPS1 transgenic model of amyloid pathology, with RPEL improves short-term spatial memory, reduces amyloid plaque burden and increases A β ₄₀ and A β ₄₂ peptide concentrations in plasma. A. RPEL improves short-term spatial memory in APPxPS1 mice. Histograms represent the mean \pm SEM (n = 9 animals per condition, males) of the percentage of time spent in the new arm (N) versus the others (O). Statistically significant differences, *: p<0.05, **: p<0.01 and *: p<0.001 was calculated by one-way ANOVA followed by a post hoc Fisher's LSD test. RPEL 1 mg/kg did not improve performance in WT animals but improved short-term spatial memory in APPxPS1 animals (p<0.05, n = 9). B. RPEL treatment reduces amyloid pathology in APPxPS1 mice. Amyloid deposits were labeled using the 4G8 monoclonal antibody. Histological labeling is shown for representative coronal sections of APPxPS1 mice left untreated or treated with 1 mg/kg of RPEL. Amyloid plaque volumes were quantified using the Explora system and means \pm SEM (n = 10 slides per animal) in the hippocampus and the cortex are represented by scatter-plots. The Student's t-test was used to analyze differences per group of animals (untreated APPxPS1: n = 9 animals, treated APPxPS1 animals: n = 10). A two-fold reduction in amyloid plaque number was observed in the cortex in APPxPS1 animals treated with 1 mg/kg of RPEL (**p<0.01). C. APP metabolism was analyzed by western blotting. Full-length APP in WT animals (n = 9 untreated animals and n = 10 animals treated with 1 mg/kg RPEL) was labeled using the APP-CterC17 polyclonal antibody. In APPxPS1 mice, full-length APP expression was analyzed using**

anti-APP-CterC17 and the 6E10 monoclonal antibody, which is specific to the human epitope. APP-CTFs were labeled with the APP-CterC17 antiserum and total human A β or A β_{42} peptides were labeled with the 6E10 and 21F12 monoclonal antibodies, respectively. The results of APP-CTFs and A β quantification are represented as means \pm SEM (n = 9 animals in the untreated and n = 10 animals in the treated group). **RPEL** treatment at 1 mg/kg significantly reduced APP-CTFs (*: p<0.05, Student's t-test) and A β quantities (**: p<0.01, Student's t-test) in the cortex. **D.** Plasma concentrations of A β_{40} and A β_{42} but not A β_{38} were significantly increased in APPxPS1 animals treated with 1 mg/kg of **RPEL** (hatched bars) when compared to the untreated animals (Ctrl group at 0 mg/kg, black bars). Results are reported as means \pm SEM (n = 9 animals per condition). **E.** **RPEL** was extracted from brain and plasma and quantified thanks to LC-MS/MS procedure, showing the presence of the compound in both matrix and the accumulation of the compound in brain (WT 1 mg/kg n = 9, APPxPS1 1mg/kg n = 9).

We next determined if this positive cognitive effect was associated with a modification of the amyloid burden. A stereological analysis of the hippocampus and cortex showed a significant reduction in the number of plaques following **RPEL** treatment (Figure 7B). This reduction in the number of plaques was not associated with a change in APP expression (Figure 7C). In contrast, the amount of APP-CTFs as well as A β peptides was significantly reduced in the cortex (Figure 7C) but not in the hippocampus. This reduction in amyloid plaque burden and A β peptides in brain tissue was associated with an increased plasma concentration of A β_{40} and A β_{42} , whereas the concentration of A β_{38} remained unchanged. Together, our results suggest that **RPEL** treatment reduces the amyloid burden and increases the plasma clearance of A β , with beneficial cognitive effects. These results are validated by the presence of **RPEL** in brain (Figure 7E).

Discussion and Conclusion

AD is a complex disease in which multiple pathophysiological processes are spatially and temporally intermingled. Recent discoveries of genetic risks factors also support this notion since several biological pathways contribute to the development of AD. Multitarget or combined compounds may be more adapted to Alzheimer therapy. To this end, we have developed two molecules that combine AChE inhibitory activity with anti-amyloid and anti-Tau activity. The new potential drug candidates are derived from a novel class of *N,N'*-disubstituted piperazine which were originally developed in order to modify the metabolism of APP by reducing the levels of secreted A β peptides *in vitro* (Melnik, Vingtdoux et al. (2015)). AZP2006, the lead compound of this class is in clinical phase 1. We demonstrate herein that these two molecules effectively reduce amyloid pathology as well as the Tau pathology and moreover, one of them protects both transgenic models of these pathological mechanisms from cognitive impairments. Our results therefore demonstrate that this new multi-effect derivatives can preserve their pharmacological activity while the AChE inhibitors tacrine and rivastigmine

also maintain their AChE inhibitory when covalently added to the backbone of starting *N,N'*-disubstituted piperazines. Multi-effect drug candidates from the literature, derived from tacrine, share common properties with **RPEL**, such as improved AChE inhibition and reduced A β release or aggregation (Chen, Sun et al. (2013), Keri, Quintanova et al. (2013), Munoz-Torrero (2008)). Herein, we show that their modulatory effect on APP metabolism also includes the stabilization of APP catabolites, reminiscent of an effect on endosome/lysosome modulation (Vingtdeux, Hamdane et al. (2007), Vorobyeva, Lee et al. (2014), Tam, Seah et al. (2014)). However, this effect does not impact the global level of BACE1, whose degradation is an endosome-lysosome dependent mechanism (Ye, Cai (2014)) Moreover, our *in vitro* data further suggest that the modulatory effect takes place through a γ -secretase-independent mechanism related to the autophagic-lysosomal compartment, different from the complete blockade of the macro-autophagic flux induced by the proton-pump inhibitor Baf. The increased level of Tau C-terminal catabolites further supports these data. A growing body of evidence suggests that the autophagic-lysosomal compartment and lysosomal proteases, such as asparagine endopeptidase, contribute to neurofibrillary degeneration (Zhang, Song et al. (2014), Nijholt, Nölle et al. (2013), Barsuto-Islas, Grundke-Iqbal et al. (2013)). **RPEL** reduced the phosphorylation of Tau both *in vitro* and *in vivo*, but more surprisingly, it induced the accumulation of C-terminal fragments in the cell model and WT and Thy-Tau22 transgenic mice, suggesting that the Tau phosphorylation is reduced and its catabolism enhanced. Although correlative, these effects on Tau appeared to improve spatial memory in an animal model of Tau pathology. These effects are likely not due only to anti-AChE activity, since other AChE inhibitors such as tacrine, rivastigmine and huperzine do not show modulatory effects on APP metabolism and A β production *in vitro* (data not shown). Lack of cholinergic toxicity or side-effects has to be underlined.

In conclusion, we report for the first time here that a tacrine derivative fused with the chemical backbone of an *N,N'*-disubstituted piperazine family of compounds reduces both amyloid and Tau pathologies *in vitro* and *in vivo*, and protects animal models of AD, with these pathologies, from the deterioration of cognitive function. Further investigations are needed to demonstrate and decipher the mechanism(s) underlying the modulatory effects of our two compounds on the autophagic-lysosomal pathway. In addition, as a member of the *N,N'*-disubstituted piperazine family is currently in clinical phase 1, supporting our observation that our molecules are non-toxic and could potentially find applications in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease or Tauopathies, which all have the NFD process in common.

Acknowledgments

This work was supported by the Inserm, Lille 2 University and CNRS. Grants were obtained from the FRM Nord Pas-de-Calais (France), ANR, Laboratory of Excellence Labex DISTALZ and France Alzheimer. The 300 MHz NMR facilities were funded by the Région Nord Pas-de-Calais (France), the Ministère de la Jeunesse, de l'Education Nationale et de la Recherche (MJENR) and the Fonds Européens de Développement Régional (FEDER). Valérie Vingtdeux is the recipient of a Fondation Plan Alzheimer fellowship. Marion Gay and Caroline Evrard are the recipient of a fellowship from Lille 2 University. The authors thank Dr Paolo Giacobini for proof-reading.

Conflict of Interest: none

Supporting Information

Synthetic protocols for RPEL and MAG compounds together with ^1H and ^{13}C NMR, mass spectra and HPLC purity data of original compounds.

Cytotoxicity of RPEL and MAG compounds.

Cellular evaluation of Tacrine, MAF compound and combination of Tacrine and MAF.

Effect of RPEL and MAG compounds on the secretion of A β peptides.

Corresponding authors:

Pr. Patricia Melnyk

Inserm UMR-S1172 - Team Onco and Neurochemistry, School of Pharmacy, 3 rue du Pr. Laguesse – BP 83 – 59006 Lille cedex – France – Tel 33(0)320964949.

e-mail: patricia.melnyk@univ-lille.fr

Dr. Nicolas Sergeant

Inserm UMR-S1172 - Team Alzheimer & Tauopathies - Bât. Biserte, Univ. de Lille - rue M. Polonowski - 59045 Lille cedex – France – Tel 33(0)320622073

e-mail: nicolas.sergeant@inserm.fr

***Equal contribution**

Authors contribution

David Blum: Design of the study and analysis of data

Luc Buée: Design of the study and wrote the manuscript

Valérie Buée-Scherrer: Analyses of biochemical data

Raphaëlle Caillerez: Histological and stereological study

Pascal Carato: Structure activity relationship study

Mathilde Coevoet: Cell assays

Patrick Dallemagne: AChE inhibition assay

Amandine Descat: LC-MS/MS quantification of the compound

Sabiha Eddarkaoui: Design and performance of the biological assays

Caroline Evrard: Cell assays

Amaury Farce: Molecular modeling

Marion Gay: Compounds synthesis

Malika Hamdane: Cellular model.

Mostafa Kouach: LC-MS/MS quantification of the compound

Paul-Emmanuel Larchanché: Compounds synthesis

Cyril Laurent: Biochemical analyses of animal models

Nicolas Lefur: Compounds design and synthesis

Patricia Melnyk: Co-design the study and writing of the manuscript

Hélène Obriot: Biochemical analyses of animal models

Nicolas Sergeant: Co-design of the study and writing of the manuscript

Valérie Vingtdeux: Development of the cell assay and co-writing of the manuscript

References

Acx, H.; Chávez-Gutiérrez, L.; Serneels, L.; Lismont, S.; Benurwar, M.; Elad, N.; De Strooper, B. Signature β amyloid profiles are produced by different γ -secretase complexes. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 4346-4355.

Barrier, M.; Buée, L.; Bulet, S.; Delacourte, A.; Estrella, C.; Melnyk, P.; Sergeant, N.; Verwaerde, P. Sulfate salts of *N*-(3-(4-(3-(diisobutylamino)propyl)piperazin-1-yl)propyl)-1*H*-benzo[d]imidazol-2-amine, preparation thereof and use of the same. EP 12 306690.4. WO2014/102339.

Barsuto-Islas, G.; Grundke-Iqbal, I.; Tung, Y.C.; Iqbal, K. Activation of asparaginyl endopeptidase leads to Tau hyperphosphorylation in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 17495-17507.

Belarbi, K.; Burnouf, S.; Fernandez-Gomez, F.J.; Laurent, C.; Lestavel, S.; Figeac, M.; Sultan, A.; Troquier, L.; Leboucher, A.; Caillierez, R.; Grosjean, M.E.; Demeyer, D.; Obriot, H.; Brion, I.; Barbot, B.; Galas, M.C.; Staels, B.; Humez, S.; Sergeant, N.; Schraen-Maschke, S.; Muhr-Tailleux, A.; Hamdane, M.; Buée, L.; Blum, D. Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease-like Tau pathology. *Neurobiol. Dis.* **2011**, *43*, 486-494.

Belarbi, K.; Schindowski, K.; Burnouf, S.; Caillierez, R.; Grosjean, M.E.; Demeyer, D.; Hamdane, M.; Sergeant, N.; Blum, D.; Buée, L. Early Tau pathology involving the septo-hippocampal pathway in a Tau transgenic model: relevance to Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2009**, *6*, 152-157.

Bretteville, A.; Ando, K.; Ghestem, A.; Loyens, A.; Bégard, S.; Beauvillain, J.C.; Sergeant, N.; Hamdane, M.; Buée, L. Two-dimensional electrophoresis of tau mutants reveals specific phosphorylation pattern likely linked to early tau conformational changes. *PLoS One* **1999**, *4*, e4843.

Capurro, V.; Busquet, P.; Lopes, J.P.; Bertorelli, R.; Tarozzo, G.; Bolognesi, M.L.; Piomelli, D.; Reggiani, A.; Cavalli, A. Pharmacological characterization of memoquin, a multi-target compound for the treatment of Alzheimer's disease. *PLoS One*. **2013**, *8*(2), e56870.

Chen, Y.; Sun, J.; Peng, S.; Liao, H.; Zhang, Y.; Lehmann, J. Tacrine-flurbiprofen hybrids as multifunctional drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *Arch. Pharm.* **2013**, *346*, 865-871.

Cheung, J.; Gary, E.N.; Shiomi, K.; Rosenberry, T.L. Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone I and territem B show peripheral site flexibility. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 1091-1096.

Cheung, J.; Rudolph, M.J.; Burshteyn, F.; Cassidy, M.S.; Gary, E.N.; Love, J.; Franklin, M.C.; Height, J.J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 10282-10286.

Cummings, J.; Lee, G.; Mortsdorf, T.; Ritter, A.; Zhong, K. Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline: 2017. *Alzheimer's Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **2017**, *3*, 367–384.

De Strooper, B. Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol. Rev.* **2010**, *90*, 465–494.

Domise, M. ; Didier, S. ; Marinangeli, C. ; Zhao, H. ; Chandakkar, P. ; Buée, L. ; Viollet, B. ; Davies, P. ; Marambaud, P.; Vingtdoux, V. AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology in vivo. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26758.

Dubois, B.; Feldman, H.H.; Jacova, C.; Cummings, J.L.; Dekosky, S.T.; Barberger-Gateau, P.; Delacourte, A.; Frisoni, G.; Fox, N.C.; Galasko, D.; Gauthier, S.; Hampel, H.; Jicha, G.A.; Meguro, K.; O'Brien, J.; Pasquier, F.; Robert, P.; Rossor, M.; Salloway, S.; Sarazin, M.; de Souza, L.C.; Stern, Y.; Visser, P.J.; Scheltens, P. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol.* **2010**, *9*, 1118–1127.

Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V. Jr; Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88-90.

Fernandez-Gomez, F.J.; Jumeau, F.; Derisbourg, M.; Burnouf, S.; Tran, H.; Eddarkaoui, S.; Obriot, H.; Dutoit-Lefevre, V.; Deramecourt, V.; Mitchell, V.; Lefranc, D.; Hamdane, M.; Blum, D.; Buée, L.; Buée-Scherrer, V.; Sergeant, N. Consensus brain-derived protein, extraction protocol for the study of human and murine brain proteome using both 2D-DIGE and mini 2DE immunoblotting. *J. Vis. Exp.* **2014**, 86.

Hu, M.K. Synthesis and in-vitro anticancer evaluation of bistacrine congeners. *J. Pharm. Pharmacol.* **2001**, *53*, 83-88.

Inoue, K.; Rispoli, J.; Kaphzan, H.; Klann, E.; Chen, E.I.; Kim, J.; Komatsu, M.; Abeliovich, A. Macroautophagy deficiency mediates age-dependent neurodegeneration through a phospho-tau pathway. *Mol. Neurodegener.* **2012**, *7*, 48-60.

Ittner, L.M.; Ke, Y.D.; Delerue, F.; Bi, M.; Gladbach, A.; van Eersel, J.; Wölfling, H.; Chieng, B.C.; Christie, M.J.; Napier, I.A.; Eckert, A.; Staufenbiel, M.; Hardeman, E.; Götz, J. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* **2010**, *142*, 387–397.

Jiang, P.; Mizushima, N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods* **2015**, *75*, 13-18.

Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C.; Leach, A.R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727–748.

Keri, R.S.; Quintanova, C.; Marques, S.M.; Esteves, A.R.; Cardoso, S.M.; Santos, M.A. Design, synthesis and neuroprotective evaluation of novel tacrine–benzothiazole hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4559–4569.

Laurent, C.; Burnouf, S.; Ferry, B.; Batalha, V.L.; Coelho, J.E.; Baqi, Y.; Malik, E.; Marciniak, E.; Parrot, S.; Van der Jeugd, A.; Faivre, E.; Flaten, V.; Ledent, C.; D'Hooge, R.; Sergeant, N.; Hamdane, M.; Humez, S.; Müller, C.E.; Lopes, L.V.; Buée, L.; Blum, D. A_{2A} adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy. *Mol. Psychiatry* **2016**, *21*(1), 97-107.

Le Freche, H.; Brouillette, J.; Fernandez-Gomez, F.J.; Patin, P.; Caillierez, R.; Zommer, N.; Sergeant, N.; Buée-Scherrer, V.; Lebuffe, G.; Blum, D.; Buée, L. Tau phosphorylation and sevoflurane anesthesia: an association to postoperative cognitive impairment. *Anesthesiology* **2012**, *116*, 779–787.

Mangialasche, F.; Solomon, A.; Winblad, B.; Mecocci, P.; Kivipelto, M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol.* **2010**, *9*, 702-716.

Melnyk, P.; Sergeant, N.; Buée, L.; Delacourte, A. Use of 1,4-bis(3-aminopropyl) piperazine derivatives in therapy. WO 2006 051489.

Melnyk, P.; Vingtdeux, V.; Burllet, S.; Eddarkaoui, S.; Grosjean, M.E.; Larchanché, P.E.; Hochart, G.; Sergheraert, C.; Estrella, C.; Barrier, M.; Poix, V.; Plancq, P.; Lannoo, C.; Hamdane, M.; Delacourte, A.; Verwaerde, P.; Buée, L.; Sergeant, N. Chloroquine and chloroquine related compounds as a model for the design of anti-Alzheimer compounds. *ACS Chem. Neurosci.* **2015**, *6*, 559-569.

Munoz-Torrero, D. Acetylcholinesterase inhibitors as disease-modifying therapies for Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* **2008**, *15*, 2433-2455.

Nijholt, D.A.T.; Nölle, A.; van Haastert, E.S.; Edelijm, H.; Toonen, R.F.; Hoozemans, J.J.M.; Scheper, W. Unfolded protein response activates glycogen synthase kinase-3 via selective lysosomal degradation. *Neurobiol. Aging* **2013**, *34*, 1759-1771.

Nixon, R.A. The role of autophagy in neurodegenerative diseases. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 983-997.

Pardossi-Piquard, R.; Checler, F. The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J. Neurochem.* **2012**, *120* (Suppl 1), 109-24.

Pickford, F.; Masliah, E.; Britschgi, M.; Lucin, K.; Narasimhan, R.; Jaeger, P.A.; Small, S.; Spencer, B.; Rockenstein, E.; Levine, B.; Wyss-Coray, T. The autophagy-related protein beclin1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 2190-2199.

Polito, V.A.; Li, H.; Martini-Stoica, H.; Wang, B.; Yang, L.; Xu, Y.; Swartzlander, D.B.; Palmieri, M.; di Ronza, A.; Lee, V.M.; Sardiello, M.; Ballabio, A.; Zheng, H. Selective clearance of aberrant tau proteins and rescue of neurotoxicity by transcription factor EB. *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 1142–1160.

Pooler, A.M.; Polydoro, M.; Maury, E.A. Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **2015**, *129*, 895-907.

Ryckebusch, A.; Deprez-Poulain, R.; Maes, L.; Debreu-Fontaine, M.-A.; Mouray, E.; Grellier, P.; Sergheraert, C., Synthesis and in Vitro and in Vivo Antimalarial Activity of N1-(7-Chloro-4-quinolyl)-1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine Derivatives. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 542-557.

Sergeant, N.; David, J.P.; Champain, D.; Ghestem, A.; Watez, A.; Delacourte, A. Progressive decrease of amyloid precursor protein carboxy terminal fragments (APP-CTFs), associated with tau pathology stages, in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2002**, *81*, 663–672.

Sergeant, N.; Watez, A.; Delacourte, A. Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively « exon 10 » isoforms. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 1243-1249.

Spencer, B.; Potkar, R.; Trejo, M.; Rockenstein, E.; Patrick, C.; Gindi, R.; Adame, A.; Wyss-Coray, T.; Masliah, E. Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in alpha-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 13578-13588.

Takahashi, M.; Miyata, H.; Kametani, F.; Nonaka, T.; Akiyama, H.; Hisanaga, S.; Hasegawa, M. Extracellular association of APP and tau fibrils induces intracellular aggregate formation of tau. *Acta Neuropathol.* **2015**, *129*, 895–907.

Tam, J.H.; Seah, C.; Pasternak, S.H. The Amyloid Precursor Protein is rapidly transported from the Golgi apparatus to the lysosome and where it is processed into beta-amyloid. *Mol. Brain* **2014**, *7*, 54–71.

Troquier, L.; Caillierez, R.; Burnouf, S.; Fernandez-Gomez, F.J.; Grosjean, M.E.; Zommer, N.; Sergeant, N.; Schraen-Maschke, S.; Blum, D.; Buée, L. Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY Tau22 mouse model: a suitable therapeutic approach. *Curr. Alzheimer Res.* **2012**, *9*, 397–405.

Van der Jeugd, A.; Ahmed, T.; Burnouf, S.; Belarbi, K.; Hamdane, M.; Grosjean, M.E.; Humez, S.; Balschun, D.; Blum, D.; Buée, L.; D'Hooge, R. Hippocampal tauopathy in tau transgenic mice coincides with impaired hippocampus-dependent learning and memory, and attenuated late-phase long-term depression of synaptic transmission. *Neurobiol. Learn. Mem.* **2011**, *95*(3), 296–304.

Vingtdeux, V.; Hamdane, M.; Loyens, A.; Gelé, P.; Drobecq, H.; Bégard, S.; Galas, M.C.; Delacourte, A.; Beauvillain, J.C.; Buée, L.; Sergeant, N. Alkalinizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 18197–18205.

Vingtdeux, V.; Marambaud, P. Identification and biology of α -secretase. *J. Neurochem.* **2012**, *120* (Suppl 1), 34–45.

Vorobyeva, A.G.; Lee, R.; Miller, S.; Longen, C.; Sharoni, M.; Kandelwal, P.J.; Kim, F.J.; Marena, D.R.; Saunders, A.J. Cyclopamine Modulates γ -Secretase-mediated Cleavage of Amyloid Precursor Protein by Altering Its Subcellular Trafficking and Lysosomal Degradation. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 33258–33274.

Ye, X.; Cai, Q. Snapin-Mediated BACE1 Retrograde Transport Is Essential for Its Degradation in Lysosomes and Regulation of APP Processing in Neurons. *Cell Reports* **2014**, *6*, 24–31.

Zhang, Z.; Song, M.; Liu, X.; Kang, S.S.; Kwon, I.S.; Duong, D.M.; Seyfried, N.T.; Hu, W.T.; Liu, Z.; Wang, J.Z.; Cheng, L.; Sun, Y.E.; Yu, S.P.; Levey, A.I.; Ye, K. Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1254–1262.