



Université de Lille
Ecole Doctorale Biologie - Santé de Lille

Etude des mécanismes impliquant le facteur de risque génétique *FERMT2* dans le métabolisme de l'APP et ses conséquences dans le processus physiopathologique de la maladie d'Alzheimer

*Thèse de doctorat présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Sciences de la
Vie et de la Santé, spécialité Neurosciences*

Soutenue publiquement le 12 Novembre 2019 par :

Fanny EYSERT

Devant le jury composé de :

Sylvie CLAEYSEN
Christophe MULLE
Sophie Halliez
Alain BUISSON
Julien CHAPUIS
Philippe AMOUYEL

Rapportrice
Rapporteur
Examinatrice
Examinateur
Directeur de thèse
Directeur de Laboratoire

INSERM - U1167

Facteurs de risques et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement

Institut Pasteur de Lille

A mon père, Jean-François.

Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier le Docteur Sylvie Claeysen et le Docteur Christophe Mulle d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur Sophie Halliez et au Professeur Alain Buisson pour avoir accepté de juger ce travail de thèse. Je remercie également le Docteur Valérie Vingtdeux et le Professeur Alain Buisson d'avoir suivi avec attention mon projet de thèse pendant ces 4 années et de m'avoir conseillée lors des comités de suivi de thèse.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude au Professeur Philippe Amouyel pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire d'abord pour mon stage de Master 2 puis pour ces 4 années de thèse. Merci de m'avoir permis de réaliser ces travaux de thèse dans les meilleures conditions. Je vous remercie également d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assuré de mon plus profond respect.

Je remercie chaleureusement le Docteur Jean-Charles Lambert et le Docteur Julien Chapuis d'avoir encadré mon travail de thèse. Je vous remercie pour votre patience mais aussi pour vos encouragements. Jean-Charles, je vous remercie pour tous vos conseils scientifiques, votre enthousiasme, et votre soutien autant au niveau professionnel que personnel. Julien, je ne te remercierai jamais assez pour tout le temps passé à me conseiller, pour tes explications et ton aide. Je suis ravie d'avoir fait partie de la Team FERMT2. J'ai beaucoup appris grâce à toi. Encore merci pour ta disponibilité et ta sympathie.

Un grand merci au Docteur Devrim Kilinc pour tous tes conseils, ton soutien et pour avoir répondu à toutes mes questions. Je te remercie pour ton aide pendant toutes les heures passées à la reconnaissance des cônes de croissance, à l'explication des process Matlab. Merci aussi pour les petits cours d'anglais, (ta bonne humeur ?!) et ta sympathie.

Merci à Amandine et Anaïs-Camille, partenaires du trio de la Team Alz sans qui ce travail de thèse n'aurait pas pu aboutir. Je vous remercie toutes les deux pour votre aide et votre disponibilité mais surtout pour votre gentillesse et votre bonne humeur. Vous avez été d'un soutien sans failles pendant toutes ces années et travailler à vos côtés a été un véritable plaisir. Qu'est ce qu'on a pu rire ! Anaïs-Camille, tu pourras remercier Charles de ma part aussi pour m'avoir recrutée pour faire la promo du métier de chercheur. Une petite mention spéciale pour Amandine, devenue une véritable amie. Tu m'as fait aimer le Nord (et la bière). Je crois que je peux dire que je suis ~~Montpelliéraine~~ Lilloise maintenant non ? Je te souhaite beaucoup de bonheur avec Victor.

Je remercie également tous les membres de l'équipe 3 avec qui j'ai pu travailler pendant ces 5 années. Tiago, je te remercie sincèrement pour m'avoir encouragée et soutenue pendant tous les moments difficiles, pour tous les conseils que tu m'as donnés dans la rédaction de la thèse et pour avoir répondu à toutes mes questions incessantes. Je te souhaite le meilleur pour la suite avec Patricia. Florie, merci de m'avoir presque tout appris à mes débuts de stage de Master et d'avoir répondu à toutes mes questions.

Un grand merci à Anne-Marie, Pierre, Yoann et Julie pour vos conseils avisés et surtout pour votre gentillesse et votre bienveillance à mon égard.

Un grand merci aussi à Xavier pour ton immense gentillesse, ton sens du partage et tes conseils surtout en matière de potagers. J'ai énormément apprécié faire les ateliers Kid Campus à tes côtés.

Je remercie également Céline, Benjamin, Nicolas, Alexis et Charlotte pour leur expertise et leurs conseils. Merci à Cyril, Cloé, Lindsay, Maxime, Alejandro et Shruti d'avoir croisé ma route et de m'avoir encouragée chacun à votre manière.

Je remercie la petite équipe « iPSC », Marcos, Ana-Raquel et Orthis. Merci pour vos conseils et votre expertise sur la culture des iPSCs mais aussi tous les petits moments partagés ensemble et pour votre sympathie. Enfin, je remercie Erwan et Audrey qui vont prendre la relève dans cette grande aventure qu'est la thèse. Je vous souhaite bonne continuation pour la réalisation de vos projets respectifs et encore merci à Audrey pour tes explications sur le système CRISPR-Cas9.

J'adresse également toute ma gratitude aux membres de l'Unité 1167.

Annie et Henri, un grand merci pour votre amitié. Vous débordez de bonne humeur et de gentillesse. Nos petites escapades et voyages avec Amandine ont été une bouffée d'air frais à vos côtés et vont me manquer ! Annie, j'essayerai de ne pas oublier les petites leçons de libanais. Henri je te souhaite bien du courage pour la finalisation de thèse, je suis sûre que tout se passera pour le mieux.

Je remercie ensuite Marie, Victoriane, Emilie et Marion surtout pour vos délicieux gâteaux à toutes mais aussi pour tous les bons moments que nous avons partagé ensemble.

Je remercie chaleureusement Anne-Sophie pour ta sympathie, ton soutien et surtout tous les conseils professionnels et personnels que tu as pu me donner.

Merci aussi à Nadine pour m'avoir aidée à résoudre tous les petits problèmes informatiques et pour tes conseils.

Je souhaite aussi remercier Florence, Aline, Jean, Camille, Valérie, Maggy, Olivia qui m'ont accueillie au sein du laboratoire et qui assurent un environnement de travail dynamique me permettant de réaliser ces travaux de thèse dans les meilleures conditions.

Je remercie très sincèrement mes amis et ma famille,

Merci Florent et Ludovic, vous avez également joué un rôle important pour mon intégration à Lille. Merci pour toutes les soirées passées ensemble et pour votre amitié.

Un immense merci à Clémentine et Enora. Malgré la distance, vous avez toujours été là pour moi et plus particulièrement dans les moments difficiles. Votre soutien m'a permis d'avancer et je ne vous en remercierai jamais assez. Merci à Enora d'avoir aussi relu ce manuscrit de thèse.

Merci à Léa, Thibault B et Thibault H pour leurs encouragements, leur soutien et leur amitié.

Je remercie chaleureusement toute ma famille ainsi que ma belle famille pour leur soutien tout au long de ma thèse et plus particulièrement pendant ces derniers mois.

Merci à Véronique qui n'a pas cessé de m'encourager et pour la relecture de ce manuscrit.

Merci à Isabelle pour tout ce que tu as fait pour moi, j'attends ton fameux Malzeltov !

Merci à Catherine et François, fournisseurs officiels de la cuvée de thèse sans oublier Louis et Alex pour les parties de cartes endiablées qui m'ont permis de me reposer les weeks où je rentrais à la maison.

Merci à mon frère et ma sœur, Marc et Marie. Partir de la maison alors que vous n'aviez que 6 ans était un déchirement. J'espère que j'ai quand même pu tenir mon rôle de grande sœur « à distance ». A présent vous avez bien grandi et je vous souhaite le meilleur pour la suite.

J'exprime toute ma gratitude à ma mère, Marie-Pascale. Maman, tu es un modèle pour moi. J'admire ta force et ton courage après tout ce que tu as enduré. Je te remercie de m'avoir soutenue tout au long de ces années, même si l'éloignement était très dur. Merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Un dernier merci et pas des moindres à ma moitié, Quentin. Dix années que tu me supportes, dans mes excès de folie ou de déprime. Merci de m'avoir « trainée » jusqu'à Lille il y a 6 ans car sans cela, je ne me serais peut-être jamais engagée dans cette magnifique aventure qu'est la thèse. Je te remercie pour ton soutien, ta patience et ton amour. Merci d'avoir écouté tous mes exposés et surtout pour la relecture du manuscrit de thèse. Tu as été un pilier pour moi pendant toutes ces années et j'ai hâte de commencer une nouvelle aventure à tes côtés.

Résumé

La mise en place d'études d'association pangénomiques (GWAS) a permis une avancée majeure pour l'identification de nouveaux facteurs de susceptibilité génétique de la maladie d'Alzheimer (MA). En revanche, ces analyses réalisées *sans a priori* ne permettent pas de déterminer le rôle de ces gènes dans le processus physiopathologique de la MA. Dans ce contexte, seule la réalisation d'analyses dites « analyses post-GWAS » peut préciser les mécanismes moléculaires impliquant ces gènes. Le laboratoire a donc entrepris d'identifier quels sont, parmi les facteurs génétiques caractérisés par les GWAS, ceux dont la variation d'expression module le métabolisme de l'APP. De plus, notre modèle nous a permis d'étudier l'implication potentielle des micro-ARNs (miRs) dans la dérégulation de ces gènes.

Dans ce contexte, nous avons pu montrer que le miR-4504, qui est surexprimé dans le cerveau des patients atteints de la MA par rapport aux témoins, diminue l'expression du gène *FERMT2*, facteur de susceptibilité génétique de la MA. Nos résultats montrent que cette sous-expression serait dépendante de la présence d'un variant (rs7143400) localisé dans le 3'UTR de *FERMT2* qui entraîne alors une modulation du métabolisme de l'APP et une augmentation de la sécrétion du peptide A β .

Dans ce projet, j'ai pu montrer que les effets de *FERMT2* sur ce métabolisme nécessitent son interaction directe avec l'APP. De plus, l'utilisation du modèle de culture primaire de neurones en chambres microfluidiques m'a permis d'étudier les fonctions neuronales du complexe *FERMT2*/APP. J'ai ainsi pu identifier que cette interaction *FERMT2*/APP participe à la régulation de la croissance axonale et à la synaptogenèse. Finalement, nos analyses de la potentialisation à long terme dans le cerveau de souris, pour lesquelles une sous-expression de *FERMT2* a été induite, montrent une diminution de la plasticité synaptique ; mécanisme pouvant être à l'origine de l'effet délétère de la baisse d'expression de *FERMT2* dans les neurones et dans le processus physiopathologique de la MA.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggère le rôle du facteur de risque *FERMT2*, régulé par la présence du variant fonctionnel rs7143400 et du miR-4504 dans le processus physiopathologique de la MA en conduisant à des altérations synaptiques de façon dépendante de l'expression d'APP. Ce travail permettrait, à terme, de mieux comprendre le processus physiopathologique conduisant à la MA et de caractériser de nouveaux mécanismes impliqués dans le fonctionnement synaptique.

Abstract

The establishment of genome-wide association study (GWAS) constitutes a major advance for the identification of new genetic susceptibility factors of Alzheimer's Disease (AD). In contrast with the target gene approach, these analyses are done *sans a priori* and do not allow us to determine the role of the identified genes in the pathophysiological process of AD. In this context, only performing "post-GWAS analyses" can explain the molecular processes involving these genes. Our laboratory therefore aimed to identify the genetic risk factors identified by GWAS whose expression levels impact the APP metabolism. Moreover, our model allowed us to study the potential involvement of micro-RNAs (miRs) in the dysregulation of the expression of these genes.

In this context, we showed that miR-4504, which is overexpressed in the brains of AD patients compared with controls, decreases the expression of *FERMT2*, a genetic susceptibility factor of AD. Our results show that *FERMT2* under-expression is dependent on the presence of a variant (rs7143400) localized in the 3'UTR of *FERMT2*, which then leads to the modulation of the APP metabolism and the subsequent increase in A β peptide secretion.

In this project, I was able to show that the effects of *FERMT2* on APP metabolism require its direct interaction with APP. In addition, using a model of primary neurons cultured in microfluidic devices enabled me to study neuronal functions of the *FERMT2*/APP complex. I was able to determine that *FERMT2*/APP interaction contributes to the regulation of axonal growth and synaptogenesis. Finally, by analyzing the long-term potentiation in the brains of mice in which *FERMT2* under-expression was induced, we show a decrease in synaptic plasticity – potentially the underlying mechanism of the deleterious effect of decreased *FERMT2* expression in neurons and of the pathophysiological process of AD.

In conclusion, these results suggest that the genetic risk factor *FERMT2*, regulated by the presence of the functional variant rs7143400 and miR-4504, participates in the pathophysiological process of AD via synaptic alterations in an APP-dependent manner. This work would ultimately lead to a better understanding of the pathophysiological process leading to AD and help characterize new mechanisms involved in synaptic functions.

Publications et communications

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications suivantes :

Eysert F, Coulon A, Boscher E, Vreulx AC, Flaig A, Mendes T, Hughes S, Grenier-Boley B, Hanouille X, Demiautte F, Bauer C, Marttinen M, Takalo M, Amouyel P, Desai S, Pike I, Hiltunen M, Checler F, Farinelli M, Delay C, Malmanche N, Hébert S, Dumont J, Kilinc D, Lambert JC, Chapuis J. Alzheimer's genetic risk factor *FERMT2* (*Kindlin-2*) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner. (*Soumis*)

Chapuis J, Flaig A, Grenier-Boley B, **Eysert F**, Pottiez V, Deloison G, Vandeputte A, Ayrat AM, Mendes T, Desai S, Goate AM, Kauwe JSK, Leroux F, Herledan A, Demiautte F, Bauer C, Checler F, Petersen RC, Blennow K, Zetterberg H, Minthon L, Van Deerlin VM, Lee VM, Shaw LM, Trojanowski JQ, Albert M, Moghekar A, O'Brien R, Peskind ER, Malmanche N, Schellenberg GD, Dourlen P, Song OR, Cruchaga C, Amouyel P, Deprez B, Brodin P, Lambert JC ; ADGC, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Genome-wide, high-content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor *FERMT2* as a major modulator of APP metabolism. *Acta Neuropathol.* 2017. 133(6):955-966.

Letronne F, Laumet G, Ayrat AM, Chapuis J, Demiautte F, Laga M, Vandenberghe M, Malmanche N, Leroux F, **Eysert F**, Sottejeau Y, Chami L, Flaig A, Bauer C, Dourlen P, Lesaffre M, Delay C, Huot L, Dumont J, Werkmeister E, Lafont F, Mendes T, Hansmannel F, Dermaut B, Deprez B, Hérard AS, Dhenain M, Souedet N, Pasquier F, Tulasne D, Berr C, Hauw JJ, Lemoine Y, Amouyel P, Mann D, Déprez R, Checler F, Hot D, Delzescaux T, Gevaert K, Lambert JC. ADAM30 downregulates APP-linked defects through cathepsin D activation in Alzheimer's disease. *EBioMedicine.* 2016. 9:278-292.

Ainsi qu'aux communications suivantes :

Eysert F, Kilinc D, Flaig A, Amouyel P, Malmanche N, Lambert JC and Chapuis J. Decreased FERMT2 expression affects neuronal maturation in an APP-dependent manner. LiCEND summer School 2019 "Experimental Models for Neurodegenerative Disorders: From Cells to Model Organisms", Lille, France, July 2-5, 2019

Eysert F, Kilinc D, Flaig A, Amouyel P, Malmanche N, Lambert JC and Chapuis J. Decreased FERMT2 expression affects neuronal maturation in an APP-dependent manner. The 14th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Disease (AD/PD), Lisbon, Portugal, March 26-31, 2019.

Eysert F, Kilinc D, Flaig A, Vreulx AC, Demiautte F, Amouyel P, Malmanche N, Lambert JC and Chapuis J. Impact of FERMT2 on neuron maturation. 11th FENS Forum of Neuroscience, Berlin, Germany, July 7-11, 2018.

Eysert F, Kilinc D, Flaig A, Mendes T, Desai S, Demiautte F, Dourlen P, Ayrat AM, Amouyel P, Malmanche N, Lambert JC and Chapuis J. Impact of FERMT2 on neuron maturation. Longevity, Second International Symposium Research on Healthy Ageing. Lille, France. December 13-14, 2017.

Eysert F, Flaig A, Mendes T, Desai S, Demiautte F, Amouyel P, Dourlen P, Ayrat AM, Malmanche N, Lambert JC and Chapuis J. Impact of FERMT2 on the APP metabolism and Alzheimer's disease process. Longevity, First International Symposium Research on Healthy Ageing. Lille, France. December 8-9, 2016.

Sommaire

Remerciements	3
Résumé	6
Abstract	7
Publications et communications	8
Abbréviations	16
INTRODUCTION	22
1- La maladie d'Alzheimer	24
1.1- Historique et définition	24
1.2- La MA, un problème majeur de santé publique.....	25
1.3- Diagnostic de la MA.....	25
2- Caractéristiques neuropathologiques de la MA.....	26
2.1- Pathologie TAU – Dégénérescences neurofibrillaires.....	26
2.2- Pathologie A β – Plaques amyloïdes	28
3- Relation entre les pathologies A β et Tau	29
4- Les différentes voies du métabolisme de l'APP	30
4.1- Métabolisme de l'APP via l' α -sécrétase.....	31
4.2- Métabolisme de l'APP via la β -sécrétase	31
4.3- Métabolisme de l'APP via le complexe γ -sécrétase.....	32
4.4 - Métabolisme de l'APP via la η -sécrétase	33
4.5 - Métabolisme de l'APP via la δ -sécrétase	33
5- Fonctions physiologiques de l'APP	35
5.1- L'APP participe à la croissance des neurites	35
5.2- L'APP joue un rôle dans la synaptogénèse et la stabilisation des synapses	36
6- Génétique de la MA.....	38

6.1- Formes monogéniques de la MA	39
6.2- Hypothèse de la cascade amyloïde	40
6.3- Formes sans transmission mendélienne classique	41
7- Identification des facteurs de risques génétique pour la MA	42
7.1- L'APOE	42
7.2- Analyses pangénomiques ou GWAS	43
8- Etudes fonctionnelles des gènes identifiés par les GWAS	45
9- Apport des criblages à haut débit dans les analyses fonctionnelles.....	46
9.1- Différents types de criblages en post-GWAS	46
9.2- Etude du métabolisme de l'APP par HCS	47
10- La protéine de FERMT2	48
10.1- FERMT2 appartient à la famille des kindlins	48
10.2- FERMT2, principal co-activateur des intégrines.....	49
10.3- Pathologies associées à FERMT2.....	51
11- Les micro-ARNs, potentiels modulateurs du métabolisme de l'APP	52
11.1- Synthèse des micro-ARNs	53
11.2- Rôles des micro-ARNs dans les fonctions neuronales	54
11.3- Implication des micro-ARNs dans la MA	55
12- Hypothèse de travail	55
13- Limitations et stratégie adoptée	56
MATERIELS ET METHODES.....	58
1- Modèles cellulaires.....	60
1.1- Lignée HEK293 et HEK293 ^{rs7143400-G/T} éditée par CRISPR/Cas9.....	60
1.1.1- Entretien.....	60
1.1.2- Système CRISPR/Cas9.....	60
1.2- Lignée HeLa	61
1.3- Culture Primaire Neuronale de rats nouveaux-nés.....	61

2-	High Content miRNA Screening.....	62
2.1-	Criblages de siRNAs et miRs	62
2.2-	Quantifications et analyses HCS.....	63
3-	Transfections de siRNAs et des miRs.....	63
4-	Validation de l'impact des miRs sur l'expression d'un gène rapporteur	63
5-	Transductions lentivirales	65
6-	Western Blot.....	65
7-	Biotinylation des protéines de surface.....	66
8-	Co-Immunoprécipitation	67
9-	Microfluidiques	67
10-	Vidéo-microscopie.....	69
10.1-	Mesure de la vitesse de la croissance axonale.....	69
10.2-	Mesure du flux rétrograde d'actine et dispersion angulaire	69
11-	Immunofluorescence.....	70
12-	RNA View	71
13-	Proximity Ligation Assay.....	72
14-	Quantification de la densité synaptique	73
15-	Extraction de synapses	74
16-	Injections stéréotaxiques et mesure de la potentialisation à long terme (LTP)	74
	RESULTATS	76
1-	Identification de FERMT2, modulateur du métabolisme de l'APP.....	79
1.1-	Mise en place du modèle HCS	79
1.2-	Criblage HCS de siRNAs modulant le métabolisme de l'APP.....	80
1.3-	Criblage HCS de micro-ARNs modulant le métabolisme de l'APP.....	82
1.4-	Croisement des données HCS.....	82
1.5-	Les miRs prédits pour cibler FERMT2 régulent des fonctions connues de l'APP	83
1.6-	Conclusion intermédiaire	84

2-	Validation de l'impact des miRs via la sous-expression de FERMT2, sur le métabolisme de l'APP	85
2.1-	Caractérisation de l'impact de la sous-expression de FERMT2	85
2.1.1-	Impact de la sous-expression de FERMT2 sur le métabolisme de l'APP	85
2.1.2-	Impact de la sous-expression de FERMT2 sur le recyclage de l'APP à la surface cellulaire.....	87
2.1.3-	Conclusion intermédiaire	89
2.2-	Caractérisation de l'impact des miRs sur l'expression de FERMT2.....	89
2.3-	Les miRs régulent le métabolisme de l'APP via la sous-expression de FERMT2.....	91
2.3.1-	Impact du miR222-3p sur le métabolisme de l'APP.....	92
2.3.2-	Impact du polymorphisme rs7143400 et du miR-4504 sur le métabolisme de l'APP	92
3-	L'interaction FERMT2-APP contrôle le métabolisme de l'APP	94
3.1-	Caractérisation de l'interaction FERMT2-APP.....	94
3.2-	Impact de la perte de l'interaction FERMT2-APP sur le métabolisme de l'APP.....	95
3.3-	Conclusion intermédiaire	96
4-	Conséquences de la sous-expression de FERMT2, dans un contexte neuronal.....	97
4.1-	Le miR-4504 est exprimé dans les neurones et est surexprimé dans le cerveau de patients atteints de la MA	97
4.2-	Impact de la sous-expression de FERMT2 sur le métabolisme de l'APP.....	98
4.3-	Le complexe FERMT2/APP est impliqué dans la croissance axonale.....	99
4.4-	Impact de la sous-expression de FERMT2 au niveau synaptique	102
4.4.1-	FERMT2 est localisé dans les compartiments pré- et post-synaptiques avec l'APP	102
4.4.2-	La sous-expression de FERMT2 conduit à des perturbations de la plasticité synaptique après la maturation neuronale	102
4.4.3-	Conclusion intermédiaire	104
4.4.4-	L'expression de FERMT2 au niveau pré-synaptique est requise pour la formation des synapses	105
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	107
1-	Une régulation de l'expression de FERMT2 favoriserait le développement de la MA	109

1.1-	La sous-expression de FERMT2 induite par le variant rs7143400 est dépendante du miR-4504	109
1.2-	Conséquences de la sous-expression de FERMT2 dans un contexte neuronal	110
1.2.1-	Inhibition de l'interaction FERMT2-APP.....	111
1.2.2-	Accélération de la vitesse de la croissance axonale.....	111
1.2.3-	Diminution de la LTP	113
1.3-	Importance de FERMT2 dans le fonctionnement synaptique	116
2-	Perspectives.....	117
2.1-	Etude de la régulation de l'expression du miR-4504	117
2.2-	Caractérisation de l'interaction FERMT2-APP.....	118
2.3-	Discriminer l'impact de la sous-expression de FERMT2 entre les compartiments pré- et post-synaptiques après la maturation neuronale	118
2.4-	Identifier comment la sous-expression de FERMT2 diminue la LTP et quelles sont les conséquences sur les mécanismes de mémoire et d'apprentissage.....	119
2.5-	Implication pour les stratégies post-GWAS	121
2.5.1-	Etude d'autres gènes impliqués dans le métabolisme de l'APP	121
2.5.2-	Elargissement des modèles de criblage	121
	CONCLUSION	124
	BIBLIOGRAPHIE	128
	Annexe 1.....	147
	Annexe 2.....	186

Abbréviations

A β : peptides beta-amyloïde

ABCA7 : ATP Binding Cassette Subfamily A Member 7

ABS : Actin Binding site

ADAM : A Disintegrin And Metalloprotease

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

AEP : Asparagine EndoPeptidase

AGO : Argonaute

AICD : APP intracellular domain

APLP1 : Amyloïd precursor-like protein 1

APLP2 : Amyloïd precursor-like protein 2

APOE : Apolipoprotein E

APP : Amyloid precursor protein

APPs α/β : Fragment soluble extracellulaire de l'APP

ARN : Acide Ribonucléique

BACE1 : Beta-site APP cleaving enzyme 1

BIN1 : Bridging Integrator-1

CA1 : 1ère aire de la Corne d'Ammon

CaMKII α : Calcium /calmodulin-dependent protein kinase II alpha

Cas9 : CRISPR associated protein 9

CASK : Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase

CD33 : Myeloid cell surface antigen CD33

Cdk5 : Cyclin-dependant kinase 5

CELF1 : CUGBP Elav-Like Family Member 1

CLU : Clusterin

CMV : Constitutive Mammalian Protein

CPN : Cultures Primaires Neuronales

CR1 : Complement C3b/C4b Receptor 1

CRISPR : clustered regularly interspaced short palindromic repeat

CTF- $\alpha/\beta/\eta/\delta$: Fragment C-terminal alpha, beta , eta ou delta de l'APP

CuBD : Copper-binding domain

DIV : Days *in vitro*

DLK : Dual Leucine zipper-bearing Kinase

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM/F-12 : Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

DNase : Désoxyribonucléase

DNF : Dégénérescences neurofibrillaires

DTT : Dithiothréitol

EADB : European Alzheimer DNA Biobank

EC : Extra-cellulaire

ECL : Enhanced Chemiluminescence

eQTL : Expression Quantitative Trait Loci

EOAD : Early-Onset of Alzheimer's disease

ERK1/2 : Extracellular signal-Regulated Kinases 1 & 2

FAD : Familial Alzheimer's Disease

FAK : Focal Adhesion Kinase

fEPSPs : field excitatory postsynaptic potential ou potential de champs post-synaptique excitateurs

FERMT2 : Fermitin family homolog 2

FISH : fluorescence *in situ* hybridization

GFLD : Growth Factor-like domain

GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 β

GTE_x : Genotype-Tissue Expression

GWAS : Genome-Wide Association Study

HBD : Heparin-binding domain

HBSS : Hank's Balanced Salt Solution

HCS : High Content Screening ou criblage à haut contenu

HEK293 : Human embryonic kidney 293 cells

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HTS : High Throughput Screening ou criblage à haut débit

IC : Intra-cellulaire

IDE : Insulin degrading enzyme

IGAP : International Genomics of Alzheimer's Project

iPSC : Induced Pluripotent Stem cells

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

KO : Knock Out

KPI : Kunitz-type pretease inhibitor domain

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LDLR : Low-density lipoprotein receptor

LDS : Lithium Dodecyl Sulfate

LOAD : Late-Onset of Alzheimer's disease

LRP1 : Low density lipoprotein receptor-related protein 1

LTP : Long Term Potentiation ou Potentialisation à long terme

MA : maladie d'Alzheimer

MARK : Microtubule/MAP-Affinity Regulating Kinase

MDC-9 : ADAM-9/Meltrin gamma

MEC : matrice extracellulaire

MEM : Minimum Essential Medium

Mig-2 : Mitogen-inductible gene 2

miR : micro-ARN

MMSE : Mini-Mental State Examination

MOI : Mulltiplicity of Infection

MT5-MMP : membrane-type 5-Matrix Metalloproteinase

NEP : Néprilysine

NLS : Nuclear Localization Signal

NMDA : N-méthyl-D-aspartate

OFP : Orange Fluorescent Protein

p130Cas : Crk associated substrate

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : polymerase chain reaction

PDMS : Polydimethylsiloxane

PET-scan : Tomographie par Emission de Positons

PICALM : Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein

PLA : Proximity Ligation Assay

PSD : post-synaptic density

PSD95 : post-synaptic density protein 95

PSEN1 ou PS1 : Presenilin 1

PSEN2 ou PS2 : Presenilin 2

PTB : phosphotyrosine-binding domain

RFLP : restriction fragment length polymorphism

RIPA : Radioimmunoprecipitation assay

RISC : RNA-induced silencing complex

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SAD : Sporadic Alzheimer's Disease

SD : Syndrome de Down ou Trisomie 21

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

shRNA : short hairpin ribonucleic acid

siRNA : small interfering ribonucleic acid

SNC : Système Nerveux Central

SNPs : Single Nucleotide Polymorphisms

SORL1 : Sortilin Related Receptor 1

Src : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase

SSMD : strictly standardized mean difference

STEP : Striatal-Enriched protein tyrosine Phosphatase

sulfo-NHS-SS-biotine : sulfosuccinimidyl-20(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionate

SVF : Sérum de Veau Foetal

TA : Température Ambiante

TM : Transmembranaire

TNT : Tris-NaCl-Tween

TREM2 - Triggering receptor expressed on myeloid cells 2

UNC-112 : Uncoordinated protein 112

WB : Western Blot

WT : Wild Type

YFP : Yellow Fluorescent Protein

A thick blue vertical bar runs down the left side of the page. A blue arrow points from the bar towards the right, pointing towards the word 'INTRODUCTION'.

INTRODUCTION

1- La maladie d'Alzheimer

1.1- Historique et définition

La Maladie d'Alzheimer (MA) est découverte en 1907 par le psychiatre et neuropathologiste Aloïs Alzheimer alors qu'il s'intéressait au cas d'une patiente, Mme Auguste Deter. Cette patiente souffrait de démence avec des troubles de la mémoire mais également de mutisme, de désorientation et d'hallucinations. En effet, les principaux symptômes de la MA correspondent à une perturbation des fonctions cognitives supérieures et principalement celles de la mémoire qui peuvent provoquer des troubles comportementaux tels que des troubles de l'humeur et du langage. L'évolution est lente et conduit à une dépendance du patient, tout d'abord progressive, puis totale, jusqu'à son décès. L'autopsie du cerveau de la patiente a permis d'identifier deux lésions principales dans le cortex cérébral : (i) les dégénérescences neurofibrillaires et (ii) les plaques séniles (Alzheimer, 1907) (Figure 1). Il a fallu attendre les années 1980 pour que les composants des deux lésions soient identifiés. Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF), intra-neuronales, se caractérisent par l'accumulation de la protéine Tau hyper- et anormalement phosphorylée tandis que les plaques séniles, extraneuronales, se caractérisent par l'agrégation de peptides β -amyloïdes ($A\beta$). Ces deux lésions sont accompagnées d'une perte synaptique progressive et sont associées toutes deux à la mort neuronale. Les cerveaux des patients sont donc atrophiés avec une réduction significative du cortex cérébral, de l'hippocampe (centre de la mémoire), et un élargissement des ventricules (Herrup, 2015) (Figure 2).

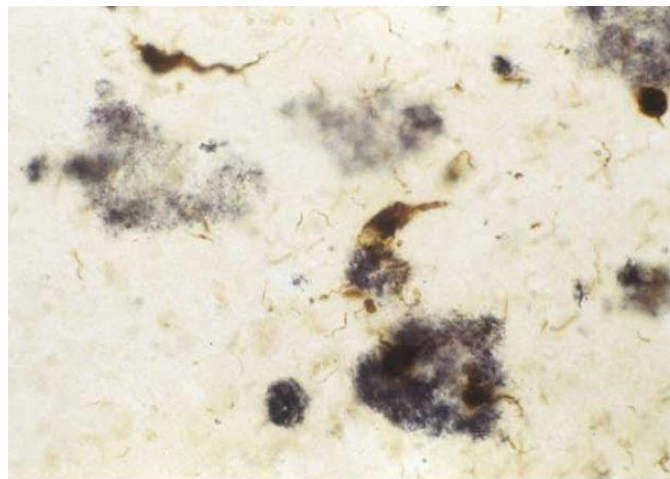


Figure 1 : Microscopie optique montrant des neurones atteints de dégénérescences neurofibrillaires en marron et des plaques séniles en bleu dans le cortex de patients atteints de la MA (Goedert, 2015).

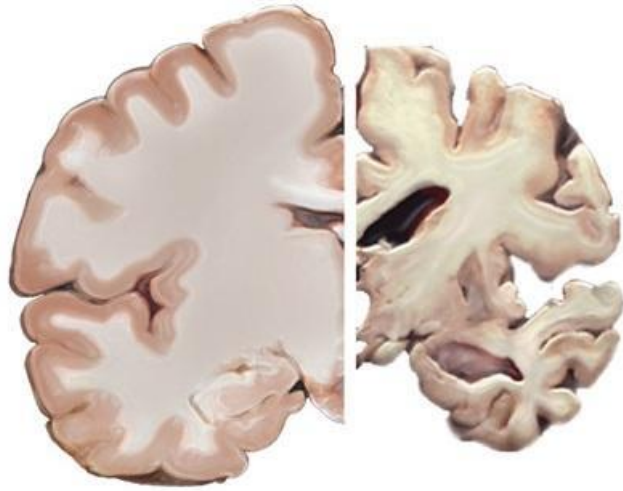


Figure 2 : Coupe coronale d'un cerveau d'un sujet sain à gauche et d'un patient atteint de la MA à droite (source : <https://www.eurostemcell.org>)

1.2- La MA, un problème majeur de santé publique

La MA est donc une pathologie neurodégénérative qui conduit à une mort neuronale progressive et irréversible. Elle touche les personnes âgées et correspond à la forme de démence la plus représentée. En effet, parmi les patients atteints de démences (démences à corps de Lewy, démences vasculaires, démences fronto-temporales, démences mixtes, etc...), 70% des cas souffrent de la MA. Aujourd'hui, plus de 35 millions de personnes sont touchées par cette maladie dans le monde. Avec l'augmentation de l'espérance de vie et le vieillissement de la population, ce chiffre devrait doubler tous les 20 ans pour atteindre 115 millions en 2050 (Nisbet et al., 2015 ; Prince et al., 2013). Cette augmentation est notamment associée à un accroissement du nombre de personnes atteintes de démences dans les pays avec des revenus faibles ou moyens : de 58% des cas aujourd'hui, on passerait à 71% des cas en 2050 (Prince et al., 2013).

1.3- Diagnostic de la MA

Le diagnostic de la MA, souvent tardif, a longtemps été basé sur des tests neuropsychologiques comme le MMSE (Mini-Mental State Examination), le test de Lawton (évaluant partiellement le degré d'autonomie) ou de Grober et Buschke (évaluant la mémoire verbale et la mémoire à court terme) qui permettent d'identifier les différentes formes de démences. Cependant, la MA reste difficile à diagnostiquer du fait des symptômes communs entre ces différents types de démences et la possibilité qu'un patient puisse être touché par deux types de démences à la fois (démences mixtes). Aujourd'hui, de nouvelles techniques d'imageries ont permis d'améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients. L'atrophie du cerveau, des patients atteints de la MA, a été mise en évidence grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM)

tandis que la présence des marqueurs A β (issus des lésions amyloïdes) et Tau (issus des dégénérescences neurofibrillaires) ont été identifiées grâce à la tomographie par émission de positron (PET-scan). Cependant, l'utilisation du PET-scan reste très coûteuse et l'accès à cette technologie est donc limité (Weller & Budson, 2018). Il est également possible de détecter ces marqueurs dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients par ponction lombaire (Jack Jr et al., 2013). En effet, les patients atteints de la MA présentent une diminution du taux d'A β dans le LCR, puisque celui-ci s'accumule dans le cerveau, ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau. Cependant, cette technique moins coûteuse bien que plus invasive, présente une grande variabilité interindividuelle. Par ailleurs, les marqueurs A β et Tau sont également trouvés dans d'autres pathologies (tauopathies, amyloïdose extracellulaires, démences fronto-temporales ou maladie de Creutzfeldt-Jacob), et ces techniques d'imageries ne permettent donc pas d'affirmer avec certitude le diagnostic de la MA. Ainsi, il est indispensable de croiser les résultats issus d'imageries avec les tests neuropsychologiques présentés précédemment pour un diagnostic plus fiable. De plus, la recherche de nouveaux marqueurs plasmatiques, moins coûteux et moins invasifs sont d'un grand intérêt pour la prédiction et le diagnostic précoce de la MA. De nombreuses pistes prometteuses impliquant la détection de l'A β et Tau dans le plasma, sont d'ailleurs à prévoir pour les années à venir (Chen et al., 2019; Nakamura et al., 2018; Teunissen et al., 2018).

2- Caractéristiques neuropathologiques de la MA

2.1- Pathologie TAU – Dégénérescences neurofibrillaires

La dégénérescence neurofibrillaire consiste en l'accumulation intra-neuronale de la protéine Tau qui est hyper et anormalement phosphorylée par les kinases Cdk5 et GSK3 β principalement. Dans le cerveau humain, six isoformes différentes de Tau sont retrouvées. Elles sont codées par le gène *MAPT*, qui, après l'épissage alternatif de l'ARN messager donne différentes protéines Tau de 352 à 441 acides aminés (Goedert, 2015). En temps normal, la protéine Tau est associée aux microtubules (Querfurth & Laferla, 2010) et participe à la régulation du transport axonal ainsi qu'à la plasticité synaptique (Ittner et al., 2010; Mondragón-Rodríguez et al., 2012). Sous sa forme hyper et anormalement phosphorylée, Tau perd son affinité pour les microtubules. Elle est alors redistribuée dans le compartiment somato-dendritique (Ittner et al., 2010) où elle peut s'agréger et entraîner un dysfonctionnement neuronal via l'altération du transport axonal. En 1991, Braak et Braak, ont identifié plusieurs stades de propagation de la pathologie Tau. Le stade « précoce » transentorhinal, comme son nom l'indique, révèle la présence des dégénérescences neurofi-

brillaires dans la région transentorhinale du cortex, mais aussi dans la corne d'Ammon CA1 de l'hippocampe et le locus coeruleus. Pour le stade limbique, plus avancé, des dégénérescences neurofibrillaires fantômes font leur apparition dans les régions transentorhinales et entorhinales. Après la mort du neurone, ces dégénérescences neurofibrillaires fantômes restent, et peuvent être dégradées par les astrocytes. La pathologie se développe également un peu plus au niveau de l'hippocampe et touche très faiblement l'isocortex. Enfin, le dernier stade dit « isocortical » est atteint lorsque l'isocortex est totalement affecté (Braak & Braak, 1991; Jucker & Walker, 2011, 2013) (Figure 3).

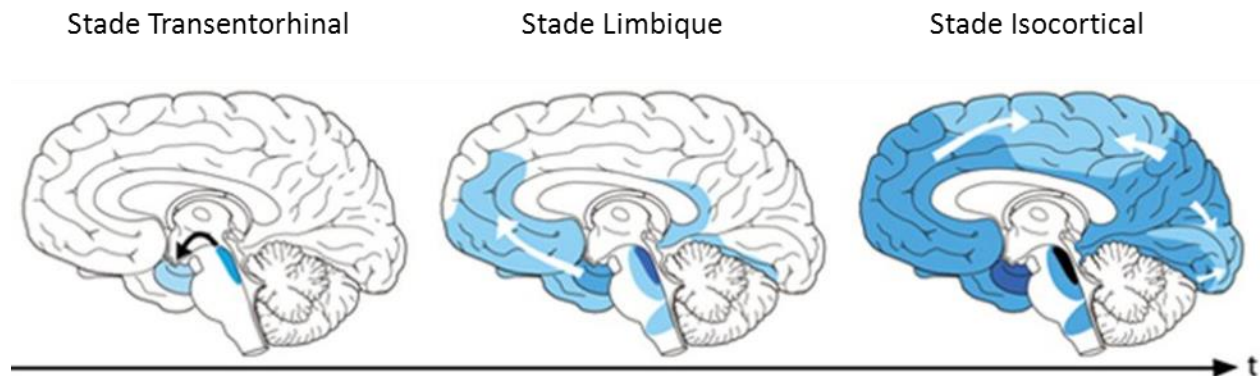


Figure 3 : Schéma représentant la progression des dégénérescences neurofibrillaires dans le cerveau de patients atteints de la MA (Jucker and Walker, 2013).

Plusieurs études ont suggéré que la propagation des dégénérescences neurofibrillaires pouvait survenir selon le mode de propagation des maladies à prions (« proteinacious infectious particles »). Brièvement, les protéines prions (PrP), dans un état mal conformé, ont tendance à s'agréger avec d'autres protéines prions, et imposent leur conformation anormale aux autres protéines. Une réaction en chaîne est alors observée : les protéines mal conformées forcent les protéines « naïves » à adopter une architecture pathogène et à s'agréger. *In fine*, ces agrégations mènent à une neurodégénération et à une gliose. Une étude a montré que des injections intracérébrales d'extraits de cerveaux avec des agrégats de Tau (issus de patients atteints de la MA), conduisent à la formation des lésions Tau chez des souris Wild Type (WT) non-transgéniques. Ces lésions se propagent du site d'injection aux zones du cerveau adjacentes, reliées par les axones des neurones touchés par ces lésions (Lasagna-Reeves et al., 2012) par des processus impliquant le transport neuronal (Jucker & Walker, 2011, 2013). Le rôle des exosomes dans la propagation des dégénérescences neurofibrillaires a également été décrit dans une étude de Levy en 2017 dans le cadre des maladies neurodégénératives. Une des formes phosphorylées de Tau (Thr-181) connue comme biomarqueur de la MA, a été retrouvée dans les exosomes du LCR de patients atteints de la MA. Dans ce

cas, les exosomes provenant de la microglie seraient impliqués. En effet, en réduisant les cellules microgliales, la propagation de Tau est supprimée (Levy, 2017).

2.2- Pathologie A β – Plaques amyloïdes

Les dépôts amyloïdes résultent de l'agrégation extraneuronale de peptides β -amyloïde (A β) issus du clivage de son précurseur l'APP (Amyloid Precursor Protein). Ces dépôts surviennent environ 10 ans avant l'apparition des premiers symptômes cliniques (Jucker & Walker, 2011) et se propagent ensuite. Et, à l'apparition des symptômes, il est souvent déjà trop tard pour la prise en charge du patient. Le cortex cérébral et plus particulièrement l'isocortex sont touchés par l'agrégation des peptides A β . Les premiers stades montrent quelques plaques amyloïdes au niveau des lobes frontaux, temporaux et occipitaux de l'isocortex avant de se propager dans tout l'isocortex. Elles sont également retrouvées dans la matière blanche, située sous le cortex. Enfin, pour le dernier stade, le striatum, le thalamus et l'hypothalamus sont également très touchés par les plaques amyloïdes, tout comme le cortex cérébelleux (Braak & Braak, 1991) (Figure 4).

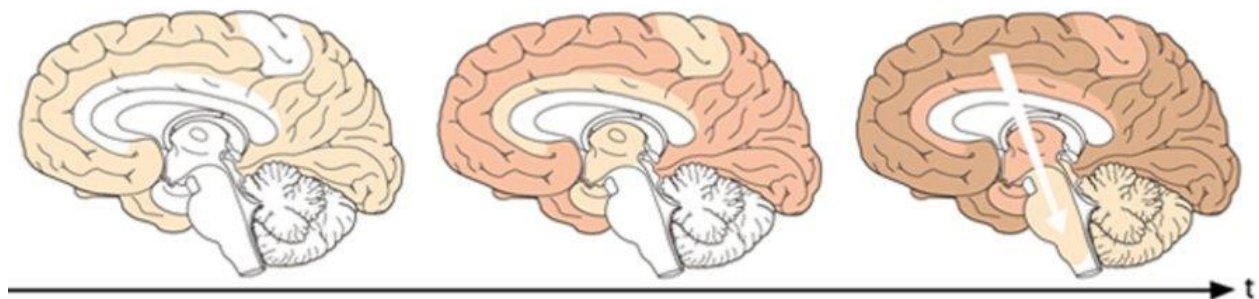


Figure 4 : Schéma représentant la progression des plaques amyloïdes dans le cerveau de patients atteints de la MA (Jucker and Walker, 2013)

Encore une fois, certaines études ont suggéré que la propagation des peptides A β ressemblait à celle des maladies à prions. Tout comme les prions, les peptides A β forment des agrégats de petites tailles, solubles et sensibles aux protéases. Ensuite, ils passent à un état de fibrilles insolubles et résistantes aux protéases (Jucker & Walker, 2013). D'autres études ont encore suggéré le rôle des exosomes dans la propagation des plaques amyloïdes. Les formes totales de l'APP ainsi que ces différents métabolites ont été retrouvés enrichis dans les exosomes (Levy, 2017; Vingtdeux et al., 2007). Même si la sécrétion des exosomes permettant l'excrétion des protéines toxiques de la cellule semble bénéfique, ce phénomène contribue

d'abord au transport de ces protéines toxiques entre les cellules. En effet, les exosomes ne participeraient pas à la production de peptides A β *de novo* mais à leur oligomérisation et leur dispersion (Levy, 2017). L'inhibition de la sécrétion des exosomes chez des souris transgéniques pour la MA réduit les taux d'A β et les plaques amyloïdes dans le cerveau (Dinkins, et al., 2014).

3- Relation entre les pathologies A β et Tau

Les pathologies Tau et A β semblent donc évoluer différemment dans le temps et l'espace lors de la progression de la MA. La pathologie A β contribue à des perturbations synaptiques pendant les stades précoces de la MA alors que les dégénérescences neurofibrillaires sont reliées plus directement à la neurodégénération, conduisant à la démence dans les stades plus tardifs de la maladie (Jack Jr et al., 2013). Cependant, une association entre les deux lésions semble exister pendant les stades précoces et diminue avec la progression de la maladie (Iaccarino et al., 2018). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la toxicité de l'A β dépendante de Tau. Tout d'abord, l'A β peut conduire à l'activation de kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau (1) en créant des pores dans la membrane plasmique, (2) en liant la protéine prion permettant l'activation de Fyn qui phosphoryle à son tour les récepteurs NMDA, ou (3) en liant et activant directement les récepteurs NMDA extra-synaptiques. Dans les trois cas, un influx calcique est induit par la création des pores ou l'activation des récepteurs et conduit à l'activation de kinases telles que MARK. En se détachant des microtubules, Tau interagit et perturbe le cytosquelette d'actine. L'A β conduit également au recrutement de la spastin qui déstabilise les microtubules et conduit à leur perte (Zempel et al., 2013). Les récepteurs NMDA phosphorylés interagissent également avec PSD95 entraînant l'excitotoxicité en réponse à l'A β (Ittner et al., 2010; Nisbet et al., 2015; Spires-Jones & Hyman, 2014).

D'autre part, l'A β participe à la perte synaptique ainsi qu'au rétrécissement des épines dendritiques en (1) se fixant aux récepteurs nicotiques $\alpha 7$ qui conduisent à l'internalisation des récepteurs NMDA à la synapse et en (2) activant la phosphatase STEP qui déphosphoryle Fyn (Nisbet *et al.*, 2015). Par ailleurs, la sous-expression de Tau chez des souris qui sur-expriment l'APP, prévient des déficits cognitifs liés à l'A β . Tau semble donc responsable des conséquences liées au traitement A β (He et al., 2018; Ittner et al., 2010; Zempel et al., 2013). Bien que la progression des deux lésions soit indépendante, il semblerait donc qu'il y ait un effet synergique (Iaccarino et al., 2018; Nisbet et al., 2015). Pour reprendre la métaphore de Bloom et al., « l'A β serait le déclencheur de la MA mais Tau serait la balle », donc l'effecteur de la maladie (Bloom, 2014; Nisbet et al., 2015). Toutefois, ces mécanismes ne permettent pas d'expliquer complètement le lien entre les deux lésions. Une étude plus approfondie de l'A β ainsi que de son précurseur, l'APP, sont donc nécessaires pour permettre une meilleure compréhension de l'origine de la maladie.

4- Les différentes voies du métabolisme de l'APP

Le gène *APP* situé sur le chromosome 21, code pour la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), une glycoprotéine transmembranaire de type 1. L'épissage alternatif mène à la production de trois isoformes différents : APP⁷⁵¹, APP⁷⁷⁰ et APP⁶⁹⁵ correspondant à l'isoforme neuronale. L'APP est ubiquitaire et exprimé dans toutes les régions du cerveau, surtout dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet (Shivers et al., 1988). Au niveau de sa structure, l'APP se compose d'un domaine extracellulaire divisé en un sous-domaine globulaire (E1), un sous-domaine acide, un sous-domaine KPI (Kunitz protease inhibitor), un sous-domaine riche en hélices (E2), un domaine transmembranaire qui contient en partie la séquence du peptide A β et un court domaine intracellulaire ou AICD (Sosa et al., 2017) (Figure 5). Il existe deux protéines homologues de l'APP appelées protéines « APP-like ». L'APLP1 est exprimée seulement dans le système nerveux central (Lorent et al., 1995) tandis que l'APLP2 est ubiquitaire (Lorent et al., 1995 ; Slunts et al., 1994). De par la similarité de leurs structures, les APLPs semblent également partager certains rôles physiologiques avec l'APP (Coulson et al., 2000). Par ailleurs, les APLPs suivent le même métabolisme que l'APP par les différentes sécrétases mais ne conduisent pas en revanche à la production du peptide A β (Slunts et al., 1994; Walsh et al., 2007).

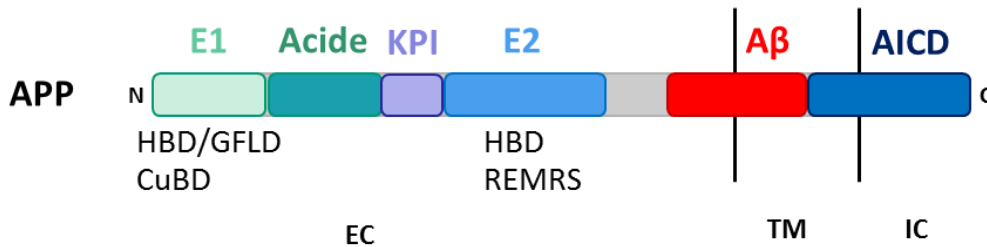


Figure 5 : Représentation schématique de l'APP (adapté de Sosa et al., 2017) EC : domaine extracellulaire, TM : domaine transmembranaire, IC : domaine intracellulaire, HBD : Heparin-binding domain, GFLD : Growth factor-like domain, CuBD : Copper-binding domain, KPI : Kunitz-type protease inhibitor domain, REMRS : séquence des acides aminés.

Après sa synthèse dans le réticulum endoplasmique, l'APP transite par l'appareil de Golgi où il subit plusieurs modifications post-traductionnelles telles que les N- et O- glycosylations, des sialylations, des phosphorylations et des sulfatations sur les tyrosines (Müller & Zheng, 2012), avant de finalement arriver à la membrane plasmique sous sa forme mature. A partir de là, il existe plusieurs voies métaboliques possibles pour l'APP qui font intervenir différentes activités enzymatiques importantes (Figure 6) avant de suivre la voie lysosomale conduisant à sa dégradation.

4.1- Métabolisme de l'APP via l' α -sécrétase

En conditions physiologiques, 90 % de l'APP mature est clivé entre la lysine en position 612 et la leucine en position 613 par l' α -sécrétase, au niveau de la membrane plasmique. Il existe plusieurs α -sécrétases connues telles que les ADAM9, ADAM10, ADAM17 (A Disintegrin And Metalloprotease) ou MDC-9 (Thinakaran & Koo, 2008). ADAM10 est l' α -sécrétase la plus représentée dans le cerveau. Le clivage de l'APP par l' α -sécrétase conduit à la production de deux fragments. L'APP soluble α (APPs α) est sécrété tandis que le fragment CTF- α (C83), resté ancré à la membrane, est clivé par la γ -sécrétase (Figure 6). Plusieurs études ont mis en évidence les propriétés neuroprotectrices de l'APPs α pendant la neurogénèse ainsi que la plasticité synaptique, et donc sur les capacités cognitives (Müller et al., 2017 ; Nhan et al., 2015). En outre, les taux d'APPs α sont diminués chez les patients atteints de la MA (Lannfelt et al., 1995) suggérant qu'il pourrait contribuer aux dysfonctions neuronales pendant la maladie. En revanche, très peu d'études ont été consacrées au fragment CTF- α . Son rôle semble être protecteur puisque le clivage de l'APP par l' α -sécrétase, dans la séquence même de l'A β , diminue la production de peptides amyloïdes (Jäger et al., 2009).

4.2- Métabolisme de l'APP via la β -sécrétase

Dix pourcent de l'APP mature sont, en revanche, clivés par la β -sécrétase suite à son internalisation vers la voie endosome/lysosome. La β -sécrétase ou BACE1 (β -site APP cleaving enzyme 1) est une aspartylprotéase transmembranaire de type 1 située principalement dans le réseau trans-golgien et les endosomes. Elle clive l'APP entre la méthionine en position 596 et l'acide aspartique en position 597 conduisant à la production de deux fragments. L'APP soluble β (APPs β) est sécrété tandis que le fragment CTF- β (C99) est à son tour clivé par la γ -sécrétase (Thinakaran & Koo, 2008) (Figure 6). BACE1 peut également cliver l'APP onze résidus plus loin, sur un site moins favorisé conduisant ainsi à la production d'un APPs β' plus long, et d'un fragment CTF- β' (C89) qui sera clivé également par la γ -sécrétase (Walsh et al., 2007) (Figure 6). Même si l'APPs β possède aussi des propriétés neuroprotectrices, elles sont cependant beaucoup moins importantes par rapport à celles de l'APPs α (Furukawa et al., 1996). En revanche, l'accumulation précoce du fragment CTF- β serait plutôt neurotoxique et jouerait un rôle dans la MA (Bourgeois et al., 2018; Kwart et al., 2019).

4.3- Métabolisme de l'APP via le complexe γ -sécrétase

L'activité γ -sécrétase résulte de la formation d'un complexe de quatre protéines : préséniline (PS), presilin enhancer-2 (Pen-2), anterior pharynx defective (Aph-1) et la nicastrin. Ce complexe est présent dans le réticulum endoplasmique, le Golgi et le réseau trans-golgien mais aussi dans les endosomes et dans la membrane plasmique. La PS est une aspartyl protease qui forme le cœur catalytique du complexe tandis que Pen-2 permet la maturation de PS. L'Aph-1, quant à elle, stabilise le complexe. Il existe deux présénilines différentes, PS1 et PS2 ainsi que deux Aph-1 (Aph-1A et Aph-1B) conduisant ainsi à 4 γ -sécrétases différentes (Goedert, 2015).

Ce complexe γ -sécrétase peut cliver à son tour les différents fragments CTF- α ou CTF- β , décrits précédemment en différents sites, ϵ , ζ et γ (Walsh *et al.*, 2007) (Figure 6). Le fragment CTF- α clivé, conduit à la production d'un peptide AICD ainsi que d'un peptide P3. Cette voie est dite non-amyloïdogène car elle ne conduit pas à la production de peptides amyloïdes. Le peptide AICD est connu pour avoir un rôle de facteur de transcription (Thinakaran and Koo, 2009) dont tous les gènes cibles et/ou potentiels sont répertoriés de manière non exhaustive dans l'article de Bukhari *et al.*, 2017. Les niveaux de fragment AICD produits sont d'ailleurs augmentés dans le cerveau de patients atteints de la MA suggérant son implication dans le processus physiopathologique de la maladie (Ghosal *et al.*, 2009). Le peptide P3 semble également être toxique. Il est notamment retrouvé dans les plaques amyloïdes dans le cerveau de patients atteints du Syndrome de Down (Lalowski *et al.*, 1996) et conduit à l'apoptose des cellules en culture (Wei, 2002).

En revanche, le clivage du fragment CTF- β par la γ -sécrétase conduit à la production du fragment AICD et différentes formes du peptide A β allant de 37 à 43 acides aminés principalement dans le réseau trans-golgien et dans les endosomes. En général, 90% de l'A β sécrété correspond à la forme A β ₁₋₄₀ tandis que l'A β ₁₋₄₂ représente moins de 10%. Les autres peptides A β , plus petits, ne sont que très faiblement représentés (Thinakaran and Koo, 2008). Il existe également une autre proportion de peptides A β , tronqués en N-terminal (A β _{n-40/42} où n peut varier entre 2 et 11). La perte de la partie N-terminale, de nature hydrophile, confère une hydrophobicité à ces fragments qui ont tendance à s'agréger (Larner, 1999) tout comme l'A β ₁₋₄₂. En effet, en condition pathologique, l'A β ₁₋₄₂, de nature hydrophobe, est plus susceptible de s'oligomériser (de 2 à 6 peptides) via le changement de conformation des hélices α en feuillets β (Serpell, 2000). Les oligomères A β fusionnent au niveau des résidus 16 à 20 (Evans *et al.*, 2008) pour former des protofibrilles, puis des fibrilles d'A β , insolubles et résistantes aux clivages protéolytiques, retrouvées au niveau des plaques amyloïdes. Un déséquilibre entre la production mais aussi la clairance de ces peptides A β est donc responsable de leur accumulation. L'hydrolyse du peptide A β est assurée par deux enzymes principales, la néprilysine (NEP) et l'enzyme dégradant l'insuline (IDE), dont l'expression est diminuée avec

l'âge. D'une part, la NEP est une endopeptidase membranaire qui peut dégrader les monomères mais aussi les oligomères d'A β (Shirovani et al., 2001). D'autre part, l'IDE peut elle aussi dégrader de petits peptides tels que l'insuline ou les monomères d'A β (Querfurth & Laferla, 2010; Vekrellis et al., 2018).

4.4 - Métabolisme de l'APP via la η -sécrétase

Par ailleurs, de nouvelles études ont décrit l'action de nouvelles sécrétases dans le processus physiopathologique de la MA. La η -sécrétase, caractérisée par l'action de la métalloprotéinase MT5-MMP (Membrane-bound matrix metalloproteinase ou MMP24), clive l'APP entre l'asparagine en position 504 et la méthionine en position 505 conduisant à la production d'un fragment APPs- η d'environ 80 kDa et d'un fragment CTF- η d'environ 30 kDa (Figure 6) (Willem et al., 2015). Ce dernier, peut être à nouveau clivé par l'action des α - et β - sécrétases pour finalement conduire à la production de peptides A η - α et CTF- α , et A η - β et CTF- β respectivement (Figure 6). Comme précédemment, les deux fragments CTF- α , et CTF- β sont clivés à leur tour par la γ -sécrétase, conduisant ou non à la production du peptide A β (Figure 6). En outre, cinq fois plus de peptides A η que de peptides A β ont été retrouvés dans le LCR chez l'Homme suggérant que le métabolisme de l'APP par la η -sécrétase est très important. Chez les patients atteints de la MA, une accumulation de fragments CTF- η a été retrouvée dans les neurites dystrophiques. De plus, l'expression de peptides A η - α dans des cultures cellulaires ou *in vivo* chez des souris montre une diminution de la potentialisation à long terme (LTP) ainsi qu'une diminution de l'activité des neurones hippocampaux (Willem et al., 2015).

4.5 - Métabolisme de l'APP via la δ -sécrétase

La δ -sécrétase, quant à elle, se caractérise par l'action de l'AEP (asparagine endopeptidase) et comme son nom l'indique, l'AEP clive après les résidus asparagine. L'activation de l'AEP nécessite la suppression des propeptides en N- et C-terminal qui survient à pH 6. L'AEP clive l'APP au niveau des résidus asparagine 373 et asparagine 585 et conduit à la production de deux fragments APP₃₇₄₋₆₉₅ (CTF- δ 374) et APP₅₈₆₋₆₉₅ (CTF- δ 586) dans les endosomes (Figure 6). Comme pour les CTF- η , ces deux fragments CTF- δ 374 et CTF- δ 586 peuvent être à leur tour clivés par les α - ou β -sécrétases et conduire ou non à la production du peptide A β . Par ailleurs, il a été montré que le clivage de l'APP par la δ -sécrétase, après le résidu N585, facilite ensuite le métabolisme du CTF- δ 586 par BACE1 et augmente la production de peptides A β (Figure 6). De plus, le fragment APP₁₋₃₇₃ semble être également neurotoxique. Le clivage de l'APP par l'AEP pourrait donc

être impliqué dans le processus physiopathologique de la MA. En effet, le taux d'AEP augmente avec l'âge tout comme les fragments APP₁₋₃₇₃, APP₁₋₅₈₅ et CTF-δ586, chez les patients atteints de la MA par rapport aux individus sains. Enfin, la délétion de l'AEP chez des souris transgéniques pour la MA, restaure la perte synaptique, la densité des épines dendritiques et améliore la LTP (Zhang et al., 2015).

4.6- Autres voies de clivage de l'APP

Le clivage de l'APP en N-terminal, sur trois sites différents, est également possible par la metalloprotéase Meprin-β et conduit à la production de fragments APPs₁₋₁₂₄, APPs₁₋₃₀₅ ou APPs₁₋₃₀₈, APPsβ* (possédant un résidu en plus par rapport au APPsβ) et un fragment CTF-β* (possédant un résidu en moins par rapport au CTF-β). Le clivage successif par la γ-sécrétase conduit à la production d'un peptide Aβ_{2-x} (Jefferson et al., 2011). Les fragments issus de ce métabolisme ne semblent montrer aucune toxicité dans les cultures primaires neuronales (Jefferson et al., 2011).

Les caspases peuvent également cliver l'APP en C-terminal et plus précisément après le résidu Asparagine en position 664. Elles génèrent alors un peptide C31. Le clivage successif par la γ-sécrétase produit également un peptide Jcasp. Bien que le fragment Jcasp soit très instable, une étude a montré qu'il aurait des propriétés pro-apoptotiques (Bertrand et al., 2001). La toxicité du fragment C31 a également été reportée *in vitro* et conduirait également à la mort cellulaire de façon dépendante de l'APP mais reste controversée dans des modèles *in vivo* (Lu et al., 2003 ; Nhan et al., 2015).

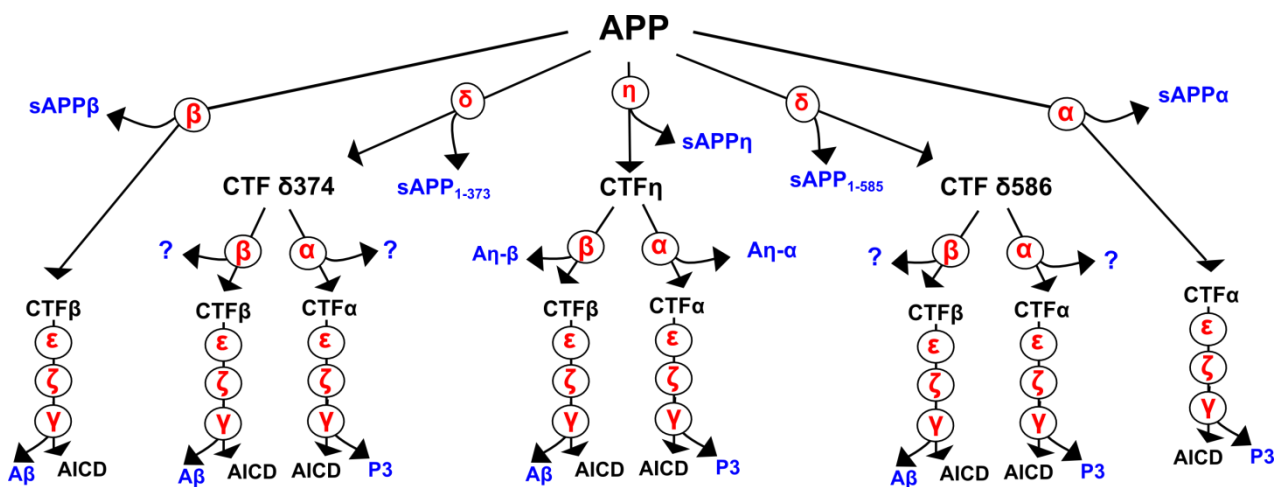


Figure 6 : Représentation schématique des différentes voies métaboliques de l'APP conduisant ou non à la production du peptide amyloïde (adapté de Willem et al., 2015; Zhang et al., 2015; Zheng & Koo, 2011).

Les mécanismes généraux du métabolisme de l'APP commencent à être relativement bien décrits mais sont fortement centrés sur les acteurs principaux de celui-ci, les sécrétases. Des approches thérapeutiques ont donc été développées visant à cibler ces sécrétases afin de limiter la production des peptides amyloïdes. Ces approches se sont cependant heurtées à la faible spécificité de ces enzymes pour leurs substrats (plusieurs centaines pour la γ -sécrétase), pouvant engendrer des effets indésirables (Panza et al., 2019). Une connaissance plus fine des autres acteurs de ce métabolisme et des mécanismes de régulation afférents pourrait ainsi ouvrir de nouvelles perspectives.

5- Fonctions physiologiques de l'APP

Tandis que le métabolisme de l'APP est étudié depuis de nombreuses années pour son implication dans la MA, les études concernant les fonctions physiologiques de l'APP n'ont émergé que récemment. En effet, il est apparu que l'APP possède de nombreuses fonctions physiologiques qui lui permettent d'intervenir aussi bien pendant le développement cérébral, que la plasticité synaptique et la mémorisation. L'APP est transporté vers les axones et les dendrites de façon dépendante de la protéine Rab11 par un mécanisme appelé transcytose (Tan & Gleeson, 2019; Woodruff et al., 2016) et exerce un rôle neurotrophique, attribuable à ses fonctions dans l'adhésion cellulaire. En effet, l'APP peut lier des composés de la matrice extracellulaire (MEC) comme le collagène, la laminine ou la reelin (Hoe et al., 2009) et joue donc un rôle dans l'adhésion cellule-matrice. La séquence RHDS du côté C-terminal de l'APP pourrait également lier des récepteurs de la surface cellulaire (Small et al., 1999).

5.1- L'APP participe à la croissance des neurites

Pendant le développement cérébral, l'APP est enrichi dans le cône de croissance (Behr et al., 1999; Yamazaki et al., 1995) et, est impliqué dans la migration et la croissance des neurites (Perez et al., 1997; Sabo et al., 2003; Small et al., 1999) (Figure 7) notamment grâce à la séquence REMRS présente dans son domaine extracellulaire E2 (Sosa et al., 2017) (Figure 5). Une étude a notamment montré qu'une diminution de l'expression d'APP diminue la croissance axonale alors que la surexpression de l'APP augmente la taille du cône de croissance mais ne modifie pas la croissance axonale. Chez les souris KO APP $-/-$, le nombre de filopodes dans le cône de croissance diminue, alors qu'il augmente dans les neurones de souris surexprimant un APP humain (hAPP). Le niveau d'expression d'APP affecte également l'adhésion du cône de croissance (Sosa et al., 2013). Small *et al.*, ont suggéré que l'interaction de l'APP avec des protéoglycans de la

MEC pourrait permettre à l'APP de se présenter selon une certaine conformation lui permettant ensuite de lier des récepteurs de la surface cellulaire et ainsi stimuler la croissance axonale (Small et al., 1999).

Parmi ses multiples partenaires, l'APP interagit en intra-cellulaire avec la protéine Fe65 dans le cône de croissance (Sabo et al., 2003). En plus de réguler le trafic et le clivage protéolytique de l'APP, Fe65, en formant un complexe avec l'APP, régule aussi la motilité du cône de croissance (Sabo et al., 2003). En condition pathologique, la phosphorylation de l'APP par Cdk5, sur le résidu Thréonine 668 perturbe sa conformation bouleversant ainsi son interaction avec différents partenaires tels que Fe65. Le métabolisme de l'APP est alors perturbé, conduisant à son accumulation dans les endosomes et à la dégénérescence des neurones (Muresan & Muresan, 2007). L'APP interagit également avec la sous-unité α de la protéine Go ($G\alpha$) indiquant qu'il peut fonctionner comme un récepteur couplé aux protéines G non conventionnel. Récemment, Ramaker and Copenhaver ont suggéré que l'APP pouvait également conduire à la rétractation des filopodes du cône de croissance et diminuer leur exploration de façon dépendante à l'activation de $G\alpha$ (Ramaker & Copenhaver, 2017). L'APP peut également former des dimères en *cis* à la surface cellulaire pour promouvoir les adhésions homo- et hétérotypiques (Soba et al., 2005). Cette dimérisation de l'APP ainsi que sa liaison avec des partenaires de la MEC module son métabolisme et son clivage par les différentes sécrétases. Les fragments de l'APP tels que les APPs et l'A β peuvent également interagir avec l'APP et moduler la genèse des neurites ainsi que d'autres fonctions synaptiques (Sosa et al., 2017).

5.2- L'APP joue un rôle dans la synaptogénèse et la stabilisation des synapses

L'APP à la surface cellulaire est aussi impliqué dans les mécanismes d'adhésion synaptique important pendant la synaptogénèse et dans les processus qui nécessitent la stabilisation des synapses à l'âge adulte (Figure 7). En effet, l'expression de l'APP augmente pendant la synaptogénèse (Sosa et al., 2017). Par ailleurs, même avec la redondance de certaines fonctions entre APP et les APLPs, les souris KO déficientes APP^{-/-} présentent une masse cérébrale réduite, des déficits neuronaux dépendants de l'âge tels que des perturbations de la morphologie des neurones, de la plasticité synaptique et de comportements (apprentissage et mémoire) (Dawson et al., 1999; Seabrook et al., 1999; Southam et al., 2019). Les neurones des souris APP^{-/-} présentent également une perturbation de la dynamique et du remodelage des épines dendritiques ainsi que de la LTP (Müller et al., 2017; Zou et al., 2016). L'APP régule également la plasticité synaptique en modulant la libération de D-sérine par les astrocytes. Chez les souris KO APP, le taux de D-sérine extracellulaire (agoniste des récepteurs NMDA) est diminué par rapport aux souris WT et ne peut donc pas conduire à l'induction de la LTP (Montagna, Dorostkar, & Herms, 2017; Zou et al., 2016).

Après la maturation neuronale, l'APP est exprimé dans les compartiments pré- et post-synaptiques. L'APP au niveau post-synaptique semble être nécessaire pour conduire à l'expression et à la fonction de protéines pré-synaptiques (Wang et al., 2009). Cependant, la contribution de l'APP dans les deux compartiments pré- et/ou post-synaptiques semble différente selon le type de synapse et doit être approfondie. A la synapse, l'APP se dimérise *en trans* entre les compartiments pré- et post-synaptiques, par l'intermédiaire de ses domaines extracellulaires E1, majoritairement (Soba et al., 2005), et E2, grâce au motif GxxxG. Cette dimérisation joue un rôle dans l'adhésion synaptique et la stabilisation entre les compartiments pré- et post-synaptiques (Wang et al., 2009 ; Müller et al., 2017) (Figure 7). Une étude a notamment montré que le clivage de l'APP diminue sa trans-dimérisation et donc l'adhésion cellulaire ainsi que la synaptogénèse. Au contraire, en inhibant le clivage de l'APP, ceci favoriserait son accumulation à la surface cellulaire et permettrait de promouvoir l'adhésion entre les cellules (Stahl et al., 2014). Le domaine intracellulaire de l'APP jouerait également un rôle dans les mécanismes conduisant à la synaptogénèse. En effet, via son domaine intracellulaire, l'APP interagit avec Mint1 qui lie à son tour la kinase CASK. La formation du complexe pourrait jouer un rôle dans la mise en place du compartiment pré-synaptique, comme d'autres protéines de l'adhésion synaptique (par exemple la neurexin ou la neuroligin) (Wang et al., 2009). Des souris mutantes exprimant une forme tronquée en C-terminal de l'APP, présentent des perturbations dans l'induction et le maintien de la LTP ainsi que dans la plasticité synaptique. Ces perturbations sont associées à des altérations de la mémoire et du comportement indiquant donc des dysfonctions de l'hippocampe. Le domaine intracellulaire de l'APP semble donc nécessaire pour ces mécanismes notamment en interagissant avec de nombreux partenaires via son motif YENPTY au niveau C-terminal (C-ter). En effet, ce motif est également connu pour conduire à l'internalisation de l'APP et réguler son métabolisme. Les auteurs ont montré que chez des souris exprimant un APP tronqué en C-ter, celui-ci est moins recyclé au niveau des endosomes, et, est plus exprimé à la surface cellulaire. Le clivage de l'APP se fait donc de manière préférentielle par l' α -sécrétase, réduisant ainsi son clivage par la β -sécrétase et la production de peptides A β (Klevanski et al., 2015).

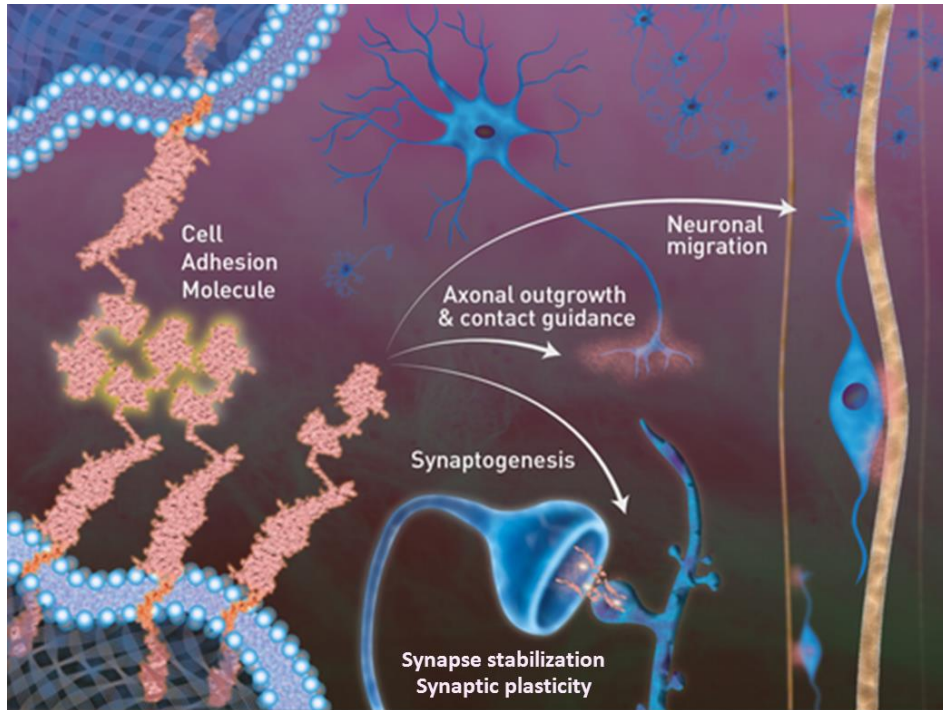


Figure 7 : Rôles physiologiques de l'APP dans un contexte neuronal (Adapté de Sosa et al., 2017).

6- Génétique de la MA

Selon l'âge de l'apparition des symptômes, la MA est divisée en deux catégories. Treize pourcent des cas développent la maladie avant l'âge de 65 ans, on parle alors de la forme appelée EOAD (Early Onset of Alzheimer's disease) tandis que la majorité des cas (87%) développent la forme LOAD (Late Onset of Alzheimer's disease) après l'âge de 65 ans (Gentier & van Leeuwen, 2015) (Figure 8). Dans les deux cas, plusieurs sous-catégories de formes de la MA sont classifiées selon le contexte historique familial ainsi que la transmission génétique (Lambert & Amouyel, 2011). On distingue les formes monogéniques autosomiques dominantes de la MA, les formes familiales de la MA (FAD) et de formes sporadiques de la MA (SAD).

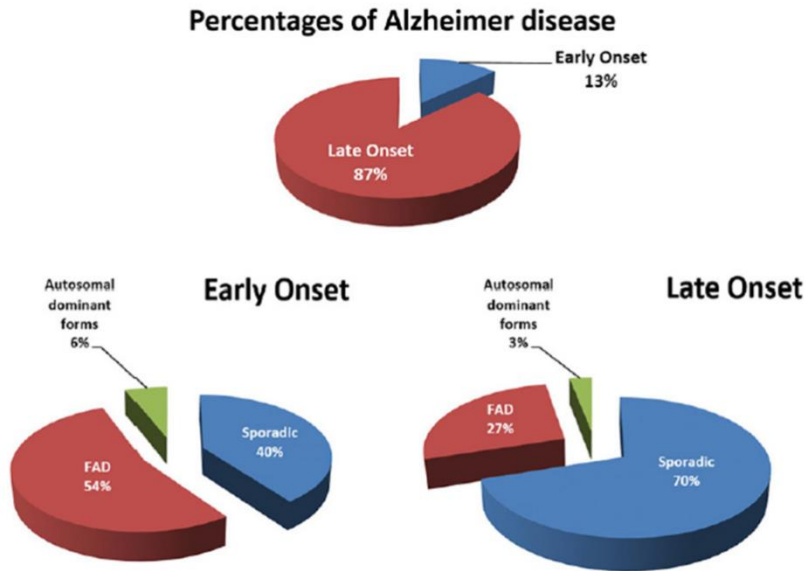


Figure 8 : Pourcentage des formes précoces (EOAD) et tardives (LOAD) de la MA subdivisées en formes monogéniques autosomiques dominantes, formes familiales (FAD) et formes sporadiques (SAD) (Gentier & van Leeuwen, 2015).

6.1- Formes monogéniques de la MA

Les formes monogéniques de la MA correspondent à des formes familiales héréditaires à transmission autosomique dominante (Lambert & Amouyel, 2011). Elles sont très rares et représentent en tout et pour tout 1% de cas de maladie d'Alzheimer, quelque soit l'âge d'apparition de la maladie (Winblad et al., 2016). Chez les patients qui développent la MA avant 65 ans (EOAD), les formes monogéniques représentent 6% des cas. Chez les patients qui développent la MA après 65 ans (LOAD), ces formes monogéniques sont responsables de 3% des cas (Gentier & van Leeuwen, 2015) (Figure 8). L'étude des cas de syndrome de Down (SD), ou Trisomie 21, a permis d'identifier la présence des deux lésions (plaques amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires) spécifiques de la MA, chez les patients jeunes de plus de 35 ans (Olson & Shaw, 1969). En effet, ces patients ont trois copies du chromosome 21 où se trouve le gène de l'APP qui est donc surreprésenté. En revanche, chez de rares individus, la duplication implique seulement la partie distale du chromosome 21 sans englober le gène de l'APP (Prasher et al., 1998). Le fait que ces patients ne développent pas la MA suggère un rôle très important du métabolisme de l'APP dans le processus physiopathologique de la MA. Egalement, l'étude des formes monogéniques a permis d'identifier des mutations sur trois gènes impliqués dans le métabolisme de l'APP. Le gène codant pour l'APP (Goate et al., 1991) peut être touché par 54 mutations capables d'engendrer la MA dont 52 sont des mutations à transmission autosomique dominante (Cacace et al., 2016). Les gènes codant pour les sous-unités catalytiques de la γ -

sécrétase, les présénillines 1 et 2 (PS1 et PS2), conduisant à la production du peptide A β , impliquent respectivement 215 et 31 mutations autosomiques dominantes qui influencent le développement de la MA (Cacace et al., 2016). Ces premières découvertes ont donc permis de poser les premières hypothèses sur la physiopathologie de la maladie.

6.2- Hypothèse de la cascade amyloïde

L'hypothèse de la cascade amyloïde suggère que des mutations des gènes impliqués dans le métabolisme de l'APP conduiraient à une augmentation de la production et de la sécrétion de peptides A β . Ces derniers s'accumuleraient sous forme d'oligomères neurotoxiques qui produiraient *in fine* un stress oxydatif pour les neurones conduisant à l'apparition des dégénérescences neurofibrillaires (Hardy & Higgins, 1992). Selon cette hypothèse (Figure 9A), la pathologie amyloïde serait donc à l'origine de la pathologie Tau (Hardy, & Selkoe, 2002). Par ailleurs, les nouvelles techniques d'imageries ont également suggéré que l'apparition de bio-marqueurs pendant la maladie reflète le processus physiopathologique de la MA. En effet, un faible taux d'A β dans le LCR ainsi qu'une augmentation de la recapture des traceurs amyloïdes pendant le PET-Scan sont tous deux corrélés avec des dépôts de fibrilles d'A β . Ce phénomène survient en amont de l'augmentation des niveaux de Tau ainsi que de sa phosphorylation, qui sont corrélés avec la charge de dégénérescences neurofibrillaires (Jack Jr et al., 2013) (Figure 9B). Encore une fois, cette étude montre que la pathologie A β semble intervenir en amont de la pathologie Tau. L'ensemble de ces arguments en faveur de l'hypothèse de la cascade amyloïde a abouti au développement d'approches thérapeutiques visant à lutter contre l'accumulation des peptides amyloïdes dans le tissu cérébral. Ainsi, ces essais cliniques sont principalement basés sur des immunisations actives et passives. Les immunisations passives consistent en l'injection d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'A β alors que les immunisations actives consistent en l'injection d'antigènes pour le peptide amyloïde et permettent de stimuler la réponse immunologique. Pourtant, l'échec de ces essais à limiter le déclin cognitif chez les patients traités (Panza et al., 2019), semble remettre en question l'hypothèse de la cascade amyloïde. Cependant, il est probable que ces traitements soient administrés trop tardivement chez ces patients pour lesquels le processus physiopathologique est déjà trop avancé (Modrego & Lobo, 2019). Par ailleurs, certains sujets sains ont des dépôts amyloïdes (environ 30%) sans pour autant développer la MA (Iaccarino et al., 2018) suggérant ainsi que l'A β ne serait pas suffisant pour causer la maladie (Herrup, 2015). D'autre part, il est connu que l'A β est neurotoxique et conduit à la perte synaptique (Mairet-Coello et al., 2013) mais peu ou pas à la neurodégénération (Bloom et al., 2014; Jack Jr et al., 2013). Finalement, alors que la cascade amyloïde, dans sa première version, était présentée de façon très linéaire, un nouveau modèle intégratif a été proposé récemment

(Figure 9C). En effet, il semble aujourd’hui que les pathologies amyloïde et Tau interagissent plus précocement et à différents niveaux au cours du développement de la maladie (Iaccarino et al., 2018) pour conduire ensemble à la démence.

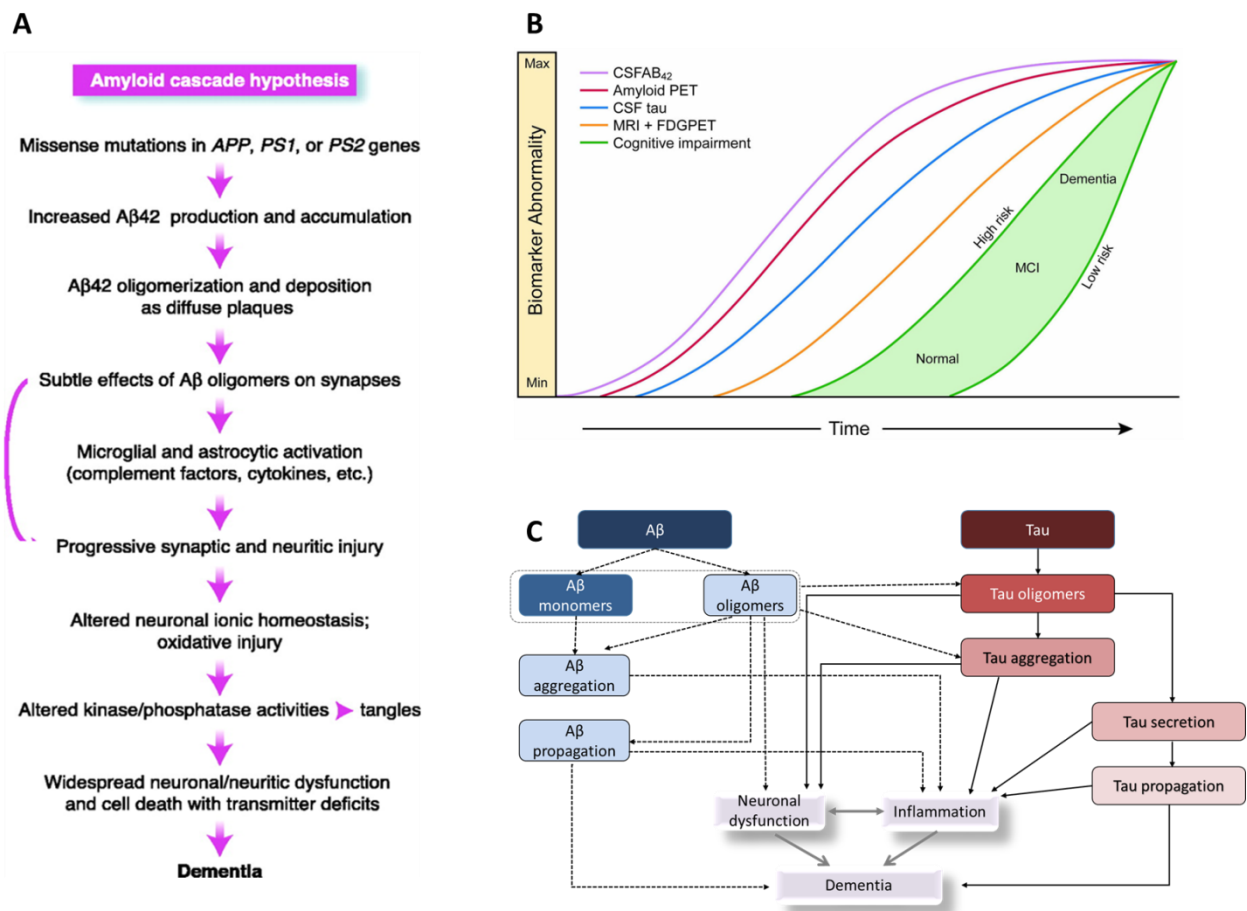


Figure 9 : Séquence des évènements conduisant à la MA. **A**) Hypothèse de la cascade amyloïde (Hardy and Selkoe, 2002). **B**) Dynamique des biomarqueurs dans un modèle de cascade pathologique de la MA (Jack Jr et al., 2013). **C**) Modèle intégratif de la cascade amyloïde (Alzforum, Distalz).

6.3- Formes sans transmission mendélienne classique

6.3.1 – Formes familiales

Les formes appelées familiales correspondent aux formes où la MA a été décelée chez des parents du premier degré avec une agrégation familiale évidente mais sans pour autant avoir une transmission mendélienne classique. Contrairement aux formes monogéniques autosomiques dominantes, les formes FAD ne sont pas encore reliées à un chromosome en particulier (Gentier & van Leeuwen, 2015). Les FAD représentent une part majoritaire (54%) des formes EOAD tandis que dans le cas des formes LOAD, ce sont les formes sporadiques qui sont majoritaires (Figure 8).

6.3.2- Formes sporadiques, multifactorielles

Les formes sporadiques de la MA représentent un plus grand nombre de cas. En effet, elles constituent 40% des cas des formes EOAD et 70% des formes LOAD (Gentier & van Leeuwen, 2015) (Figure 8). Souvent, les formes LOAD sont considérées comme sporadiques car elles ne présentent pas de transmission mendélienne classique (Lambert & Amouyel, 2011). Malgré le fait que l'étiologie des formes sporadiques reste inconnue, les recherches ont permis de déterminer qu'elles résultent de la combinaison de facteurs environnementaux et génétiques. L'âge est notamment le principal facteur de risque auquel s'ajoute le sexe. En effet, les femmes ont deux fois plus de chance de développer la MA après 80 ans (Letenneur, 1999). Les taux d'A β et Tau ne semblent pourtant pas différents entre les hommes et les femmes (Ferretti et al., 2018). Plusieurs études ont suggéré que le taux d'œstrogènes, connu pour améliorer les fonctions cognitives, serait impliqué au moment de la ménopause puisqu'il est diminué (Li et al., 2014; Ullah et al., 2019). D'autres facteurs environnementaux comme les facteurs de risques cardiovasculaires tels que le diabète, l'activité physique et le tabagisme ou des facteurs psychosociaux comme l'éducation, l'activité mentale ou cognitive et la dépression sont également connus pour augmenter le risque de développer la MA (Winblad et al., 2016). D'autres facteurs de risques environnementaux sont d'ailleurs répertoriés sur le site internet Alzforum (Weuve J et al., 2019). La part attribuable aux facteurs génétiques, quant à elle, représente tout de même 60% à 80% (Gatz et al., 2006), faisant donc de la MA une maladie multifactorielle.

7- Identification des facteurs de risques génétique pour la MA

7.1- L'APOE

Pendant longtemps l'apolipoprotéine E (APOE) a été le seul et principal facteur de risque génétique pour les formes LOAD (Corder et al., 1993). L'APOE se compose de 299 acides aminés et il existe trois isoformes majoritaires (APOE2, APOE3 et APOE4). Un seul allèle de l'APOE4 augmente le risque de la MA quatre fois en comparaison avec le génotype le plus commun APOE3/APOE3. La présence de deux allèles APOE4/APOE4 augmente le risque de la MA environ douze fois (Mahley & Huang, 2012). Le rôle principal de l'APOE est le transport du cholestérol. Il participerait donc au maintien de la viabilité des neurones via le maintien des connexions synaptiques (Kim et al., 2009; Pfrieger, 2003). Même si son rôle physiopathologique pendant la MA n'est pas encore établi, il est aujourd'hui supposé que les différentes isoformes de l'APOE régulent différenciellement la clairance de l'A β dans le cerveau (Kim et al., 2009). Des études fonctionnelles ont néanmoins permis de démontrer d'autres rôles de l'APOE. En 2017, Shi *et al.*, ont montré que l'expression de l'allèle APOE4 (par rapport à APOE2, APOE3 ou KO APOE) chez des souris transgéniques

Tau (P301S) conduit à une neuroinflammation, une redistribution de Tau au niveau somato-dendritique et une neurodégénération sévère liée à une atrophie cérébrale, de façon indépendante de l'Aβ (Shi et al., 2017). Huang et al., ont également montré que la synthèse et la sécrétion d'APOE par les cellules gliales, stimulées par un stress, conduit à l'activation d'une voie MAP kinase. Cette voie implique l'activation de la MAP kinase kinase, DLK, suite à la fixation de l'APOE sur son récepteur. Il s'ensuit l'activation de la kinase ERK1/2 qui permet la phosphorylation de c-Fos. Ce dernier active le facteur de transcription AP-1 qui active à son tour la transcription de l'APP et conduit à la production du peptide Aβ (Huang et al., 2018). Ces études ont donc permis une meilleure compréhension des mécanismes impliquant APOE dans le processus physiopathologique de la MA alors que son rôle semblait acquis. Cependant, environ 40% des patients atteints de la MA possèdent un allèle APOEε4 ce qui suggère que d'autres facteurs de risques génétiques sont impliqués (Goedert, 2015).

7.2- Analyses pangénomiques ou GWAS

La mise en place des études d'association pangénomiques, ou analyses GWAS, (Genome-Wide Association Study) a permis une avancée majeure dans l'identification des facteurs de susceptibilité génétique de la MA. En effet, les GWAS reposent sur la comparaison de la fréquence des variations génétiques entre une population témoin et une population qui présente un caractère phénotypique particulier comme par exemple une maladie. Les variations génétiques les plus fréquentes correspondent à des SNPs (single nucleotide polymorphisms) et la sur- ou sous-représentation d'un variant particulier dans un des groupes comparés suggère une association entre ce variant et le phénotype (Dourlen et al., 2018).

Depuis 2009, de nombreuses études, dont celles du laboratoire, ont permis de découvrir plus de 30 nouveaux facteurs de risques (Harold et al., 2009; Hollingworth et al., 2011; Jansen et al., 2019; Kunkle et al., 2019; Lambert et al., 2009, 2013; Naj et al., 2011; Seshadri et al., 2010; Sims et al., 2017) (Figure 10). Les premiers gènes caractérisés par les GWAS ont été les gènes *CLU* et *CR1* (Lambert et al., 2009). De nombreux autres gènes ont ensuite été identifiés jusqu'à très récemment par notre équipe (Kunkle et al., 2019). La plupart des facteurs de risques identifiés n'augmentent le risque de développer la MA seulement de 10 à 20%. En revanche, la présence de variants rares peut augmenter ce risque de plus de deux fois. C'est par exemple le cas de *TREM2*. La présence de variants rares ayant de gros impacts peuvent multiplier par 3, le risque de développer la MA (Jonsson et al., 2013).

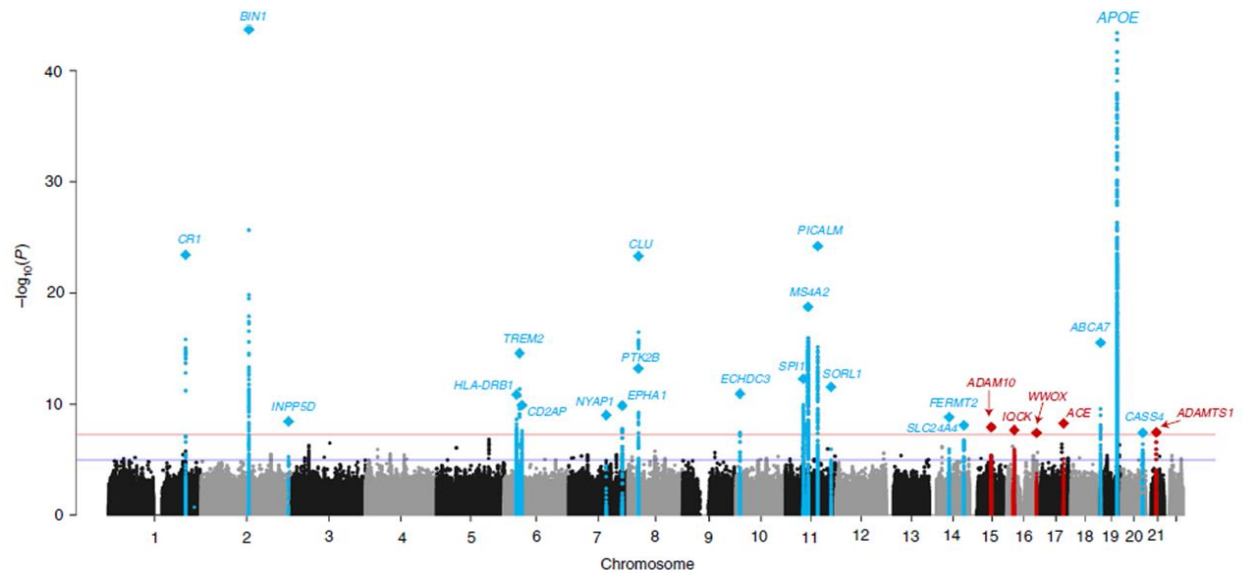


Figure 10 : Manhattan Plot des facteurs de risques identifiés d'après les GWAS (Kunkle et al., 2019). Le seuil de significativité ($P < 5 \times 10^{-8}$) est indiqué par la ligne rouge tandis que la ligne bleue indique le seuil suggestif ($P < 5 \times 10^{-5}$). Les *loci* précédemment identifiés apparaissent en bleu et les *loci* nouvellement identifiés apparaissent en rouge. Les losanges représentent les variants avec la valeur de P la plus petite pour chaque locus.

Cependant, il est important de noter que les approches GWAS identifient des régions chromosomiques ou *loci*, associées au risque de développer la MA. Le gène le plus proche de ce locus identifié est alors défini comme gène de susceptibilité pour la maladie. Cependant, la plupart de ces régions contiennent en fait plusieurs gènes et/ou polymorphismes. Par exemple, le locus de *BIN1* contient uniquement le gène de *BIN1* mais le locus de *CELF1* contient en fait de nombreux autres gènes (Figure 11). Finalement, c'est en réalité plus de 130 gènes qui se retrouvent associés à la pathologie. De plus, la plupart de ces gènes sont associés de façon indirecte et ne constituent donc pas de réels facteurs de susceptibilités génétiques. Il est donc d'une importance capitale, de déterminer quels sont les polymorphismes fonctionnels mais aussi identifier les gènes causaux dans chaque locus pour permettre par la suite une meilleure compréhension de la contribution de ces gènes pendant le processus physiopathologique de la MA (Dourlen et al., 2018).

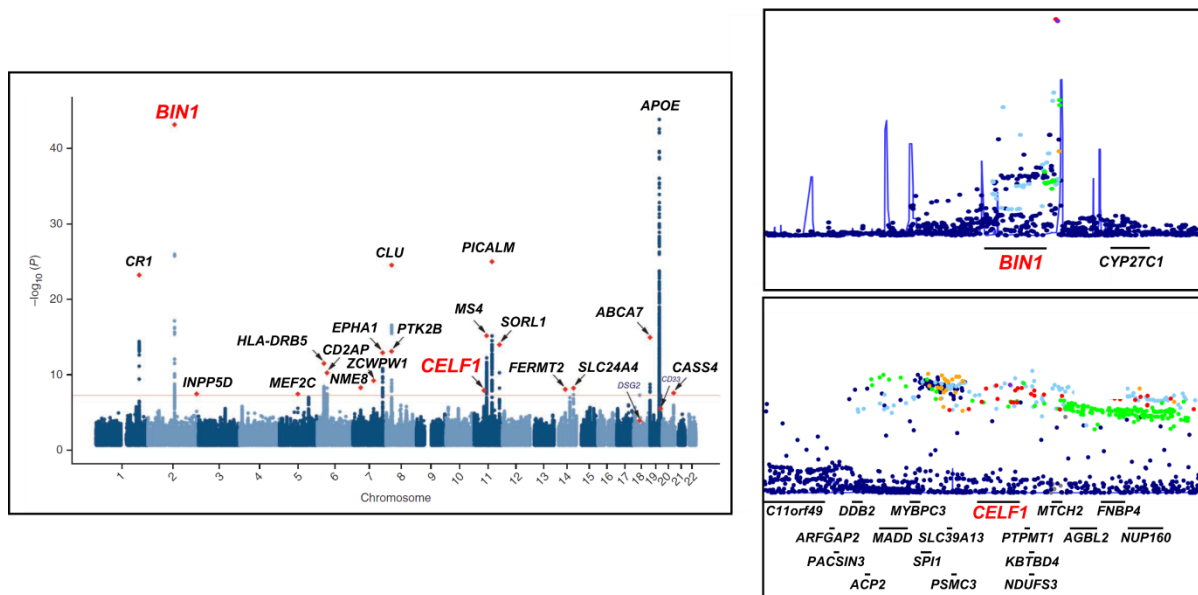


Figure 9 : Manhattan plot des facteurs de risques identifiés d'après les GWAS (Lambert et al., 2013) et agrandissement des *locus* pour BIN1 et CELF1.

8- Etudes fonctionnelles des gènes identifiés par les GWAS

Les analyses GWAS sont réalisées sans *a priori* quant à la fonction biologique des gènes étudiés et rend ainsi particulièrement difficile l'élaboration d'hypothèses permettant d'expliquer le rôle de ces gènes dans la physiopathologie. Dans ce contexte, seule la réalisation d'analyses dites « analyses post-GWAS » peut préciser les mécanismes moléculaires impliquant ces gènes. Parmi ces gènes, des modulateurs du métabolisme de l'APP ou de l'accumulation des peptides A β peuvent être proposés en fonction de leurs rôles déjà connus dans des mécanismes susceptibles de contrôler ce métabolisme. Comme l'*APOE*, les gènes *CLU*, *ABCA7* et *CR1*, ont été proposés comme participants à la clairance des peptides A β (DeMattos et al., 2004; Khera & Das, 2009; Kim et al., 2013; Rogers et al., 2006). *CR1* semble également être impliqué dans l'activation de la microglie en réponse à l'A β , tout comme *TREM2* et *CD33* (Griciuc et al., 2013). En outre, les analyses fonctionnelles portant sur *PICALM* ont permis de mettre en évidence son rôle dans l'endocytose et plus particulièrement lié au métabolisme de l'APP. En effet, la sous-expression de *PICALM* diminue l'internalisation de l'APP et donc la production d'A β (Carey et al., 2005; Harold et al., 2009; Koo & Squazzo, 1994). En revanche, la sous-expression de *SORL1* est associée avec une augmentation de la production de peptides A β en inhibant la redirection de l'APP vers le réseau trans-golgien (Andersen et al., 2005). D'autres études fonctionnelles ont notamment suggéré que la sous-expression de *SORL1* diminue la dégradation de l'A β intracellulaire via le lysosome, participant ainsi à son accumulation (Schmidt et al., 2007; Willnow & Andersen, 2013).

Au laboratoire, nous nous sommes intéressés à l'impact potentiel du gène *BIN1* sur le métabolisme de l'APP. En effet, *BIN1* étant une amphiphysine impliquée dans la régulation de l'endocytose (Itoh & De Camilli, 2006), ce facteur génétique constituait un très bon candidat pour contrôler la production des peptides amyloïdes. Cependant, après les analyses dans nos différents modèles d'études cellulaires, aucun impact de *BIN1* sur le métabolisme de l'APP n'a pu être observé (Chapuis et al., 2017). L'étude de *BIN1* a mis en évidence la difficulté de préjuger de la fonctionnalité des facteurs génétiques identifiés par les GWAS même en présence de données bibliographiques. Il apparaît alors nécessaire d'apporter d'autres arguments pour permettre de sélectionner les gènes susceptibles de moduler le métabolisme de l'APP. Ainsi parmi les nombreux gènes (environ 130) localisés sur des régions chromosomiques associées par GWAS à la MA, seul un faible nombre a ainsi pu être mis en lien avec le processus physiopathologique de la MA. Il est probable que d'autres gènes soient également modulateurs du métabolisme de l'APP. Or, la validation fonctionnelle de l'implication de chacun de ces candidats s'avère longue et fastidieuse par des approches classiques de biologie cellulaire. Le développement d'outils cellulaires et l'utilisation de méthodologies permettant une analyse à haut débit apparaît donc indispensable pour répondre à cette problématique.

9- Apport des criblages à haut débit dans les analyses fonctionnelles

9.1- Différents types de criblages en post-GWAS

Le criblage à haut débit ou HTS (high throughput screening) correspond à la version automatisée d'une expérience qui se concentre sur un mécanisme biologique ou biochimique particulier. L'HTS permet de réaliser rapidement des millions de tests chimiques, génétiques, biologiques ou pharmacologiques à l'aide de la robotique, de logiciels de traitement et de contrôle des données, de dispositifs de traitement des liquides et de détecteurs sensibles. Par rapport à l'HTS qui permet la stimulation ou l'inhibition d'une partie d'un mécanisme, le criblage à haut contenu ou HCS (high content screening), quant à lui, est une approche multiparamétrique. En effet, l'HCS permet de déceler et corrélérer simultanément plusieurs paramètres différents à l'échelle d'une cellule unique (cell-based models) (Brodin et al., 2015; Dourlen et al., 2018). L'HCS est une méthode automatisée de criblage de composés qui utilise l'analyse d'images pour quantifier les changements phénotypiques cellulaires. Ces populations cellulaires peuvent être soumises à des traitements perturbateurs différents dont il existe plusieurs banques (1) de composés chimiques, de médicaments, (2) de siRNAs, shRNAs, (3), de micro-ARNs.

De nombreuses études génétiques fonctionnelles ont été menées à grande échelle grâce aux criblages (Brodin et al., 2015 ; Dourlen et al., 2018). Ces approches systématiques correspondent aux outils les plus puissants pour identifier et étudier les fonctions physiopathologiques potentielles des facteurs de risque génétiques de la MA définis par les GWAS (Dourlen et al., 2018).

9.2- Etude du métabolisme de l'APP par HCS

Dans ce contexte, afin d'identifier des nouveaux modulateurs du métabolisme de l'APP, un criblage à haut contenu (HCS) a été développé au laboratoire. En effet, l'HCS permet ici d'automatiser l'étude du métabolisme de l'APP en détectant et quantifiant rapidement les différents fragments intracellulaires issus de son métabolisme. Pour cela, des cellules HEK-293 surexprimant stablement l'isoforme humaine APP^{695WT} doublement marqué en N-ter et en C-ter par les fluorophores mCherry et YFP respectivement ont été utilisées (Figure 12) ce qui a permis d'évaluer les quantités produites des métabolites de l'APP au sein de la cellule. Dans le modèle HEK-mCherry-APP-YFP, nous avons criblé une banque de 18 107 siRNAs et identifié 832 gènes susceptibles d'avoir un impact sur le métabolisme de l'APP (Figure 12). Ces données ont ensuite été croisées avec la méta-analyse GWAS-IGAP (International Genomics of Alzheimer's Project) (Lambert et al., 2013) ce qui a permis de mettre en évidence 8 gènes associés au risque de développer la MA probablement via la régulation du métabolisme de l'APP (Figure 9). Finalement, afin de valider si ces gènes ont bien un impact sur le taux de peptides A β , nous avons évalué l'association entre le taux de peptides A β dans le LCR de patients atteints de la MA et les SNPs situés sur ces gènes. Seuls les SNPs dans le gène de *FERMT2* ont été associés au taux d'A β dans le LCR (Figure 12) (Chapuis et al., 2017).

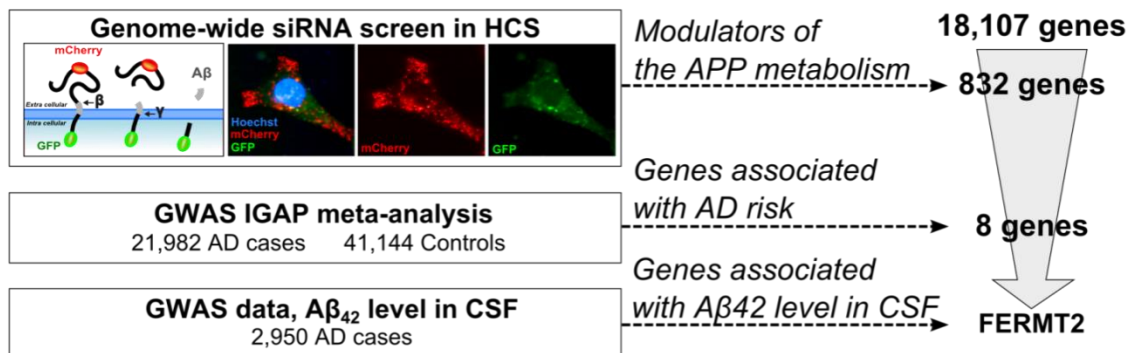


Figure 12 : Schéma analytique représentant les différentes étapes amenant à proposer *FERMT2* comme facteur génétique de la MA impliqué dans la modulation de la production des peptides A β (Chapuis et al., 2017).

Ainsi, la mise en place d'une approche HCS nous a permis d'identifier, parmi un grand nombre de candidats, le facteur génétique *FERMT2*, comme un modulateur majeur du métabolisme de l'APP. Après validation par d'autres approches, des convergences biologiques sont apparues en faveur du rôle de ce facteur génétique dans la physiopathologie de la MA au travers de sa capacité à réguler le métabolisme de l'APP et la production de peptides amyloïdes.

10- La protéine de FERMT2

10.1- FERMT2 appartient à la famille des kindlins

FERMT2 a été décrit pour la première fois en 1994 et nommé Mig-2 (Mitogen-inductible gene 2) (Wick et al., 1994). La même année, un orthologue de FERMT2, UNC-112, chez *Caenorhabditis elegans* a été identifié comme facteur essentiel pour le développement musculaire (Williams & Waterson, 1994). Le terme Kindlin-2 est apparu quelques années plus tard dans la littérature, après la découverte des deux autres isoformes Kindlin-1 et Kindlin-3 formant ainsi la famille des protéines Kindlins. Les trois kindlins sont codées par des gènes différents. Le gène *FERMT1* sur le chromosome 20p12.3 code pour la protéine Kindlin-1, *FERMT2* sur le chromosome 14q22.1 code pour Kindlin-2 et *FERMT3* sur le chromosome 11q13.1 code pour Kindlin-3 (Lai-Cheong et al., 2010; Rognoni et al., 2016). Les gènes humain et murin des kindlins se composent de 15 exons. Le site de démarrage de la traduction se trouve au niveau de l'exon 2. Chez Kindlin-2 seulement, une séquence NLS (nuclear localization signal) est retrouvée au niveau des acides aminés 55-72 (Theodosiou et al., 2016; Ussar et al., 2006).

Les trois kindlins partagent une structure protéique similaire : elles sont composées de 680 amino-acides et ont une masse d'environ 75 kDa. Par exemple, Kindlin-2 partage 62% d'homologie avec Kindlin-1 et 53% d'homologie avec Kindlin-3 (Siegel et al., 2003). Les trois protéines Kindlin-1, Kindlin-2 et Kindlin-3 ont en commun un domaine central FERM (Band 4.1(Four point one)/Ezrin/Radixin/Moesin). Ce domaine FERM, divisé en trois sous-domaines F1, F2 et F3, est retrouvé dans de nombreuses protéines liant la membrane au cytosquelette. Par rapport à d'autres protéines contenant un domaine FERM, les kindlins possèdent un sous-domaine additionnel F0 du côté N-terminal. Le domaine FERM est interrompu par un domaine PH (pleckstrin homology) inséré dans le sous-domaine F2, qui assure la liaison aux phosphatidylinositol phosphates (Figure 13). Malgré leurs similarités, les kindlins ne sont pas exprimées dans les mêmes tissus et n'ont pas les mêmes fonctions. Kindlin-1 est exprimé principalement dans les cellules épithéliales et les mutations entraînant une perte ou une déficience de Kindlin-1, conduisent au syndrome de Kindler. Ce

syndrome correspond à une génodermatose autosomale récessive caractérisée par une atrophie avec des cloques sur la peau et une photo-sensitivité à la lumière, prédisposant ainsi les patients aux cancers de la peau sans mélanome. Kindlin-2 est exprimée de façon ubiquitaire (Montanez *et al.*, 2008) y compris dans le système nerveux (Tan *et al.*, 2012). Chez la souris, comme chez l'Homme, FERMT2 semble être exprimé plus fortement dans l'hippocampe (*Allen Brain Atlas*). Au niveau cellulaire, FERMT2 est retrouvé dans les cellules endothéliales, les oligodendrocytes, la microglie, les neurones et les astrocytes où ils sont le plus fortement exprimés (Dourlen *et al.*, 2019; Ussar *et al.*, 2006). Dans les neurones, FERMT2 est retrouvé tant au niveau du corps cellulaire, des dendrites et des axones même au niveau du cône de croissance (Ussar *et al.*, 2006). Une perte de Kindlin-2 chez des souris knock-out (KO) conduit à une létalité avant le stade embryonnaire de 7.5 jours à cause d'un détachement des feuillettes de l'épiblaste et de l'endoderme (Montanez *et al.*, 2008). Enfin, Kindlin-3 est retrouvé dans les cellules hématopoïétiques comme les plaquettes, les érythrocytes et les mégacaryocytes et en plus faible quantité dans les cellules endothéliales (Rognoni *et al.*, 2016; Siegel *et al.*, 2003; Ussar *et al.*, 2006). Elle permet de contrôler l'hémostase et la thrombose (Lai-Cheong *et al.*, 2010).

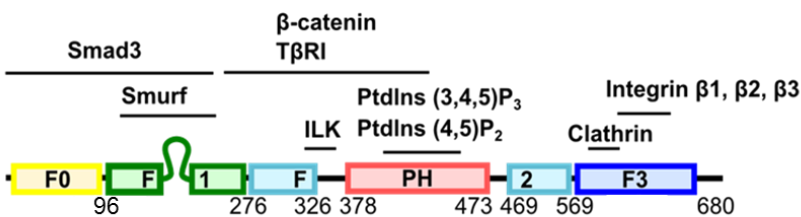


Figure 13 : Représentation schématique de FERMT2 et de ses partenaires (adaptée de Li *et al.*, 2017).

10.2- FERMT2, principal co-activateur des intégrines

FERMT2 a de multiples partenaires dont les principaux sont les intégrines, des récepteurs transmembranaires hétérodimériques de la surface cellulaire. FERMT2 est le principal co-activateur des intégrines et participe à l'activation « Inside-out », avec la coopération de la Talin (Harburger *et al.*, 2009). FERMT2 interagit directement avec la queue β cytoplasmique des intégrines notamment via son sous-domaine F3 au niveau du motif PTB (phosphotyrosine-binding domain). Par ailleurs, il a été montré que les acides aminés Glutamine et Tryptophane en position 614 et 615 respectivement dans ce domaine F3 de FERMT2, sont nécessaires pour cette interaction (Shi & Wu, 2008). Au niveau des intégrines, l'interaction avec FERMT2

s'opère via le motif distal NPxY permettant ainsi de stabiliser les complexes ligand-intégrine. D'autre part, les résidus thréonine 788 et 789 et tyrosine 795 des intégrines $\beta 1$ sont également requis pour l'interaction avec FERMT2 (Böttcher et al., 2012). Cette interaction induit également des réarrangements conformationnels du domaine extracellulaire des intégrines, augmentant ainsi leur affinité pour lier des ligands extracellulaires (Hynes, 2002). De plus, FERMT2 est capable de se dimériser pour permettre le regroupement des intégrines en cluster (Li et al., 2017) (Figure 14). Plus récemment, il a été montré que cette interaction FERMT2-intégrines est conduite par LRP1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1) qui stimule la formation du complexe en liant à la fois les intégrines et FERMT2 (Wujak et al., 2018). Au niveau intracellulaire, FERMT2 conduit au recrutement de la paxillin qui, en retour, lie et active FAK (Focal Adhesion Kinase). FAK est autophosphorylé en Tyrosine 397 ce qui promeut le regroupement d'autres intégrines et son association avec Src (Figure 14). FAK recrute également p130Cas (Crk associated substrate) alors que Src interagit et phosphoryle ensuite FERMT2 en Tyrosine 193 (Liu et al., 2015) (Figure 14). La phosphorylation de FERMT2 permet ensuite la liaison avec la Migfilin qui peut elle-même lier la filamin (Liu et al., 2015) (Figure 12). FERMT2 fait donc le lien entre les intégrines et le cytosquelette d'actine (Tu et al., 2003). *In fine*, la voie de signalisation conduit à l'activation de Akt-1 qui induit l'adhésion cellulaire mais aussi la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Theodosiou et al., 2016) (Figure 14). Bien que FERMT2 soit connu pour son activation « Inside-out » des intégrines, d'autres résultats ont montré qu'elle pouvait être également impliquée dans l'activation « Outside-in » en réponse à des interactions avec des ligands de la MEC (comme la fibronectine) avec la cellule (Qu et al., 2014). Par exemple, FERMT2 possède un motif ABS (actin-binding site) dans son domaine F0 et peut également lier le réseau d'actine directement et ainsi réguler la signalisation outside-in (Bledzka et al., 2016).

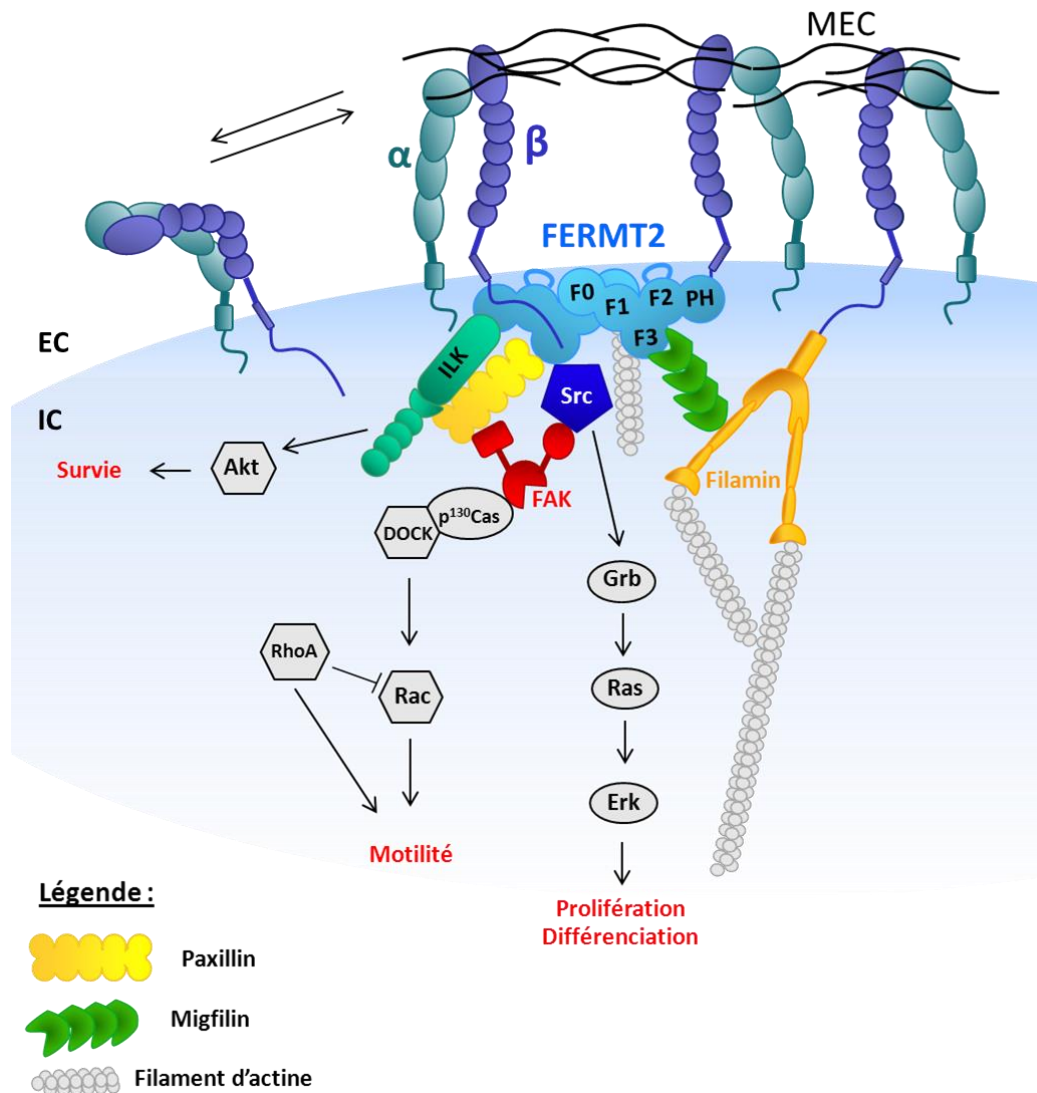


Figure 14 : Schéma représentant le rôle de FERMT2 dans l'activation de la voie des intégrines et les différentes voies de signalisation qui en découlent (adapté de Cheah & Andrews, 2018; Cluzel et al., 2005; Grashoff et al., 2004; Li et al., 2017).

10.3- Pathologies associées à FERMT2

10.3.1- FERMT2 dans la MA

FERMT2 a été identifié comme facteur de risque génétique pour la MA (Kunkle et al., 2019; Lambert et al., 2013) et associé avec l'amyloïdose cérébrale (Apostolova et al., 2018) suggérant ainsi un rôle potentiel dans le développement de la pathologie amyloïde (Delay et al., 2016; Farfel et al., 2016; Sullivan et al., 2019). Cependant, aucune donnée de la littérature ne décrit les fonctions physiologiques de FERMT2 dans le neurone ou bien en lien avec la MA. Selon les rôles connus de FERMT2 et de l'APP comme molécules d'adhésions, il est possible que ces protéines interviennent et interagissent plus ou moins directement

dans les mécanismes d'adhésions focales, croissance des neurites ou encore synaptogénèse et plasticité synaptique, qui sont déjà des rôles établis pour l'APP.

10.3.2- *FERMT2* dans le cancer

Du fait de son rôle majeur au niveau des adhésions focales, *FERMT2* est surtout connu dans la littérature pour être impliqué dans le développement et la progression de tumeurs. Mais la fonction de *FERMT2* semble dépendante du type de cancer (Shi & Wu, 2008). Par exemple, dans le cas du cancer de la prostate, l'augmentation d'expression de *FERMT2* promeut la survie cellulaire (Gao et al., 2013) alors que dans le cas du cancer du côlon, une diminution de l'expression de *FERMT2* promeut la croissance de la tumeur et la migration (Ren et al., 2015; Rognoni et al., 2016).

FERMT2 est également connu dans la fibrose tubulo-interstitielle rénale où il est surexprimé. *FERMT2* participe à la conversion des fibroblastes en myofibroblastes et à la transition des cellules épithéliales en cellules mésenchymales en activant la voie ERK1/2, Akt et TGF β (Rognoni et al., 2016). L'activation de cette même voie par *FERMT2* a aussi été décrite, notamment dans le cas de l'invasion du cancer du sein.

De plus, *FERMT2* est une protéine clé dans le développement du muscle cardiaque et muscle squelettique. Cependant, malgré son rôle dans la myogénèse et l'élongation des myocytes, aucune mutation de *FERMT2* n'a été caractérisée chez les patients atteints de pathologies cardiaques génétiques (Rognoni et al., 2016).

Enfin, il est déjà connu dans la littérature que l'ARNm de *FERMT2* est une cible des miRs. En effet, Sossey-Alaoui and Plow ont reporté que l'expression de *FERMT2*, surexprimée dans le cadre du cancer de la prostate, est diminuée après la fixation du miR-138 dans la région 3'UTR de *FERMT2*. L'inhibition de l'expression de *FERMT2* par ce miR est associée à une augmentation de l'apoptose et la mort des cellules cancéreuses après inhibition de la voie des intégrines (Sossey-Alaoui & Plow, 2016). Ces résultats suggèrent donc l'implication des miRs dans la modulation de l'expression dans le cadre du cancer. *FERMT2* étant un facteur de risque génétique pour la MA (Lambert et al., 2013), la modulation de son expression par d'autres miRs pourrait être possible dans le cas d'autres maladies comme la MA.

11- Les micro-ARNs, potentiels modulateurs du métabolisme de l'APP

Pour notre criblage HCS, l'évaluation de la capacité d'un gène à moduler le métabolisme de l'APP est mesurée après l'induction de la baisse d'expression de ce gène suite à la transfection de siRNAs. A des niveaux endogènes, cette régulation d'expression peut intervenir par l'intermédiaire de micro-ARNs ou miRs.

11.1- Synthèse des micro-ARNs

Les miRs sont de petits ARN non-codants (environ 20-23 nucléotides) qui modulent l'expression des gènes. La transcription des miRs donne tout d'abord des miRs primaires ou pri-miRs de 1 à 4 kb. Ces longs pri-miRs sont ensuite clivés dans le noyau par le complexe Drosha/Pasha (Pasha pour Partner of Drosha), où Drosha est une RNase III endonucléase qui coupe les deux brins pour donner les précurseurs des miRs, les pré-miRs. Ces derniers sont ensuite exportés vers le cytoplasme grâce au transporteur nucléaire exportin-5, puis clivés au niveau de la structure en épingle à cheveux (« hairpin ») par un complexe contenant la RNase III endonucléase Dicer. Le brin mature du miR, avec la protéine Ago (Argonaute), guide ensuite le complexe multi-protéique RISC (RNA-induced silencing complex) vers les ARN messagers (ARNm) cibles. L'interaction des miRs avec la région 3'UTR des ARNm cibles (complémentarité parfaite ou presque) permet l'inhibition de la traduction en protéines ou bien la dégradation des ARNm cibles grâce au clivage de ces derniers (Bartel et al., 2008; Sethupathy & Collins, 2008; Winter et al., 2009) (Figure 15). Il a été suggéré que lorsque la séquence du miR est parfaitement complémentaire à celui de l'ARNm, le miR clive cet ARNm, alors que si la complémentarité des deux n'est pas suffisante, le miR conduit à une inhibition de la traduction (Bartel et al., 2004).

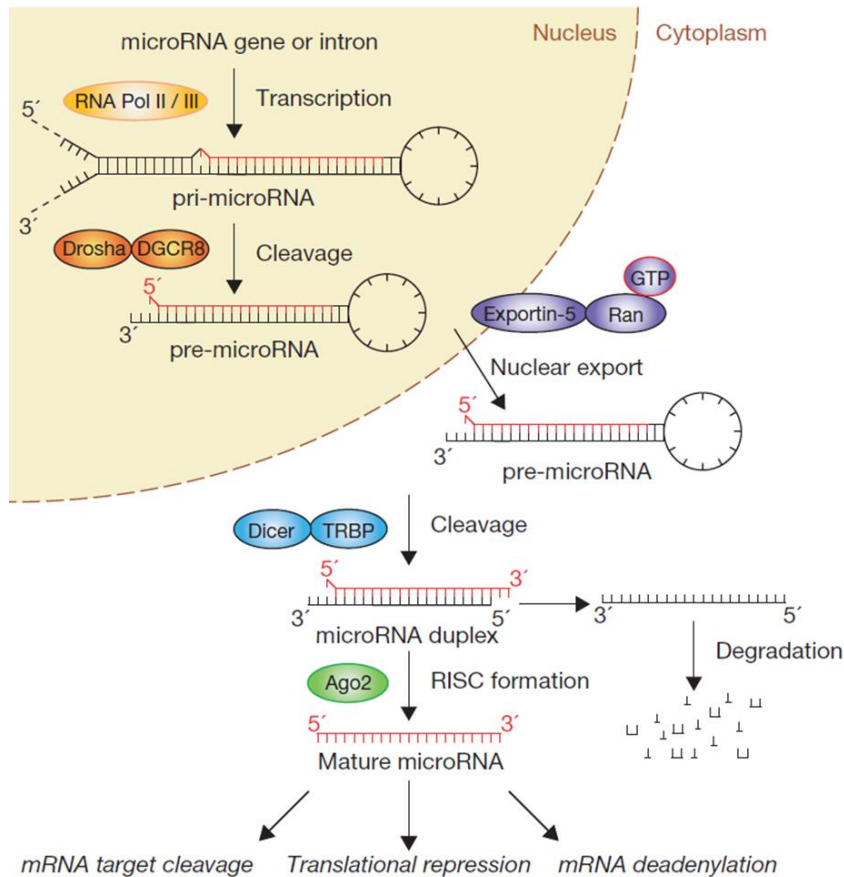


Figure 15 : Schéma représentant la voie canonique de synthèse des miRs (Winter et al., 2009).

11.2- Rôles des micro-ARNs dans les fonctions neuronales

Parce que chaque miR peut cibler des centaines d'ARNm différents et réguler de multiples voies biologiques différentes, il est attendu que des mutations altérant le site de fixation des miRs aux ARNms cibles ou bien créant de nouveaux sites de fixation, peuvent donc conduire à des modulations de l'expression de protéines et être à l'origine de plusieurs pathologies (Sethupathy & Collins, 2008). Les miRs jouent un rôle important dans le cerveau où ils sont essentiels pour les fonctions neuronales et la survie (Hébert & Delay, 2011). En effet, certains miRs sont retrouvés au niveau des dendrites et des synapses matures. En effet, une activité neuronale importante augmente le transport des miRs vers les dendrites où leurs rôles diffèrent. Par exemple, les miR-124 et miR-132 ont tous deux un rôle dans la croissance des neurites en régulant l'activité des petites GTPases Rho connues pour contrôler le cytosquelette d'actine. D'autres miRs, comme le miR-138, ont un rôle dans la formation et la maturation des synapses. La fonction des miRs dans la

plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémoire a été montrée seulement chez des modèles invertébrés (Schratt, 2009).

11.3- Implication des micro-ARNs dans la MA

La sur- ou sous-expression de certains de ces miRs ou de leurs ARNm cibles a d'ailleurs été montrée pour être impliquée dans la MA (Delay et al., 2016; Patrick et al., 2017). Par exemple, les miR-106 et miR-101 sont déjà connus pour moduler le niveau d'expression d'APP tandis que les miR-29 et miR-107 modulent le niveau d'expression de BACE1 (Hébert & Delay, 2011), tous deux pouvant conduire à l'augmentation de la production de peptides A β . Ces données suggèrent fortement que les miRs modulent le métabolisme de l'APP. Cependant, la multitude de miRs ne permet pas de tous les analyser un par un par des approches fonctionnelles classiques. Une approche systématique comme l'HCS serait nécessaire afin d'identifier d'autres miRs responsables d'une modulation du métabolisme de l'APP.

12- Hypothèse de travail

Conformément à l'hypothèse de la cascade amyloïde, des variations d'expression des gènes régulant le métabolisme de l'APP seraient impliquées dans le développement de la MA en favorisant la production des peptides amyloïdes. Ces dernières années, le laboratoire a entrepris d'identifier de tels gènes parmi les facteurs génétiques identifiés par les GWAS. Cependant, comme nous l'avons vu, les GWAS génèrent des signaux complexes incluant de multiples gènes candidats.

Dans ce contexte la mise en place de stratégie d'analyse à haut débit au travers du développement d'une approche HCS nous a permis d'identifier, à l'échelle du génome, des gènes dont la variation d'expression influence le métabolisme de l'APP. Il s'agit maintenant de savoir si de telles variations d'expression peuvent intervenir au cours du processus physiopathologique. Notre hypothèse de travail est basée sur le rôle potentiel des miRs dans la dérégulation des gènes régulateurs du métabolisme de l'APP qui pourraient favoriser le développement de la MA (Figure 16). De plus, la fixation des miRs dans la région 3'UTR de leurs ARNm cibles peut être conditionnée par la présence de variants associés au risque de développer la MA. De tels variants ajouteraient ainsi un degré de complexité supplémentaire dans la régulation de l'expression des gènes GWAS et le contrôle du métabolisme de l'APP. Afin de valider cette hypothèse, il sera alors nécessaire d'évaluer l'impact des allèles de ces variants sur la fixation des miRs et le niveau d'expression des gènes cibles. Finalement, il restera à identifier les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer

les conséquences de la variation de ces gènes sur le métabolisme de l'APP et le processus physiopathologique.

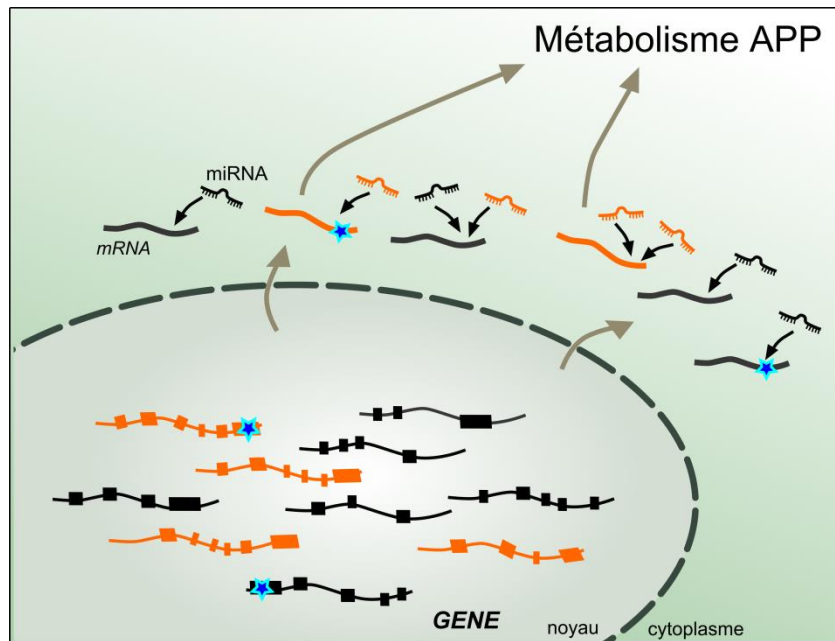


Figure 16 : Hypothèse de travail. En orange, les gènes, ARNm ou miRs capables de réguler le métabolisme de l'APP identifiés par HCS. Les étoiles représentent les variants localisés dans la région 3'UTR des gènes et localisés dans les séquences ciblées par les miRs.

13- Limitations et stratégie adoptée

Du fait de la courte séquence des miRs, qui peut être retrouvée à de multiples reprises dans le génome, il est difficile de prédire les gènes ciblés par les miRs par des approches purement *in silico*. Afin de contourner cette limitation, nous chercherons, dans un premier temps, à identifier les miRs modulant le métabolisme de l'APP. Pour cela, nous utiliserons notre modèle HCS permettant d'évaluer un à un l'impact de 2555 miRs différents. Il devrait alors être possible de prédire pour les miRs régulateurs du métabolisme de l'APP, quels sont leurs gènes cibles parmi ceux que nous avons précédemment identifiés comme modulateurs du métabolisme de l'APP. De cette façon, la combinaison des résultats issus de criblage HCS de banques de siRNAs et miRs devrait nous permettre de mieux appréhender la complexité de la régulation des gènes régulant la production des peptides amyloïdes. Parmi ces gènes, nous chercherons à identifier les facteurs génétiques présentant des variants associés au risque de développer la maladie et capables d'influencer la fixation de ces miRs. Les variations d'expression induite par les miRs peuvent être évaluées par l'intermédiaire d'un gène rapporteur. Cependant, les nouvelles techniques basées sur l'utilisation du

système CRISPR-Cas9 sont susceptibles de recréer plus fidèlement l'impact d'un variant dans des conditions de régulations endogènes. Finalement, notre modèle de criblage HCS reposant sur l'utilisation d'une lignée de cellules HEK293, nous procéderons à l'évaluation de l'impact de la variation d'expression des gènes identifiés dans des cultures primaires de neurones d'hippocampe. Ceci nous permettra d'étudier les mécanismes moléculaires potentiellement impliqués en lien avec les fonctions connues de l'APP dans les neurones.

A thick blue vertical bar runs down the left side of the page. A blue arrow points from the bar towards the right, pointing to the text.

MATERIELS ET METHODES

1- Modèles cellulaires

1.1- Lignée HEK293 et HEK293^{rs7143400-G/T} éditée par CRISPR/Cas9

1.1.1- Entretien

Les cellules HEK293 constituent une lignée immortalisée embryonnaire humaine de reins dans lesquelles nous avons surexprimé stablement l'APP^{695wt} (HEK-APP). Les cellules sont maintenues dans du milieu DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, Gibco®) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 50 U/ml de pénicilline/streptomycine (Invitrogen®) et 2mM de L-glutamine (Invitrogen®) à 37°C dans une atmosphère humide et 5% de CO₂. A confluence et après lavage des flasques avec du PBS 1X (0,17 M NaCl, 3,3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ et 1,8 mM KH₂PO₄), les cellules sont trypsinées (Trypsine-EDTA 0,05%, Invitrogen®) pendant 5 minutes puis diluées au 1/5 pour être ensemencées dans de nouvelles flasques contenant du milieu de culture. Pour réaliser les expérimentations de western blot, les cellules sont ensemencées à raison de 100 000 cellules par puits (plaque 24 puits, Falcon®).

1.1.2- Système CRISPR/Cas9

Le vecteur de nucléase GeneArt CRISPR OFP (vecteurCas9/ARNg) (ThermoFisher Scientific) permet l'expression de l'endonuclease Cas9 et de l'ARN guide (ARNg) 5'-GTTTTCAATTCATGGCCCTA-3' ciblant la région du variant rs7143400. Ce vecteur a été co-transfecté dans les cellules HEK293 avec l'ADN donneur (5'TCATGTTATGATATAATAAACTGAATTTGTCACACATTCCTTAGGGCCATGAATTGAAAAGTAAATAGT-3') (Figure 17) qui correspond à un oligonucléotide double brins de 71pb comportant l'allèle T du variant rs7143400 flanqué de deux bras homologues à la région ciblée. Les cellules éditées, porteuses de l'allèle T, sont identifiées par génotypage par RFLP après isolation clonale par la technique de dilution limite.

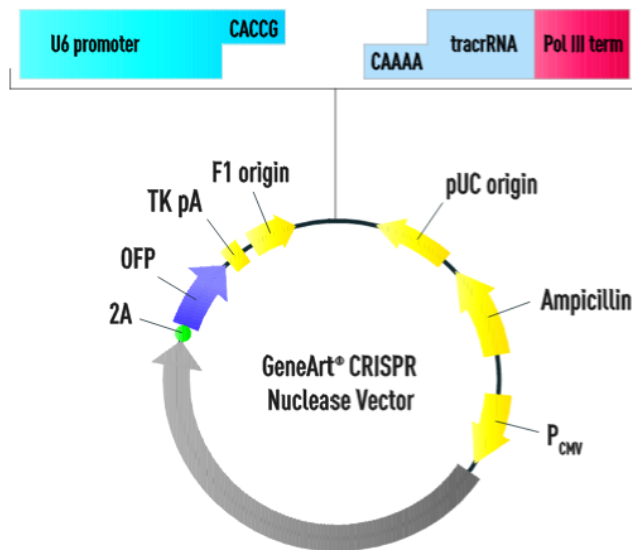


Figure 17 : Carte du vecteur de nucléase CRISPR (vecteur Cas9/ARNg). Le vecteur comporte une cassette d'expression de la protéine Cas9 (représenté en gris) relié par un peptide 2A à une cassette d'expression d'une protéine orange fluorescente (OFP), sous la dépendance d'un promoteur CMV (P_{CMV}). Le vecteur comporte une cassette de clonage des ARN guides liée à la séquence d'un *trans-activating crRNA* (tracrRNA) sous la dépendance d'un promoteur U6 (U6 promoter), et suivi d'un signal de terminaison (Pol III term). La présence du gène de résistance à l'ampicilline (Ampicillin) facilite le clonage en permettant la sélection du plasmide.

1.2- Lignée HeLa

Les cellules HeLa constituent une lignée immortalisée humaine dérivée de cellules cancéreuses du col de l'utérus. Les cellules sont maintenues dans du milieu MEM (Minimum Essential Medium) (Gibco®) également supplémenté avec 10% de SVF, 50 U/ml de pénicilline/streptomycine (Invitrogen®) et 2mM de L-glutamine (Invitrogen®) à 37°C dans une atmosphère humide et 5% de CO₂. Comme pour les cellules HEK293, les cellules HELA confluentes sont rincées au PBS 1X (0,17 M NaCl, 3,3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ et 1,8 mM KH₂PO₄) puis trypsinées (Trypsine-EDTA 0,05%, Invitrogen®) pendant 5 minutes et diluées au 1/5 pour être ensemencées dans de nouvelles flasques contenant du milieu de culture. Pour réaliser les expérimentations de western blot, les cellules sont aussi ensemencées à raison de 100 000 cellules par puits (plaque 24 puits, Falcon®).

1.3- Culture Primaire Neuronale de rats nouveaux-nés

Les cultures primaires neuronales ont été obtenues à partir d'hippocampes de rats nouveaux-nés (P0) selon le protocole précédemment décrit (Kaech & Banker, 2006). Après dissection, les hippocampes sont

rincés trois fois dans du HBSS (HBSS, 1M HEPES, pénicilline/streptomycine, 100mM sodium pyruvate Gibco®) et dissociés après une digestion à la trypsine (2,5%, 37 °C) pendant 7 min. Suite à une incubation pendant 1 min avec de la DNase (5 mg/mL, Sigma), les hippocampes sont rincés trois fois dans du milieu MEM supplémenté avec 10% SVF, 1% Glutamax, 0.8% MEM vitamines, 0.5% penicilline/streptomycine et 0.45% D-glucose (Sigma). A l'aide d'une pipette, les hippocampes sont broyés et resuspendus dans du milieu Neurobasal A (Gibco®) supplémenté avec 2% B27 (Gibco®) et 0.25% Glutamax. Enfin, les neurones sontensemencés dans des plaques de 24 puits (Falcon®) à hauteur de 200 000 cellules par puits ou dans les microfluidiques à hauteur de 50 000 cellules par compartiment pré- et/ou –post-synaptique, préalablement coâtés avec la poly-L-lysine (0.1mg/mL, Sigma Aldrich P6282) dans du tampon Borate (0.31 % acide borique, 0.475 % sodium tétraborate, pH 8.5).

2- High Content miRNA Screening

Les criblages de siRNAs et miRs ont été réalisés en deux temps, en conservant le même protocole.

2.1- Criblages de siRNAs et miRs

La banque de siRNAs (siGENOME SMARTpool) ciblant 18107 gènes et la banque mirVana miRNA mimics library (Ambion) ciblant 2555 miRs ont toutes deux été criblées dans des cellules HEK293 surexprimant stablement un APP doublement marqué par les tags mCherry et YFP au niveau N-terminal et C-terminal respectivement (HEK293-mCherry-APP^{695WT}-YFP). Tout d'abord, concernant la banque de siRNAs, 10 nL de chaque siRNAs sont transférés à une concentration de 10 µM en plaques 384 puits grâce au gestionnaire de liquide Echo 555. Pour la banque de miRNA, 250 nL de chaque miR de la banque ou 50 nL du miR contrôle négatif (miR-NT) sont transférés à une concentration de 50 nM dans les plaques 384 puits. Ensuite, dans les deux cas la transfection est réalisée en distribuant une solution de 10 µL D-PBS 1X contenant 0.1 µL de l'agent de transfection Lipofectamine™ RNAiMax, dans chaque puits grâce au distributeur BioTek EL406. Après 30 min d'incubation à température ambiante (TA), 40 µL de cellules HEK293-mCherry-APP^{695WT}-YFP sontensemencées dans les puits de la même façon pour obtenir une densité de 3000 cellules par puits et incubées pendant 72H à 37°C en atmosphère humide sous 5% de CO₂. Après 72H de transfection, les cellules sont incubées avec 1,8 µg/mL de Hoechst 33342 pendant 30 minutes à 37°C en atmosphère humide sous 5% de CO₂. Après avoir retiré le milieu des puits, les cellules

sont fixées en ajoutant 40 μL de formalin 10% toujours à l'aide du distributeur BioTek EL406 pendant 20 min à TA. Enfin, les cellules sont conservées dans du D-PBS 1X en attendant d'être imagées. Les images sont acquises à l'objectif 20X grâce au microscope confocal à haute résolution, automatisé, In Cell Analyser 6000.

2.2- Quantifications et analyses HCS

L'analyse et la quantification des images est réalisée au moyen du logiciel d'analyses d'images Columbus 2.7 (Perkin Elmer). Le marquage au Hoechst est utilisé pour le dénombrement des cellules tandis que l'intensité des marquages mCherry et YFP sont quantifiés. L'intensité moyenne de la fluorescence des deux signaux mCherry et YFP est normalisée par le fold change des puits transfectés avec le miR contrôle négatif de la même plaque. L'établissement de contrôles positifs et négatifs est validé par le score $\beta (>3)$. En effet, ce facteur est calculé pour chaque triplicat pour l'intensité GFP et permet de déterminer si la différence entre les fluorescences des puits contrôles négatifs et positifs est significative.

3- Transfections de siRNAs et des miRs

Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules sontensemencées en plaques de 24 puits à une densité de 100 000 cellules/puits. Les transfections transitoires de siRNAs (siNT non targeting D0018100105 ou siFERMT2 L01275300, Dharmacon) ou des miRs (miR-NT non targeting, miR-4504, miR220-3p, miR221-3p, miR222-3p ou miR582-5p mirVana miRNA Mimic, Ambion) sont réalisées avec la lipofectamine RNAimax (Invitrogen) en respectant le ratio ADN(μg)/agent de transfection(μL) de 1/3. Brièvement, 1 μg de siRNA ou 1 μL de miR à 50 μM et 3 μL de Lipofectamine RNAimax sont ajoutés à 100 μL de milieu OPTI-MEM (Gibco). Après 5 min d'incubation à température ambiante, 50 μL de mélange est ajouté dans chaque puits de culture. Quarante-huit heures après la transfection, les cellules sont lysées pour la réalisation de Western Blot (WB).

4- Validation de l'impact des miRs sur l'expression d'un gène rapporteur

Le test de dosage de l'activité luciférase (Luciferase Reporter Assay System) est un outil permettant de mesurer l'expression de gènes au niveau transcriptionnel. La luciférase est une enzyme oxydative qui permet d'émettre de la lumière via une réaction chimique dans laquelle la luciferine est convertie en oxyluciferine.

Les cellules HEK293 sont co-transfectées avec 0.5µg du vecteur psiCHECK-2 exprimant la région 3'UTR de *FERMT2* contenant ou non l'allèle T du polymorphisme de rs7143400 (HEK293^{rs7143400-G/T}), en amont du gène de la luciférase (Figure 18), avec 0.5 µL de miRNA à 50 µM (miR-NT, miR-4504, miR220b-3p, miR221-3p, miR222-3p ou miR582-5p) et l'agent de transfection lipofectamine RNAimax afin de respecter un ratio 1/3.

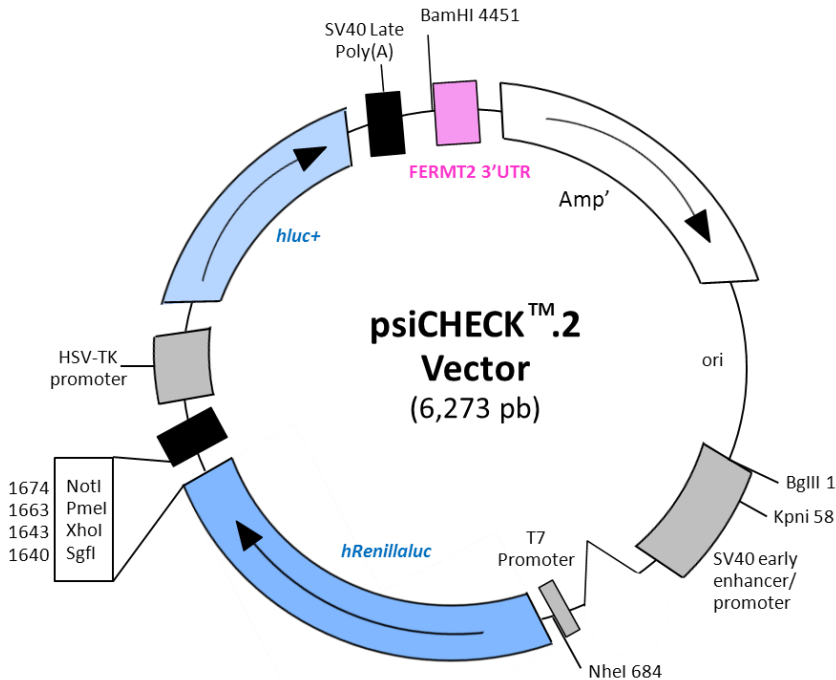


Figure 18 : Représentation schématique de la carte du vecteur psiCHECK.2, vecteur d'expression de la région 3'UTR de *FERMT2*^{WT} ou *FERMT2* exprimant le variant rs7143400.

Après 48H, les cellules sont rinçées au PBS 1X puis le protocole est effectué en suivant les instructions du fournisseur et en utilisant les réactifs du kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). Les cellules sont incubées avec le réactif PLB 1X (passive lysis buffer) pendant 15 min à TA. Les lysats cellulaires sont ensuite déposés en plaque de 96 puits auxquels est ajouté le réactif LAR II (Luciferase Assay Reagent II) contenant le substrat de la luciférase. Après lecture de l'activité luciférase au luminomètre VICTOR, une solution STOP&GLO est ajoutée permettant de stopper l'activité luciférase. Une seconde lecture au luminomètre est alors nécessaire pour permettre la lecture de l'activité *Renilla* qui permet de normaliser l'activité luciférase.

5- Transductions lentivirales

Les vecteurs Mission shRNA (Sigma-Aldrich) shNT (Non-Mammalian shRNA Control, shC002), shFERMT2 (TRCN0000191859), shAPP (TRCN0000006707) et les vecteurs GeneArt (pLenti6 empty vector) Mock ou incluant l'ADNc de FERMT2^{WT} ou FERMT2^{QW} ont été utilisés. Les transductions lentivirales sont réalisées à DIV 1 (Day *in vitro*), à MOI 10 (Multiplicity of Infection), c'est-à-dire à une concentration de 10 particules virales par cellule dans les microfluidiques ou MOI2 ou MOI4 dans les plaques de cultures. Dans le cas de co-transduction en microfluidiques, une MOI de 5 est utilisée pour chaque lentivirus. Brièvement, les virus sont dilués à la concentration désirée dans le milieu de culture contenant du polybrène (4µg/mL Hexadimethrine bromide). Ce polymère permet ici d'augmenter l'efficacité de la transduction. Six heures après la transduction, du milieu de culture est ajouté dans les puits.

6- Western Blot

Le western blot est une technique dite semi-quantitative qui permet de mesurer spécifiquement l'expression d'une protéine au sein d'un mélange protéique complexe. Des quantités équivalentes de protéines sont récupérées dans une solution de lyse RIPA (Tris 1M, NaCl 1.5M, NP-40 0.1%, SDS 10%, sodium orthovanadate 100mM, sodium deoxycholate 0.5%, pH 7.4) contenant des inhibiteurs de protéase (Complete mini, Roche Applied Science®) et dénaturante (Nu-PAGE LDS Lithium Dodecyl Sulfate et agent réducteur, Invitrogen®). Les échantillons sont ensuite dénaturés à 95°C pendant 10 min puis soniqués et soumis à une électrophorèse en gels polyacrylamide (NuPage® Bis-Tris Gels, 4-12%, Invitrogen) dans du tampon de migration MOPS (MOPS acide 3-morpholino-1-propanesulfonique SDS Running Buffer, Invitrogen®). L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS), est une technique qui permet la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire sous l'influence d'un champ électrique. Les protéines qui ont migré sur gel sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,2 µm grâce au système Biorad Trans-Blot Turbo transfert Pack (BioRad®) selon les instructions du constructeur. Une fois le transfert effectué, la qualité du transfert et la quantité de protéines sont évaluées grâce à une incubation des membranes dans une solution de rouge Ponceau (5% acide acétique, 0.1% rouge Ponceau) dont la coloration est réversible. Les membranes sont ensuite incubées dans une solution de TNT (0,05 % Tween 20, 20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, pH 8) contenant 5% de lait pendant 1H à TA. Cette étape de saturation non spécifique permet de bloquer les sites de fixations aspécifiques des anticorps primaires. Ces derniers sont incubés pendant la nuit à 4°C selon le tableau suivant (Tableau 1) dans une solution de saturation (SuperBlock™ -T20 (TBS) Blocking buffer, Thermo Scientific).

Tableau 1 : Conditions des anticorps utilisés pour les différentes protéines d'intérêt étudiées.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Dilution
FERMT2	GeneTex	GTX84507	1/1000
APP Cter	Sigma Aldrich	A8717	1/1000
Synaptophysin I	Synaptic System	101011	1/5000
PSD95	Synaptic System	124014	1/1000
Actine	Sigma Aldrich	A1978	1/5000
APP 6E10 β -Amyloid, 1-16 Antibody	Biologends	SIG-39320	1/5000
GAPDH	Millipore	AB2302	1/10000

Le lendemain, trois rinçages de 5 minutes sont effectués avec du TNT avant d'incuber les membranes une nouvelle fois avec les anticorps secondaires, couplés à une peroxydase pendant 1H à TA. Trois nouveaux rinçages au TNT sont effectués et la révélation des membranes par chimioluminescence est réalisée après incubation de ces dernières avec l'ECL (Enhanced Chimioluminescent) (Immobilon® Classico Western HRP substrate, Millipore) pendant 20 secondes.

7- Biotinylation des protéines de surface

Les expériences de biotinylation sont réalisées selon les recommandations du fournisseur (Cell Surface Protein Isolation Kit, Pierce). Après 48h de transduction, les protéines de surface sont biotinylées par la sulfo-NHS-SS-biotine (sulfosuccinimidyl-20(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionate) pendant 30 min à 4 °C sous agitation lente. Les cellules sont ensuite lysées et immunoprécipitées avec des billes de streptavidin. Les protéines précipitées sont enfin éluées dans une solution contenant 50mM de DTT (Dithiothréitol) et dénaturées à 95°C pendant 5 minutes avant d'être déposées sur gel pour la réalisation du WB.

8- Co-Immunoprécipitation

Des quantités équivalentes de protéines sont tout d'abord récupérées dans du tampon de co-immunoprécipitation (HEPES 10mM, NaCl 140 mM, NP-40 0.5%, pH7.4) contenant des inhibiteurs de protéases (Complete mini, Roche Applied Science®) et un inhibiteur de phosphatases (sodium orthovanadate 100mM) puis incubées pendant la nuit à 4°C sous agitation lente avec l'anticorps primaire. Le lendemain, la co-immunoprécipitation est effectuée grâce au kit Pierce Protein A/G magnetic beads (Thermo Scientific, 88802) selon les instructions du fournisseur. Les complexes protéines/anticorps formés sont incubés avec 25 µL (0.25 mg) de billes magnétiques A/G, préalablement lavées trois fois avec du tampon de co-immunoprécipitation. Après 1H d'incubation à 4°C, les surnageants sont récupérés afin de vérifier l'efficacité de l'immunoprécipitation et les billes magnétiques sont lavées 3 fois avec le tampon de co-immunoprécipitation afin d'éliminer les protéines non-fixées. Les protéines fixées aux billes, sont ensuite resuspendues dans le tampon de dépôt (LDS + agent réducteur) pendant 10 min à TA puis les billes sont retirées à l'aide du portoir magnétique avant d'effectuer un WB.

9- Microfluidiques

La microfluidique est la manipulation de volume de l'ordre du microlitre (Peyrin et al., 2011) dans des structures micrométriques composées de compartiments reliés entre eux par des micro-canaux. Au laboratoire, un modèle de microfluidique à façon a été créé. Ce modèle se compose de trois compartiments différents (pré-synaptique, synaptique et post-synaptique) séparés entre eux par des micro-canaux (Figure 19A). L'utilisation de microfluidique permet de nombreux apports par rapport aux supports de culture classique. Tout d'abord ils permettent de contrôler la morphologie neuronale pour isoler spécifiquement les axones et évaluer leurs comportements. En effet, la présence des micro-canaux asymétriques séparant les différentes chambres sert de filtre sélectif pour les axones et de barrière pour les corps cellulaires (Peyrin et al., 2011; Taylor et al., 2010). Ceci impose une direction aux axones qui croissent vers la chambre synaptique et pas dans le sens opposé. Dans notre modèle, les longs micro-canaux permettent le passage exclusif d'axones alors que les micro-canaux plus courts, permettent à la fois le passage d'axones et de dendrites, beaucoup plus courts et plus fins que les axones (Figure 19B). Les microfluidiques permettent également de contrôler des milieux indépendants dans chaque compartiment de façon spatio-temporelle. En effet, l'isolation est établie par une différence de volume dans les différentes chambres créant une pression hydrostatique. Les micro-canaux exercent également une résistance permettant de conserver des

microenvironnements distincts tout en exerçant une diffusion faible mais soutenue entre les compartiments (Kim et al., 2012). Il est alors possible de manipuler génétiquement et visualiser les synapses avec les neurones pré- et post-synaptiques de façon totalement indépendante (Taylor et al., 2010).

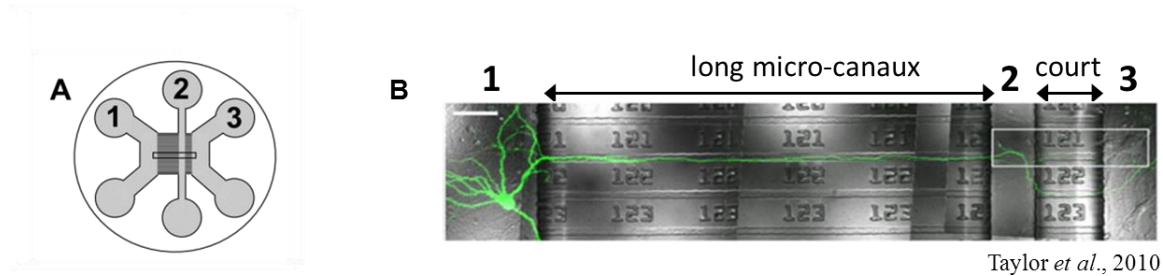


Figure 19 : Schéma représentant un modèle de microfluidique à façon. **A**, Le modèle de microfluidique entier possède trois chambres différentes reliées entre elles par des micro-canaux. **B**, Les longs canaux permettent le passage exclusif d'axones tandis que les micro-canaux plus courts, permettent le passage d'axones et de dendrites (Taylor et al., 2010). **1** : Compartiment pré-synaptique, **2** : compartiment central, synaptique, **3** : compartiment post-synaptique.

Les microfluidiques développés au laboratoire sont réalisés à base de Polydiméthylsiloxane (PDMS) (Sylgard™ 184 Silicone Elastomer Kit). L'usage du PDMS permet d'obtenir un polymère biocompatible transparent, imperméable aux liquides et perméable aux gaz, mais surtout de produire rapidement de nombreux supports facilement utilisables (Taylor et al., 2010).

Brièvement, le curing agent (Sylgard™ 184 Silicone Elastomer Kit) est ajouté à la base à un ratio 1 : 9. Après dégazage, le mélange est incubé pendant 2H à 70°C dans les moules (ou répliqués) pour permettre la polymérisation et la solidification du PDMS. Les puits des microfluidiques sont percés à l'aide de trépan de biopsie (4mm pour les puits des compartiments pré- et post-synaptiques et 3mm pour les puits du compartiment central, synaptique) et rincés à l'isopropanol. Le microfluidique est ensuite fixé par des liaisons covalentes, irréversibles sur une lamelle en verre grâce à un procédé permettant de rendre toutes les surfaces (lamelles en verre et microfluidiques) ionisantes et donc adhérentes. Une fois les microfluidiques sur lamelles, ils sont stérilisés sous lumière ultra-violette (UV).

10- Vidéo-microscopie

10.1- Mesure de la vitesse de la croissance axonale

Dans le cadre des expériences de croissance axonale, les neurones issus de cultures primaires d'hippocampes ont été ensemencés seulement dans le compartiment pré-synaptique (1) des microfluidiques (Figure 19A). La transduction lentivirale a été effectuée après 1 jour in vitro (DIV 1) avec les différents lentivirus permettant de sous-exprimer ou sur-exprimer les gènes d'intérêts. Après 5 jours in vitro (DIV 5), une fois que les axones ont traversé les longs micro-canaux et ont atteint le compartiment synaptique central, la vidéo-microscopie est réalisée. Tout d'abord, le milieu est changé par du milieu Neurobasal A sans rouge de phénol (permettant une meilleure visibilité au microscope) supplémenté avec du Glutamax, B27 2%, et HEPES 25mM. L'ajout d'HEPES permet ici de réaliser la vidéo-microscopie dans une chambre à 37°C sans CO₂. La microscopie est réalisée en contraste de phase pendant 1H50 avec une acquisition toutes les 10 minutes (Microscope Zeiss, AxioObserver Z1 Vidéo-DG4). Une fois la vidéo terminée, les microfluidiques sont fixés pour la réalisation d'immunofluorescences pour FERMT2, l'APP et l'Actine. Ces immunofluorescences ont permis d'observer plus précisément la taille et la morphologie des cônes de croissance selon les conditions.

Les vidéos ont été analysées au moyen du logiciel Fiji et le tracking de ces axones par le plugin MTrackJ, a permis d'évaluer la vitesse de croissance axonale.

10.2- Mesure du flux rétrograde d'actine et dispersion angulaire

Pour visualiser la dynamique des filaments d'actine (F-actin) dans les cônes de croissance pendant l'élongation axonale, les microfluidiques sont liés dans des chambres sur lamelles (LabTek, Thermo Fisher 1555361) puis les neurones sont co-transduits à DIV 1 avec un lentivirus LifeAct-Ruby (pLenti.PGK.LifeAct-Ruby.W, Addgene) en plus des lentivirus utilisés précédemment. A DIV 5, les cônes de croissance exprimant le LifeAct-Ruby sont imagés par vidéomicroscopie (Nikon, spinning disk Yokogawa) avec une acquisition toutes les 2 secondes pendant 6 à 8 minutes. Les vidéos sont ensuite analysées grâce à l'outil de tracking du logiciel Imaris (Bitplane) qui reporte la vitesse ainsi que la direction des spots d'actine durant leur mouvement rétrograde. Les tracks ayant moins de 3 points sont exclus de l'analyse. Pour la dispersion angulaire des filopodes (0 pour un mouvement unidirectionnel et 1 pour une distribution uniforme), nous avons conservé les tracks de F-actin plus longs que 0.3 µm.

11- Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage qui permet de déterminer la localisation cellulaire voire subcellulaire d'une protéine ou encore de mettre en évidence une colocalisation entre protéines. Les cellules sont fixées avec une solution de Paraformaldéhyde (PFA) 4% (10% Paraformaldéhyde, Electro Microscopy Sciences) diluée dans du PBS 1X pendant 15 min à température ambiante (TA) puis rincées trois fois pendant 5 min avec du PBS 1X avant de procéder à la perméabilisation des cellules. Cette étape permet la formation de pores dans la membrane cellulaire qui favorisent l'entrée des anticorps primaires et secondaires dans les cellules. Pour ce faire, les cellules sont incubées pendant 5 min à TA avec une solution de PBS 1X contenant 0,3 % de triton X-100 puis 3 rinçages de 5 min au PBS 1X sont réalisés. Les cellules sont ensuite incubées pendant 1h30 min à TA avec une solution de PBS 1X contenant 5% de sérum d'âne (Normal Donkey serum, Jackson Immunoresearch) afin de bloquer les sites de fixation aspécifiques des anticorps primaires. A l'issue de l'étape de saturation, les cellules sont incubées sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS 1X selon le tableau indiqué ci-après (Tableau 2). Le lendemain, l'échantillon est lavé 3 fois pendant 5 min avec du PBS 1X avant d'être incubé avec les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome (Alexa Fluor conjugated AffiniPure Fragment Donkey 488, 594 ou 648, Jackson Immunoresearch) à 1/500 dans du PBS 1X pendant 2H. Trois rinçages de 5 min sont de nouveau réalisés en ajoutant au premier d'entre eux, si nécessaire, du Hoechst 1/10 000 pour marquer les noyaux, ou de la SirActine 1/40 (SC001 SirActin Kit, Spirochrome) avant de monter les lamelles sur lames de verre ou les microfluidiques au moyen d'un milieu de montage glycérol 90%.

Tableau 2 : Conditions des anticorps utilisés pour les différentes protéines d'intérêt étudiées.

Anticorps	Fournisseur	Référence	Dilution
FERMT2	GeneTex	GTX84507	1/100
Kindlin2	Abcam	ab74030	1/100
APPC-ter	Sigma-Aldrich	A8717	1/100
APP A4 clone 22C11 (N-ter)	Millipore	MAB348	1/100
Synaptophysin I	Synaptic System	101011	1/500
Homer	Synaptic System	160006	1/1000
PSD95	Synaptic System	124014	1/500
α Tubulin	Millipore	MAB1864	1/200

Les lames sont analysées à l'aide d'un microscope confocal ZEISS LSM 710 ou LSM 880 tous deux équipés d'une diode UV et de 3 lasers dans le visible (un laser argon multi-raies à 458 nm, 477 nm, 488 nm, et 514 nm et deux lasers hélium-néon à 543 nm et 633 nm).

12- RNA View

Le RNA View est une technique permettant de détecter des molécules d'ARN dans les cellules. Le protocole est réalisé à l'aide du kit ViewRNA Cell Plus Assay (ThermoFischer Scientific) selon les instructions du fournisseur. Après fixation au paraformaldéhyde 4% (10% Paraformaldéhyde Electro Microscopy Sciences) pendant 15 min et perméabilisation (PBS 1X, 0,3% Triton X-100), les cellules sont rincées trois fois avec une solution PBS 1X contenant un inhibiteur de RNase. Les cellules sont ensuite incubées avec les différentes sondes pendant 2H à 40°C et par hybridation fluorescente in situ (FISH), les sondes spécifiques se fixent sur les miRs ou ARN messagers (ARNm) cibles. Après quelques lavages successifs, les sondes sont amplifiées, d'abord dans une solution de pré-amplification, puis dans une solution d'amplification pendant 1H à 40°C chacune. Cette technique d'amplification de l'ADN séquentielle, utilise des systèmes d'amplification du signal indépendants mais compatibles pour permettre la détection simultanée jusqu'à quatre transcrits d'ARN dans les cellules. Enfin, les cellules sont incubées dans une solution contenant des sondes

nucléotidiques marquées avec des fluorophores qui permettent la détection des miRs ou ARNm sous forme de punctas au microscope (Figure 20).

Cette technique peut être couplée à la technique d'immunofluorescence décrite précédemment.

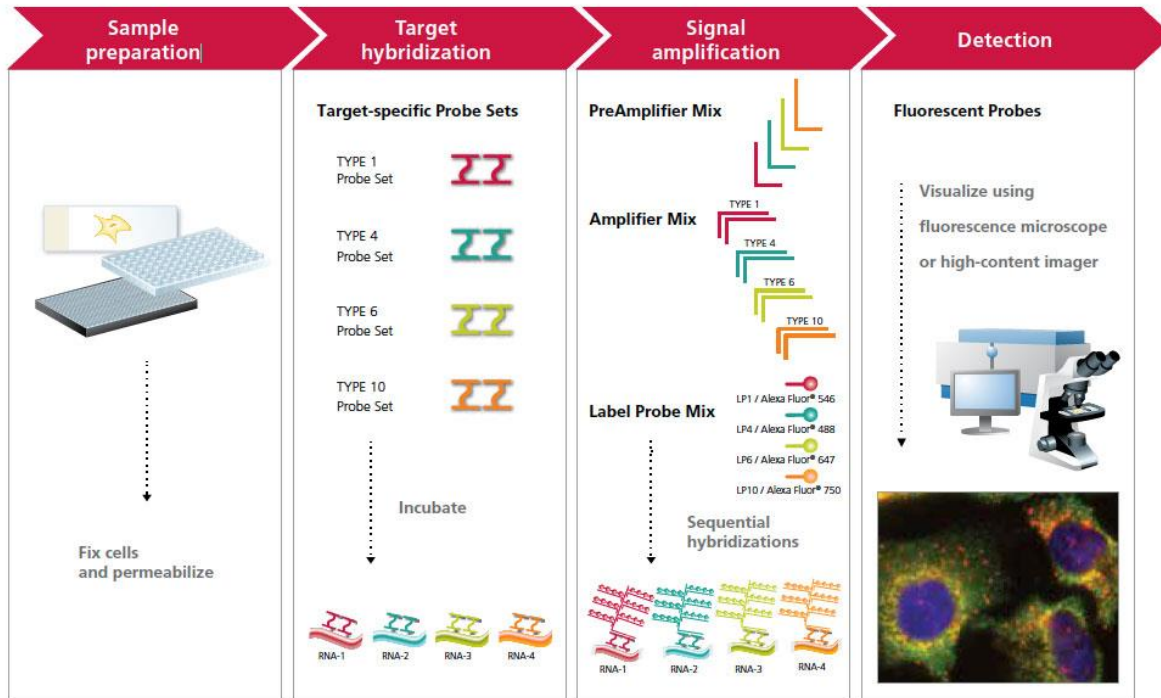


Figure 20 : Représentation schématique des différentes étapes du protocole de la technique du RNA View.

13- Proximity Ligation Assay

La technique du Proximity Ligation Assay (PLA) permet la détection par immunofluorescence de deux protéines très proches de l'ordre de 40 nm. Cette technique a été réalisée en suivant les instructions du fournisseur et en utilisant les réactifs du kit Duolink® (Olink Bioscience).

Après fixation et perméabilisation, les cellules sont incubées dans une solution de saturation pendant 1H à 37°C suivi d'une solution contenant les deux anticorps primaires des deux protéines cibles pendant la nuit à 4°C (Figure 21A). Le lendemain, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à des sondes nucléotidiques compatibles, ou sondes PLA (Figure 21B), dirigées contre les anticorps primaires (Duolink® In Situ PLA® Probe anti-mouse PLUS et anti-Rabbit MINUS, Sigma-Aldrich) diluées au 1/5 dans la solution de saturation. Après deux lavages au PBS 1X, l'étape de ligation permet aux sondes nucléotidiques de se lier si elles sont suffisamment proches (40 nm) et de former des doubles brins (Figure 21C), grâce à

l'action d'une ligase diluée au 1/40 dans la solution de ligation du kit pendant 30 min à 37°C. Après deux étapes de lavages supplémentaires, l'ajout d'une solution d'amplification contenant une polymérase diluée au 1/80 pendant 1H40 à 37°C, permet d'amplifier le double brin par réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) uniquement s'il y a eu ligation entre les deux sondes (Figure 21D). Cette solution d'amplification contient également des oligonucléotides fluorescents qui s'hybrident aux produits d'amplification et permettent de mettre en évidence une colocalisation entre les protéines étudiées sous forme de punctas visibles au microscope confocal (Figure 21E). Cette technique peut également être couplée à la technique d'immunofluorescence classique pour permettre la réalisation de contremarquages en ajoutant les anticorps secondaires couplés à des fluorophores. Trois derniers lavages au PBS 1X sont nécessaires pour retirer l'excédent d'oligonucléotides marqués avant de monter les lames sur lamelles ou les microfluidiques au glycérol 90% comme pour l'immunofluorescence.

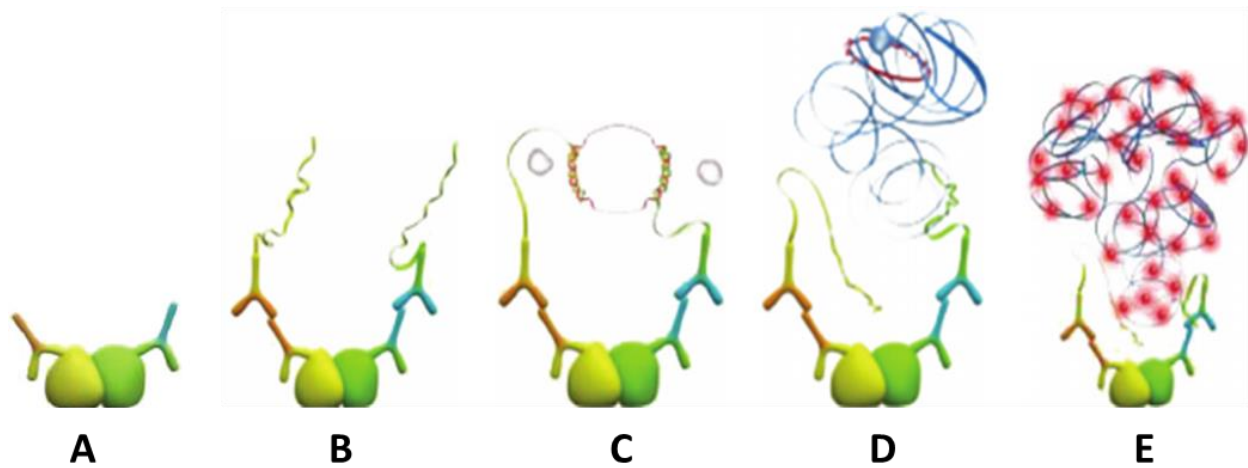


Figure 21 : Représentation schématique du mode de fonctionnement du PLA (Duolink®).

14- Quantification de la densité synaptique

Les expériences d'immunofluorescences, en microfluidiques, pour Synaptophysin I et Homer ont permis de quantifier la densité synaptique et plus précisément le pourcentage d'appariement entre ces deux marqueurs pré- et post-synaptiques respectivement. Les microfluidiques ont permis d'acquérir des images dans le compartiment synaptique et ainsi visualiser les synapses de façon indépendante des corps cellulaires. Les images acquises ont été analysées par le logiciel Imaris (Bitplane). La détection des punctas de Synaptophysin I (en rouge) et Homer (en vert) a permis de déterminer le nombre de spots mais aussi d'autres paramètres comme leur taille, leur volume et leur position selon les axes x, y et z dans l'image. Une fois, ces paramètres récupérés, les données ont été traitées sur Matlab afin de déterminer le

nombre de spots Homer par Synaptophysin I mais aussi le pourcentage de Synaptophysin I apparié à un ou plusieurs spot(s) Homer (seuil 1 μ m de distance entre les spots rouge et vert).

15- Extraction de synapses

Pour vérifier la présence de FERMT2 au niveau synaptique nous avons procédé à un fractionnement sub-cellulaire d'après le protocole de Frandemiche et al., 2014. Les neurones issus de cultures primaires mixtes sont resuspendus dans une première solution (0.32M sucrose et 10 mM HEPES, pH 7.4) puis centrifugés à 1000 g pendant 10 min pour retirer les noyaux et les débris. Le surnageant est de nouveau centrifugé à 12 000 g pendant 20 min pour éliminer la fraction cytosol. Le culot restant est lavé deux fois à 12 000 g pendant 20 min dans une deuxième solution (4Mm HEPES, 1mM EDTA, pH 7.4). Suite aux lavages, le culot est resuspendu dans une troisième solution (20mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, pH 7.2) pendant 1H à 4°C puis recentrifugé à 12 000 g pendant 20 min. Le surnageant issu de cette centrifugation correspond à la fraction « non-PSD », soluble dans le triton. Le culot quant à lui, est resuspendu dans une dernière solution (20 mM HEPES, 0.15 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholic acid, 1% SDS, pH 7.5) pendant 1H à 4°C et centrifugé à 10 000 g pendant 15 min pour obtenir un surnageant contenant la fraction « PSD » ou post-synaptique, Triton-insoluble.

Par WB, nous avons ensuite vérifié la présence du marqueur pré-synaptique Synaptophysin I dans la fraction « non-PSD » et du marqueur PSD95 dans la fraction « PSD », post-synaptique.

16- Injections stéréotaxiques et mesure de la potentialisation à long terme (LTP)

Dans le but d'évaluer l'impact de la sous-expression de FERMT2 sur la plasticité synaptique et la LTP, des injections stéréotaxiques avec les lentivirus (shNT, shAPP, shFERMT2 ou shAPP+shFERMT2) ont été réalisées dans les hippocampes de souris sauvages C57bl6 âgées de 10 semaines. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire E-PHY-SCIENCE à Biot. Brièvement, les souris sont anesthésiées avec 4% d'isoflurane et leur tête a été placée dans le cadre stéréotaxique. Pendant la procédure chirurgicale, 1.5% d'isoflurane est délivré par un masque facial pendant la respiration spontanée de l'animal. Les crânes sont rasés et désinfectés avant l'application d'un anesthésique local : la lidocaïne. L'incision de la peau puis la craniotomie sont réalisées pour permettre l'injection des lentivirus dans les hippocampes droit et gauche. Puis, des clips sont utilisés pour refermer la plaie. Une semaine après les injections, des

coupes sagittales d'hippocampes sont effectuées pour chaque groupe de souris. Les souris sont anesthésiées puis décapitées. Les coupes de cerveaux ont été réalisées grâce à un vibratome puis immergées dans un liquide céphalo-rachidien artificiel (124 mM NaCl, 3.75 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 26.5 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 10 mM Glucose) et oxygénées de façon continue jusqu'à l'enregistrement. Les potentiels d'une population de neurones ou potentiels de champs post-synaptiques excitateurs extracellulaires (fEPSPs) sont enregistrés dans la couche radiée de la corne d'Ammon (CA1) en réponse à la stimulation de la collatérale de Schaffer à 0.1 Hz. La plasticité synaptique basale est mesurée en stimulant de 30% l'amplitude du champ maximal pendant 10 minutes. Après 10 minutes de période stable, la LTP est mesurée après une stimulation tétanique à haute fréquence (post-HFS) de 3 séries de 100 stimulations à 100 Hz avec un intervalle de 20 secondes entre chaque série. La LTP est quantifiée en comparant la moyenne des pentes des fEPSPs post-HFS avec la moyenne des pentes pendant la plasticité synaptique basale.

A thick blue vertical bar runs down the left side of the page. A blue arrow points from the bar towards the right, pointing to the word 'RESULTATS'.

RESULTATS

Le travail réalisé au cours de la thèse est divisé en trois parties principales. D'une part, puisque les données issues des GWAS ne permettent pas de déterminer la fonctionnalité des gènes dans le processus physiopathologique de la MA, nous avons voulu déterminer s'ils jouent un rôle dans le métabolisme de l'APP, qui semble être au cœur du développement de la maladie. Pour cela, le premier objectif a donc été d'identifier de nouveaux modulateurs du métabolisme de l'APP par des approches de criblages à hauts contenus de tous les gènes, au travers d'une banque de siRNAs, ainsi que de leurs régulateurs, au travers d'une banque de miRNAs. La mise en place de tels criblages a nécessité par la suite, une étape de validation de l'impact des nouveaux modulateurs sur le métabolisme de l'APP par des approches fonctionnelles. Enfin, il est apparu nécessaire de déterminer les conséquences de changements d'expression des modulateurs du métabolisme de l'APP dans un contexte neuronal et ainsi déterminer leur(s) rôle(s) et les mécanismes mis en jeu pendant le processus physiopathologique de la MA.

Les résultats présentés par la suite sont issus de données publiées (annexe 1) mais aussi de données en cours de soumission (annexe 2). Les résultats issus du premier criblage de siRNAs ainsi que la validation de l'impact de FERMT2 sur le métabolisme de l'APP ont permis la publication d'un premier article « Genome-wide, high content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor *FERMT2* as a major modulator of APP metabolism. » Chapuis, J., Flaig, A., Grenier-Boley, B., **Eysert, F.**, Pottiez, V., Deloison, G., Vandeputte, A., Ayral, AM., Mendes, T., Desai, S., Goate, A., Kauwe, J., Leroux, F., Herledan, A., Demiautte, F., Bauer, C., Checler, F., Petersen, R., Blennow, K., Zetterberg, H., Minthon, L., Van Deerlin, V., Lee, VMY., Shaw, L., Trojanowski, J., Albert, M., Moghekar, A., O'Brien, R., Peskind, E., Malmanche, N., Schellenberg, G., Dourlen, P., Song, OR., Cruchaga, C., Amouyel, P., Deprez, B., Brodin, P., Lambert, JC. (2017). *Acta Neuropathol* 133(6) : 955-966. (Annexe 1).

Dans cet article, mon directeur de thèse, le Dr Chapuis a développé le premier criblage de siRNAs avant le début de mon doctorat. Le criblage a été réalisé à mon arrivée au laboratoire et j'ai donc pu suivre toutes les étapes du criblage. Ma contribution repose principalement sur la validation de l'impact de FERMT2 sur le métabolisme de l'APP dans différents modèles cellulaires.

Les résultats issus du criblage de miRNAs ainsi que de l'impact de FERMT2 dans un contexte neuronal ont permis la rédaction d'un second article en premier auteur « Alzheimer's genetic risk factor *FERMT2* (*Kindlin-2*) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner. » **Eysert F.**, Coulon A., Boscher E., Vreulx AC., Flaig A., Mendes T., Hughes S., Grenier-Boley B., Hanouille X., Demiautte F., Bauer C., Marttinen M., Takalo M., Amouyel P., Desai S., Pike I., Hiltunen M., Checler F., Farinelli M., Delay C., Malmanche N., Hébert S., Dumont J., Kilinc D., Lambert JC., Chapuis J. *Soumis* (Annexe 2).

Dans ce projet, j'ai participé à la validation de l'impact des miRs identifiés lors du criblage, sur l'expression de FERMT2 mais également sur le métabolisme de l'APP. J'ai plus particulièrement réalisé les expériences

permettant de caractériser FERMT2 comme un nouveau partenaire de l'APP. Enfin, j'ai surtout mis en place et réalisé les expérimentations visant à investiger les conséquences de la sous-expression de FERMT2 dans les neurones notamment par l'utilisation du modèle de microfluidiques.

1- Identification de FERMT2, modulateur du métabolisme de l'APP

1.1-Mise en place du modèle HCS

Tout d'abord, afin d'identifier les gènes qui modulent le métabolisme de l'APP, la première approche systématique développée au laboratoire a été le criblage à haut contenu de tous ces gènes et de leurs régulateurs au travers de banques de siRNAs et de miRNAs. Les criblages ont été effectués dans un modèle de cellules HEK-mCherry-APP^{695WT}-YFP, décrit précédemment (Matériels et Méthodes paragraphe 2.1) en plaques de 384 puits. L'étude de Sannerud *et al.*, avait déjà reporté l'utilisation de ce modèle où les deux tags mCherry et YFP ne modifient pas le métabolisme de l'APP (Sannerud et al., 2011). Le marqueur mCherry dans le domaine extracellulaire, et le marqueur YFP du côté C-terminal de l'APP, permettront de visualiser par immunofluorescence et de quantifier, les fragments intracellulaires issus du métabolisme de l'APP. En effet, la fluorescence issue du marqueur YFP correspondant aux fragments C-terminaux (CTF) est émise grâce à l'activité γ -sécrétase tandis que la fluorescence issue du marqueur mCherry est émise grâce à l'activité des α - et β -sécrétases et correspond aux fragments APPs (Figure 22A) (Sannerud et al., 2011). Les criblages ont été réalisés en triplicat et les images prises par immunofluorescence. Le marquage au Hoechst a permis la détection des noyaux cellulaires et donc le dénombrement des cellules (Figure 22B). Les puits ayant subi une forte toxicité suite à la transfection des siRNAs ou des miRs et dont le nombre de cellules était inférieur à 300 cellules/puits, ont été écartés de l'étude. L'intensité des marquages mCherry et YFP a permis la détection des corps cellulaires et ont été quantifiés (Figure 22B). L'intensité moyenne de la fluorescence des deux signaux mCherry et YFP a été normalisée par le fold change des puits transfectés avec les contrôles négatifs de la même plaque. Dans le cas du criblage de siRNAs, les contrôles négatifs correspondent au siRNA non targeting (siNT) tandis que pour le criblage de miRNAs, les contrôles négatifs correspondent au miR non-targeting (miR-NT). Par ailleurs, l'utilisation de siRNA dirigés contre l'APP (anti-APP) et contre la présénilline 1 (γ -sécrétase) (anti-PSEN1) comme contrôles, a servi au calcul du score permettant la validation des images obtenues par HCS. En effet, comme attendu, la sous-expression de l'APP diminue les deux marquages mCherry et YFP tandis que la sous-expression de la présénilline 1 conduit à une augmentation des marquages mCherry et YFP signifiant une accumulation d'APP au niveau intra-cellulaire suite à la sous-expression de la γ -sécrétase (Figure 22C). La mesure utilisée pour la valida-

tion des images HCS, est la différence moyenne strictement standardisée (Strictly standardized mean difference ou SSMD) également appelé score β . Elle dépend de la moyenne des contrôles positifs et négatifs (μ_{PSEN1} , μ_{APP} respectivement) et de leurs écarts-types (σ_{PSEN1} , σ_{APP} respectivement). En effet, le score β détermine si la différence entre les fluorescences des puits contrôles négatifs et positifs, est significative et suppose que la réponse du contrôle positif est supérieure à celle du contrôle négatif (Bray & Carpenter, 2017; Buchser et al., 2012) en utilisant la formule présentée en Figure 23. Les plaques avec un β score supérieur à 3 ont été analysées selon les recommandations pour un criblage à haut contenu (Bray & Carpenter, 2017; Buchser et al., 2012).

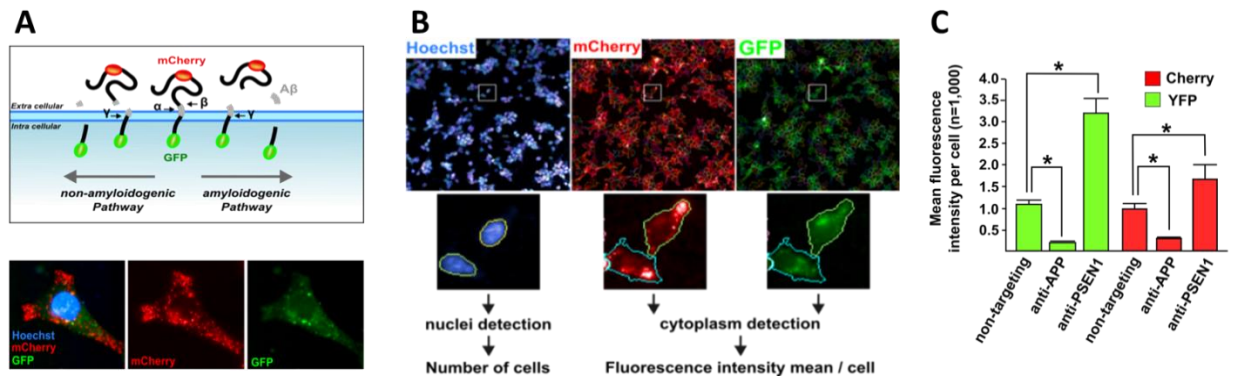


Figure 22 : Présentation du modèle utilisé pour les criblages HCS. **A**, Schéma et immunofluorescence montrant les cellules HEK-mCherry-APP^{695WT}-YFP. **B**, Identification des noyaux et corps cellulaires de chaque cellule par le logiciel Columbus (PerkinElmer) permettant la quantification du nombre de cellules et de l'intensité des fluorescences pour les tags mCherry et YFP. **C**, Fluorescence moyenne de l'intensité des tags mCherry (rouge) et YFP (vert) pour les contrôles transfectés avec un siRNA non-targeting, anti-APP (siAPPA) ou anti-PSEN1 (siPS1).

$$\beta = \frac{\mu_{PSEN1} - \mu_{APP}}{\sqrt{\sigma_{PSEN1}^2 + \sigma_{APP}^2}}$$

Figure 23 : Formule du β score ou SSMD calculé pour le contrôle qualité et la validation des images obtenues pour les contrôles négatifs et positifs. σ représente l'écart-type pour les contrôles positifs et μ représente la moyenne des contrôles positifs (Buchser et al., 2012 ; Bray and Carpenter, 2017).

1.2- Criblage HCS de siRNAs modulant le métabolisme de l'APP

Dans un premier temps, le criblage de siRNAs a été réalisé grâce à une banque de 18 107 siRNAs selon le protocole précédemment décrit dans la partie Matériels et Méthodes (paragraphe 2.1). Comme le signal mCherry montrait de meilleures variations suite à la transfection des différents siRNAs de la banque, nous nous sommes focalisés seulement sur ce signal et nous avons sélectionné 5% des gènes qui présentaient

la plus forte variation (2.5% à la hausse et 2.5% à la baisse). Finalement, les hits sélectionnés représentent 832 gènes. Pour affiner la liste de candidats modulateurs du métabolisme de l'APP, nous avons donc croisé ces 832 gènes issus du criblage avec les gènes identifiés comme facteurs de risque de la MA issus de la méta-analyse GWAS-IGAP (Lambert et al., 2013). Parmi eux, les 8 gènes *OR2AE1*, *GPC2*, *PVRIG*, *PILRA*, *AGFG2*, *TRIM35*, *EPHX2* et *FERMT2*, facteurs de risques, ont été retrouvés comme potentiels modulateurs du métabolisme de l'APP (Figure 24). Ces résultats suggèrent donc que ces 8 gènes pourraient être impliqués dans le processus physiopathologique de la MA au travers de la régulation du métabolisme de l'APP. Nous avons par la suite cherché à évaluer l'association des SNPs situés sur ces 8 gènes avec le taux d'Aβ₁₋₄₂ dans le LCR de patients atteints de la MA (n=2886). Finalement, il est apparu que seuls les SNPs dans le gène de *FERMT2* ont été associés (Tableau 3). Ces résultats renforcent donc l'idée que *FERMT2* est impliqué dans le processus physiopathologique de la MA au travers de la modulation du métabolisme de l'APP ainsi que la génération de peptides Aβ.

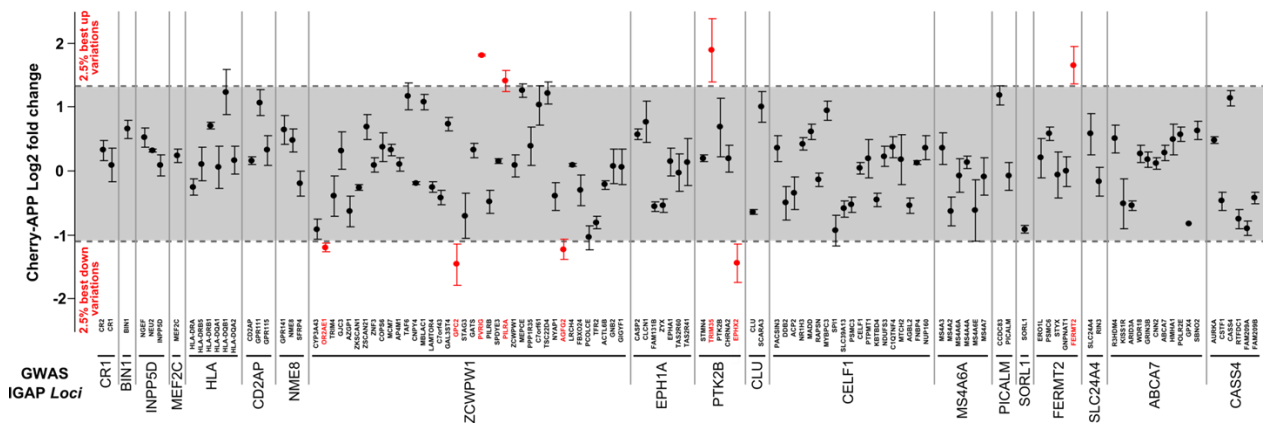


Figure 24 : Croisement des données HCS et GWAS. Variation moyenne de l'intensité du signal mCherry après la sous-expression des gènes associés au risque de développer la MA d'après la méta-analyse IGAP. Les 8 gènes issus de la cross-corrélation sont représentés en rouge.

Tableau 3 : Association entre les 8 gènes localisés dans les régions chromosomiques IGAP and le taux d'Aβ₁₋₄₂ dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de la MA. (*) La régression linéaire est ajustée pour l'âge et le genre.

Modulators of APP metabolism in IGAP loci					Association with the CSF Ab42 level*				
Chr.	IGAP locus	Gene	GFP log2 Fold-change	mCherry log2 Fold-change	SNP	β score	p value		
7	<i>ZCWPW1</i>	<i>OR2AE1</i>	-0.58	±0.05	-1.18	±0.07	rs35649099	-0.01422	0.2026
		<i>GPC2</i>	-0.68	±0.09	-1.45	±0.32	rs12705074	-0.01702	0.0384
		<i>MGC2463</i>	1.29	±0.04	1.83	±0.02	rs150436753	0.01965	0.1215
		<i>PILRA</i>	1.17	±0.10	1.43	±0.16	rs28714213	0.01737	0.0171
		<i>AGFG2</i>	-0.34	±0.05	-1.21	±0.16	rs78951820	-0.03433	0.0247
8	<i>PTK2B</i>	<i>TRIM35</i>	1.84	±0.30	1.91	±0.50	rs77389621	-0.02716	0.0584
		<i>EPHX2</i>	-0.46	±0.08	-1.42	±0.30	rs7341557	0.02001	0.0160
14	<i>FERMT2</i>	<i>FERMT2</i>	1.19	±0.34	1.67	±0.28	rs62003531	-0.02745	0.0006

1.3- Criblage HCS de micro-ARNs modulant le métabolisme de l'APP.

Le premier criblage HCS est basé sur l'utilisation d'une banque de siRNA et donc sur la capacité des gènes candidats à moduler le métabolisme de l'APP suite à leur sous-expression. Comme nous l'avons mentionné en introduction (paragraphe 11), un des principaux rôles des micro-ARNs, est de conduire également à la sous-expression de protéines via l'inhibition de la traduction par la fixation des miRs sur leur(s) ARN(s) messenger(s) cible(s) (Bartel et al., 2008; Sethupathy & Collins, 2008; Winter et al., 2009). Dans ce contexte, les miRs pourraient également contribuer à la modulation du métabolisme de l'APP. Basé sur le même modèle cellulaire, nous avons réalisé un second criblage à haut contenu où une banque de 2555 micro-ARNs a été utilisée. Finalement, 50 miRs, correspondant au 1% ayant le plus fort impact (0,5% à la hausse, comme à la baisse) ont été identifiés d'après le signal mCherry (Figure 25).

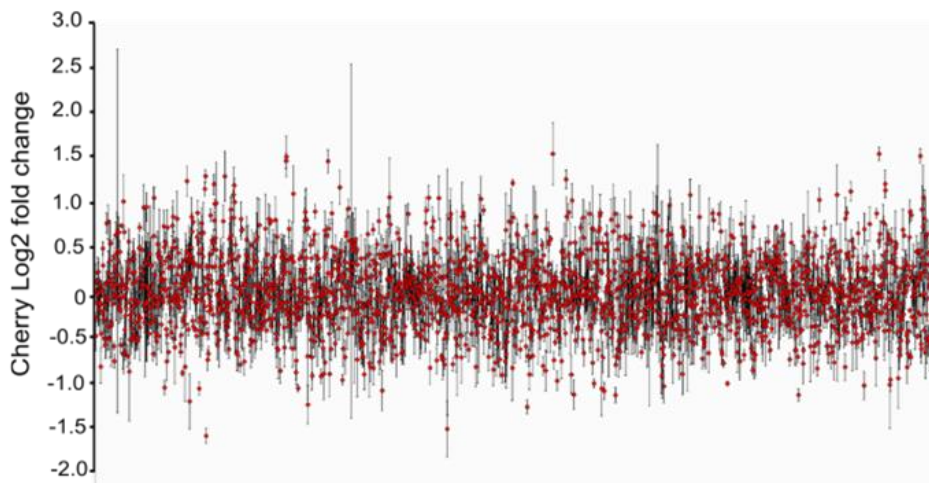


Figure 25 : Variations de l'intensité moyenne (log₂ fold-change) du signal mCherry obtenu après le criblage des miRs en triplicate. Le signal mCherry a été utilisé pour déterminer 1% des hits qui présentent la plus forte variation (0.5% à la hausse et 0.5% à la baisse).

1.4-Croisement des données HCS

Afin de déterminer quels gènes sont potentiellement régulés par les 50 miRs identifiés, nous avons utilisés sept logiciels différents et sélectionnés les gènes prédits pour être les cibles des miRs parmi au moins 4 logiciels sur les 7 (Figure 26A). A cause de la faible spécificité des séquences liant les miRs, et parce que les miRs peuvent cibler de nombreux ARNm différents, nous avons retenu un grand nombre de gènes (n= 6 009). Pour affiner cette liste des gènes prédits, nous l'avons croisée avec les 832 gènes connus pour avoir un impact majeur sur le métabolisme de l'APP, précédemment identifiés dans le criblage de siRNA (Figure 26A). Finalement, nous avons retrouvé 180 gènes en commun qui sont les cibles de 41 miRs différents

(Figure 26A). Par la suite, nous avons voulu déterminer si parmi ces 180 gènes, certains sont régulés préférentiellement par les 41 miRs. C'est pourquoi nous les avons comparés à la liste des miRs prédits pour lier la région 3'UTR de chacun des 180 gènes. La distribution des valeurs de p obtenues pour les 180 gènes ciblés par les 41 miRs est présentée en Figure 26B. Une nouvelle fois, *FERMT2* a été retrouvé et correspond à l'un des 8 gènes les plus significatifs (p -value $< 2.7 \times 10^{-4}$ après correction de Bonferroni) (Figure 26B) qui modulent le métabolisme de l'APP et dont l'expression est potentiellement régulée par les miRs (qui modulent également ce métabolisme).

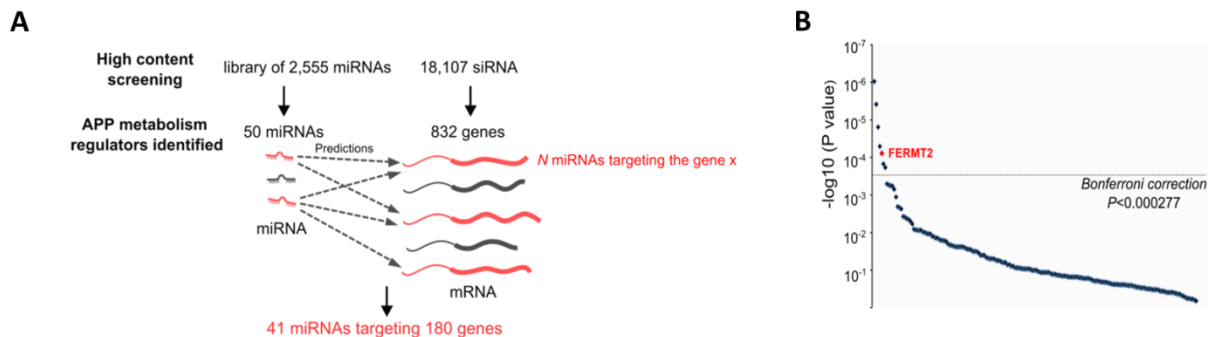


Figure 26 : Croisement des données des criblages de siRNAs et miRNAs pour l'identification de nouveaux modulateurs du métabolisme de l'APP. **A**, Représentation schématique du processus utilisé pour l'identification des micro-ARNs ciblant les gènes capables de moduler le métabolisme de l'APP selon le criblage à haut contenu de siRNAs. Les sites prédits ont été identifiés par au moins 4 logiciels sur 7 pour les gènes exprimés dans le cerveau. **B**, Distribution des valeurs de p pour les 180 gènes ciblés par les 41 miRs identifiés par HCS.

1.5-Les miRs prédits pour cibler *FERMT2* régulent des fonctions connues de l'APP

Nos résultats issus du criblage suggèrent que la sous-expression de *FERMT2* par les miRs module le métabolisme de l'APP, suggérant ainsi que *FERMT2* et l'APP pourraient partager des fonctions physiologiques et pathophysiologiques. De façon intéressante, des analyses des voies de signalisations issues des deux criblages, basées sur les 832 hits (Tableau 4) et sur les 41 meilleurs miRs (Tableau 5), modulant le métabolisme de l'APP, mettent en lumière les voies de signalisation impliquant des fonctions connues de l'APP comme le guidage axonal ou les adhésions focales (Tableau 4 et 5). Ceci est d'un intérêt particulier puisque *FERMT2* est également impliqué dans les mécanismes d'adhésions focales en permettant l'activation de la voie de signalisation via les intégrines (Harburger et al., 2009). Par ailleurs, des variants de *FERMT2* pourraient moduler son expression et contribueraient à des dysfonctions neuronales telles que le guidage axonal et finalement à des dysfonctions synaptiques via une perturbation du métabolisme de l'APP.

Tableau 4 : Voies canoniques identifiées après l'analyse des voies de signalisation par le logiciel IPA (Ingenuity Pathway Analysis) pour les 832 hits identifiés lors du criblage de siRNAs.

Ingenuity canonical pathways	Molécules /pathway	HCS hits /pathway	Ratio	P-value
Dermatan Sulfate Biosynthesis	51	8	0.16	0.0007
Chondroitin Sulfate Biosynthesis	48	7	0.15	0.0023
Reelin Signaling In Neurons	79	8	0.10	0.0109
Synaptic Long Term Depression	137	11	0.08	0.0168
Ephrin B Signaling	72	7	0.10	0.0205
STAT3 Signaling	73	7	0.10	0.0220
Axonal Guidance Signaling	423	25	0.06	0.0270
RhoGDI signaling	167	12	0.07	0.0281
Actin Cytoskeleton Signaling	207	14	0.07	0.0295
Gα12/13 Signaling	114	9	0.08	0.0318

Tableau 5 : Voies canoniques identifiées (score>0.5) après les analyses de la base de données Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomics (KEGG) basées sur les 41 miRs modulant le métabolisme de l'APP identifiés lors du criblage de miRs.

KEGG pathway	p-value	#genes	#miRNAs
Axon guidance	4.70E-08	100	48
Proteoglycans in cancer	1.82E-06	137	49
Hippo signaling pathway	4.10E-06	110	50
Fatty acid biosynthesis	8.10E-05	8	11
Glutamatergic synapse	8.56E-05	83	48
GABAergic synapse	0.00011	60	48
AMPK signaling pathway	0.00022	90	46
TGF-beta signaling pathway	0.00025	56	45
Thyroid hormone signaling pathway	0.00039	85	48
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	0.00050	102	49

1.6-Conclusion intermédiaire

Pour conclure, *FERMT2* est un facteur de susceptibilité génétique de la MA qui est apparu (i) comme le principal modulateur du métabolisme de l'APP d'après le criblage de siRNAs et (ii) l'une des principales cibles des miRs, eux-mêmes responsables de la modulation du métabolisme de l'APP, d'après le criblage des miRs. Finalement, les convergences des deux criblages, pour le facteur de risque génétique *FERMT2*, nous a donc permis de sélectionner ce gène comme nouveau modulateur du métabolisme de l'APP (Figure 27).

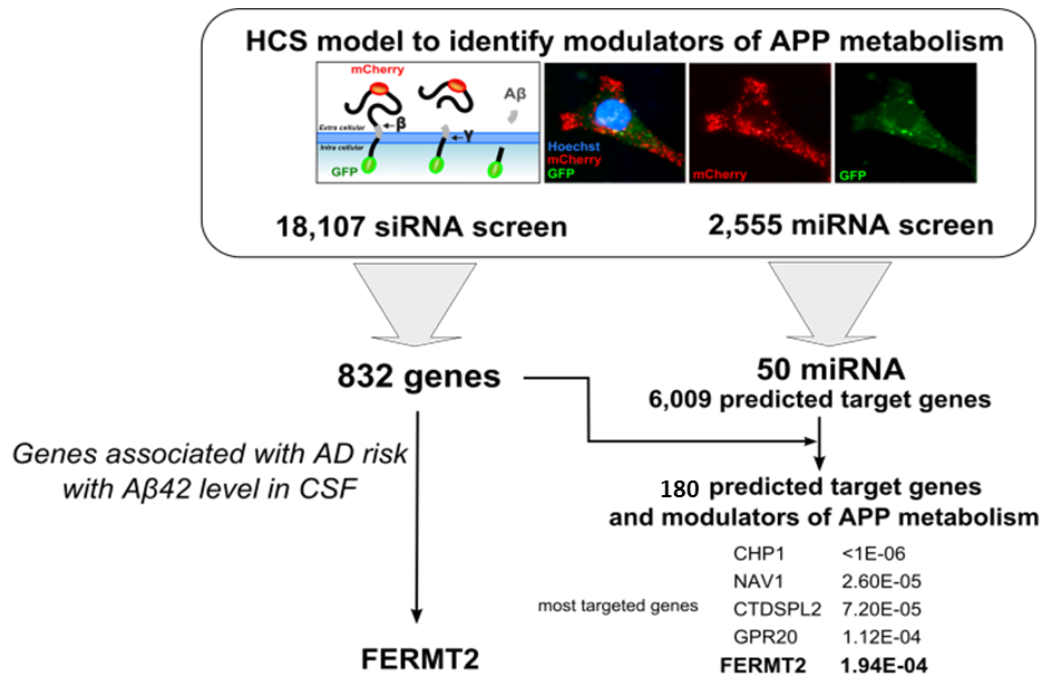


Figure 27 : Représentation schématique montrant la convergence des deux criblages à haut contenu pour le facteur de risque génétique *FERMT2* comme principal modulateur du métabolisme de l'APP.

2- Validation de l'impact des miRs via la sous-expression de *FERMT2*, sur le métabolisme de l'APP

2.1- Caractérisation de l'impact de la sous-expression de *FERMT2*

2.1.1 - Impact de la sous-expression de *FERMT2* sur le métabolisme de l'APP

Tout d'abord nous avons cherché à valider la sous-expression de *FERMT2* après transfection du smartpool de si*FERMT2* utilisés lors du criblage de siRNAs (Figure 28A). Celle-ci conduit effectivement à une accumulation des deux signaux mCherry et YFP dans les cellules HEK-mCherry-APP^{695WT}-YFP (Figure 28B), reflétant une accumulation de fragments intracellulaires vésiculaires et cytosoliques respectivement. Par ailleurs, la sous-expression de *FERMT2* conduit également à une augmentation de la sécrétion de peptides Aβ dans le milieu de culture (Figure 28C).

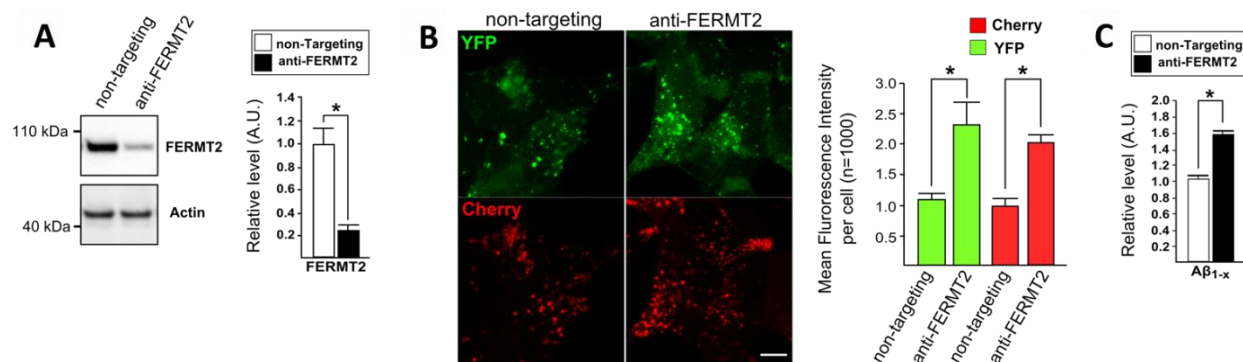


Figure 28 : Caractérisation de l'impact de FERMT2 sur le métabolisme de l'APP dans les HEK-mCherry-APP^{695WT}-YFP. **A**, Validation de la sous-expression de FERMT2 suite à la transfection du smartpool de 4 siRNA dirigés contre FERMT2, utilisé pour le criblage HCS. **B**, Immunofluorescence représentative et quantification de l'intensité des signaux mCherry et YFP après la sous-expression de FERMT2. Barre d'échelle 10 μ m. **C**, Impact de la sous-expression de FERMT2 sur les taux d'A β _{1-x} dans le milieu de culture des cellules HEK-mCherry-APP^{695WT}-YFP cell line. Les histogrammes montrent la moyenne \pm l'écart-type. * $p < 0.05$, test non paramétrique.

Afin d'évaluer le réel impact de la sous-expression de FERMT2 sur le métabolisme de l'APP, nous avons quantifié les formes matures et immatures de l'APP ainsi que tous ses métabolites dans les cellules HEK293 sur-exprimant stablement l'APP (HEK-APP). Les résultats montrent une augmentation du taux d'APP mature et immature, ainsi que de tous ses métabolites (C99, C83, APP α , APP β et A β _{1-x}) (Figure 29A). Le taux d'APP matures se trouve principalement à la membrane plasmique ou dans un environnement proche pour être par la suite clivé par les sécrétases. Par ailleurs, il a été reporté dans la littérature que la sous-expression de FERMT2 participe à l'augmentation du taux de CD39 ainsi que CD73 à la surface cellulaire (Pluskota et al., 2013). Dans ce contexte, nous avons voulu vérifier si la sous-expression de FERMT2 pouvait également favoriser le trafic de l'APP jusqu'à la membrane plasmique. Par des expériences de biotinylation extracellulaire, nous avons montré que la sous-expression de FERMT2 conduit effectivement à une augmentation du taux d'APP mature à la surface cellulaire (Figure 29B). Au contraire, la sur-expression de FERMT2 dans les cellules HEK-APP conduit à une diminution du taux d'APP mature à la surface cellulaire (Figure 29C). Ces résultats suggèrent donc que FERMT2 pourrait contrôler le métabolisme de l'APP au travers de son adressage à la surface cellulaire.

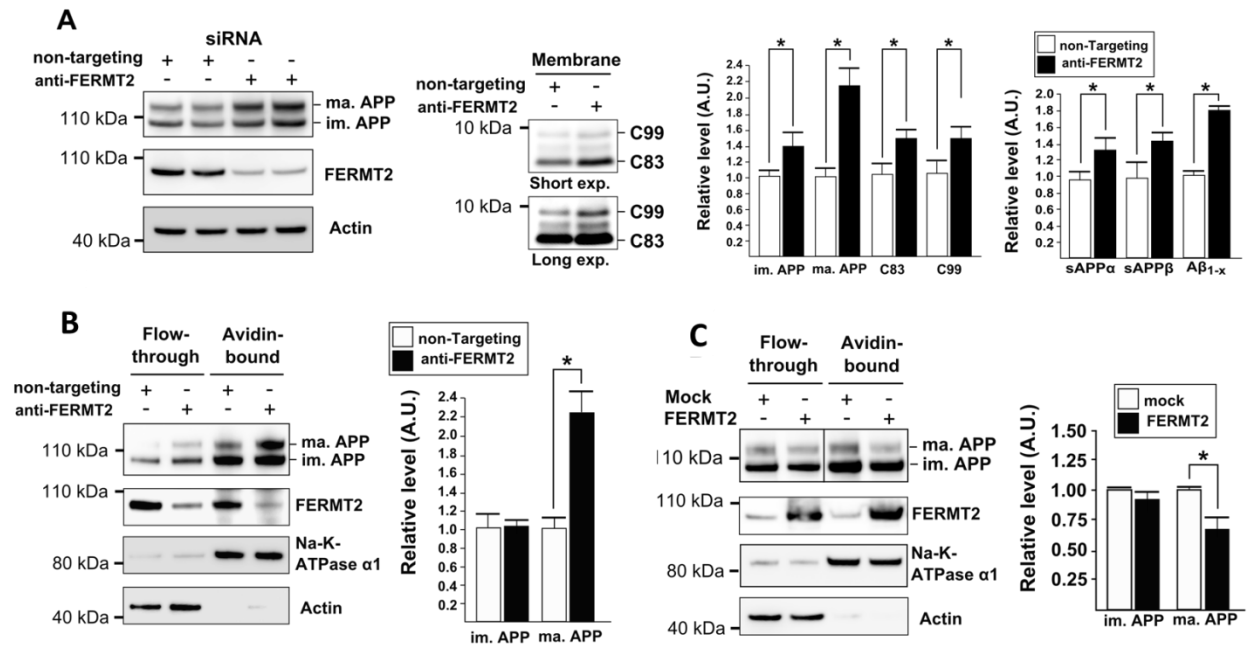


Figure 29 : Caractérisation de l'impact de FERMT2 sur le métabolisme de l'APP dans les HEK-APP. **A**, Les cellules ont été transfectées transitoirement avec un siRNA contrôle (non-targeting) ou un siRNA dirigé contre FERMT2. Les lysats cellulaires ont été analysés par WB et quantifiés pour les formes matures et immatures de l'APP ainsi que pour les métabolites C83 et C99 en utilisant un anticorps anti-APP C-terminal. Les métabolites APPs α , APPs β et A β _{1-x}, sécrétés dans le milieu, ont été analysés grâce à la technologie AlphaLISA (AlphaScreen). **B**, Expérience de biotinylation des protéines de surface. Les lysats cellulaires des cellules transfectées avec le siRNA non-targeting ou le siFERMT2 ont été précipités avec des billes avidin et analysés par WB. La Na-K-ATPase α 1 correspond à un marqueur de la surface cellulaire. **C**, Expérience de biotinylation des protéines de surface. Les lysats cellulaires des cellules transfectées avec un vecteur vide (Mock) ou l'ADNc de FERMT2 ont été précipités avec des billes avidin et analysés par WB. Les histogrammes montrent la moyenne \pm l'écart-type. * $p < 0.05$, test non paramétrique.

2.1.2- Impact de la sous-expression de FERMT2 sur le recyclage de l'APP à la surface cellulaire

Dans l'étude menée par Pluskota et al., la sous-expression de FERMT2 conduit à augmenter le recyclage de CD39 et CD73 à la membrane plasmique expliquant donc l'augmentation de leur taux à la surface cellulaire (Pluskota et al., 2013). Puisque la sous-expression de FERMT2 conduit également à une augmentation du taux d'APP mature à la surface, nous avons émis l'hypothèse que le recyclage de l'APP des endosomes vers la membrane plasmique pourrait être impliqué. Tout d'abord, nous avons évalué le niveau de dégradation de l'APP grâce à un traitement à la bafilomycine qui bloque le trafic de l'APP, des endosomes tardifs vers le lysosome et donc inhibe sa dégradation. De façon intéressante, la sous-expression de FERMT2 diminue l'accumulation d'APP non dégradé, induite par le traitement à la bafilomycine (Figure 30A). Un mécanisme similaire avait déjà été reporté dans le cas des intégrines dans l'étude de Wujak et al. Les auteurs ont montré qu'un traitement à la bafilomycine conduit bien à une accumulation des intégrines qui ne sont plus dégradées en condition normale, mais n'a aucun effet dans le cas de cellules qui

sous-expriment LRP1 (Wujak et al., 2018). Ces résultats suggèrent donc que la sous-expression de FERMT2 pourrait diminuer la dégradation de l'APP dans les lysosomes.

Par la suite, nous avons voulu évaluer l'impact de la sous-expression de FERMT2 sur l'internalisation de l'APP. Pour cela, les cellules HEK-APP ont été incubées à 4°C pendant 1H avec un anticorps dirigé contre l'APP (6E10), puis retransférées à 37°C pendant 20 minutes. L'internalisation du complexe APP-anticorps a été mesurée par immunofluorescence. Bien que le taux d'internalisation d'APP reste inchangé, les niveaux d'APP, dans les endosomes précoces Rab4 positifs, sont augmentés suite à la sous-expression de FERMT2 par rapport au contrôle (Figure 30B), montrant que l'APP est recyclé vers la membrane plasmique. Finalement, la co-transfection des deux siRNAs dirigés contre FERMT2 et Rab4 abolit l'accumulation d'APP à la surface cellulaire par rapport au contrôle (Figure 30C). Rab4 est donc requis pour conduire au recyclage de l'APP vers la surface cellulaire.

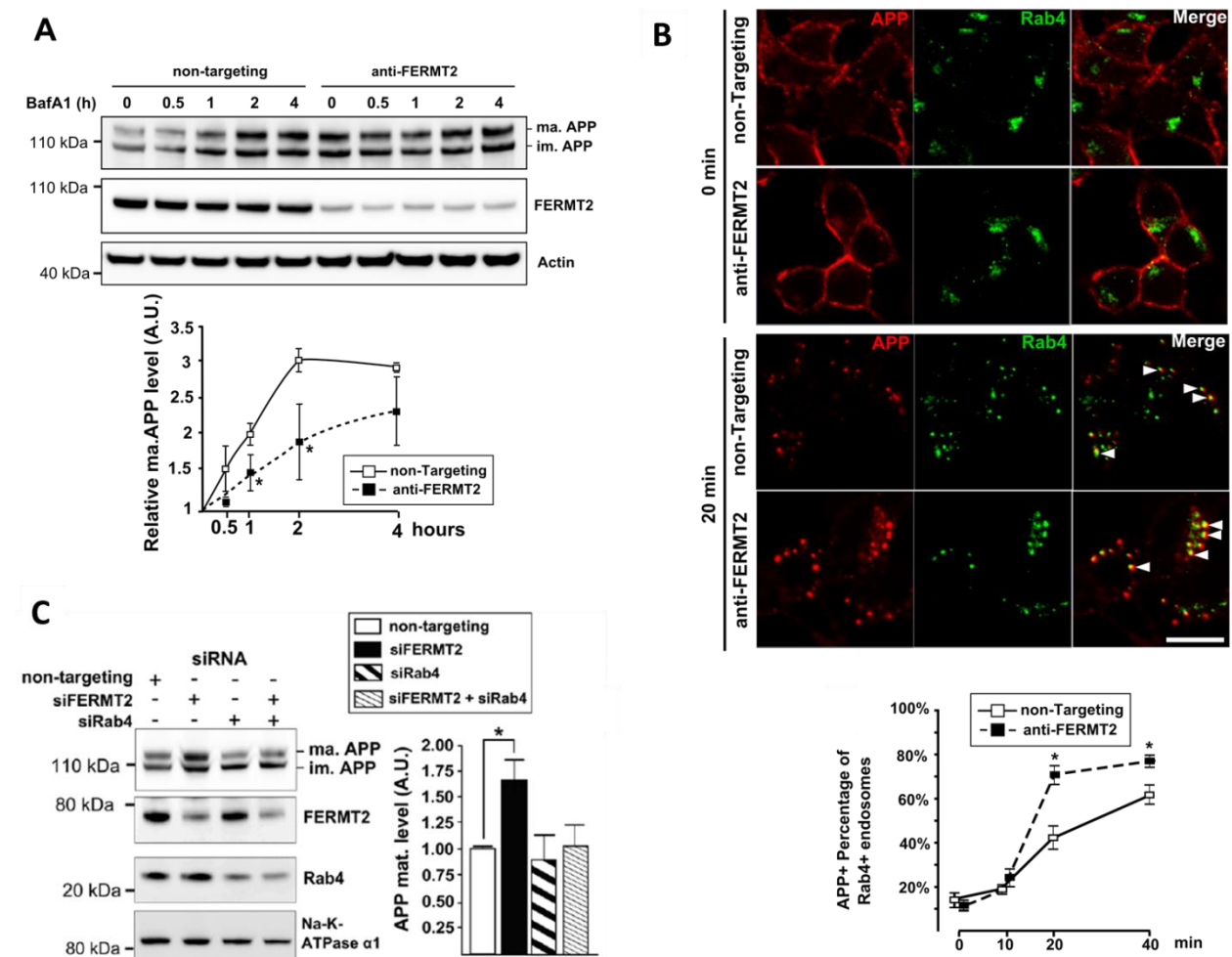


Figure 30 : La sous-expression de FERMT2 inhibe la dégradation de l'APP en favorisant son recyclage vers la membrane plasmique. **A**, Les cellules transfectées transitoirement avec les siRNAs non-targeting ou siFERMT2 ont été traitées avec la Bafilomycine A1 (BafA1, 50nM) pour les temps indiqués. Les lysats cellulaires ont été analysés par WB. **B**, Immunofluorescence pour l'APP et Rab4. L'endocytose de l'APP a été visualisée par l'internalisation de l'an-

ticorps dirigé contre l'APP, 6E10. Barre d'échelle, 10µm. Quantification du pourcentage d'APP présents dans les endosomes Rab4 positifs selon les conditions. C, Les cellules ont été transfectées transitoirement avec le siFERMT2 en présence ou non d'un siRNA dirigé contre Rab4 (siRab4). Les lysats cellulaires ont été analysés par WB après une expérience de biotinylation des protéines de surfaces. Les graphiques et histogrammes montrent la moyenne \pm l'écart-type. * $p < 0.05$, test non paramétrique.

2.1.3- Conclusion intermédiaire

L'ensemble des résultats précédents démontre donc que la sous-expression de FERMT2 (i) dévie l'APP de sa voie de dégradation vers le lysosome et (ii) favorise le recyclage de l'APP vers la surface cellulaire. L'augmentation du recyclage de l'APP dans les endosomes précoces Rab4 positifs le rend disponible pour être clivé par les β - et γ -sécrétases. A la surface cellulaire, l'APP mature s'accumule et la sécrétion de peptides A β est augmentée (Figure 31).

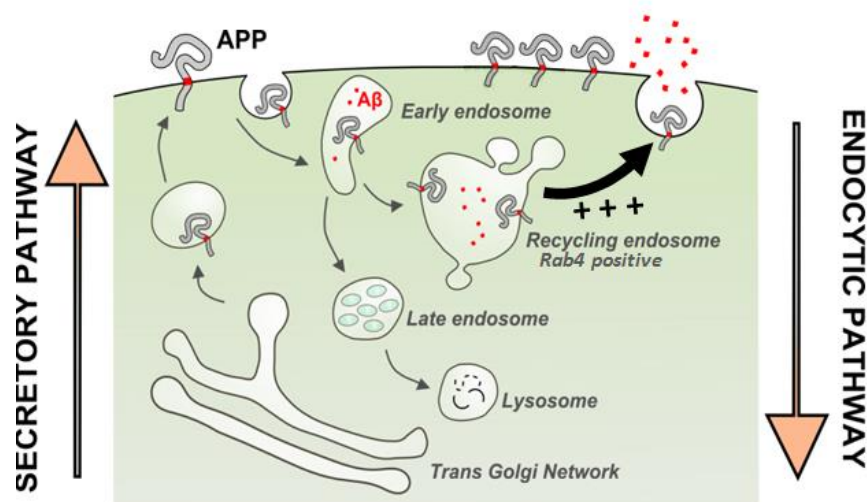


Figure 31 : Schéma représentatif de l'impact de la sous-expression de FERMT2 sur le recyclage de l'APP vers la surface cellulaire ainsi que son accumulation et l'augmentation de la production de peptides β -amyloïdes.

2.2- Caractérisation de l'impact des miRs sur l'expression de FERMT2

Les analyses de prédictions des micro-ARNs ciblant les gènes capables de moduler le métabolisme de l'APP selon le criblage à haut contenu de siRNA ont révélé que quatre miRs sur les 41 sont prédits pour cibler l'ARNm de *FERMT2* : les miR-582-5p, miR-200b-3p, miR-221-3p et miR-222-3p (Tableau 6). Par ailleurs, nous avons précédemment caractérisé un polymorphisme (SNP ; rs7143400G/T) dans la région 3'-UTR de *FERMT2* où l'allèle T, mineur, crée un site de fixation de 8 nucléotides pour le miR-4504 (Delay et al., 2016) (Figure 31A). Cependant, le miR-4504 montre des effets limités sur le métabolisme de l'APP dans le criblage HCS (fold change mCherry = 1.18 ± 0.09 , rang 688 dans le top 30%). Puisque l'effet potentiel de ce miR sur l'expression de *FERMT2* dépend de la présence du polymorphisme rs7143400G/T, nous avons

géotypé les cellules HEK293 utilisées pour les criblages HCS pour ce variant. Nous avons identifié que cette lignée cellulaire est homozygote GG pour le rs7143400 (Figure 31C) et donc, l'expression de FERMT2 ne peut pas être modulée par le miR-4504, expliquant donc potentiellement son impact limité sur le métabolisme de l'APP. Cependant, la lignée cellulaire HELA est hétérozygote pour le polymorphisme rs7143400 (Figure 31C). Puisque le polymorphisme rs7143400 montre une significativité dans l'association du risque de la MA, nous avons décidé (1) d'ajouter le miR-4504 à la liste des quatre miRs qui résultent du criblage HCS et (2) prendre en compte la mutation rs7143400 dans nos analyses.

Nous avons d'abord développé un test de gène rapporteur Luciférase mis sous la dépendance de la séquence 3'UTR de FERMT2 incluant soit l'allèle G soit l'allèle T du polymorphisme rs7143400. Ceci a permis de déterminer si les miRs prédits sont en effet capables de moduler l'expression de FERMT2. La capacité de chaque miR à induire une régulation à la baisse de l'expression du gène rapporteur en présence de la séquence de la région 3'UTR de FERMT2 a été confirmée et, comme nous l'attendions, le miR-4504 est capable de sous-exprimer le gène rapporteur seulement en présence de l'allèle rs7143400 T (Figure 31B). Nous avons ensuite évalué si ces miRs sont aussi capables de sous-exprimer FERMT2 endogène. Pour cela, nous avons transfecté les cinq miRs sélectionnés dans les cellules HEK293. Les quatre miRs (miR-582-5p, miR-200b-3p, miR-221-3p et miR-222-3p) issus du criblage ont été capables de diminuer l'expression de FERMT2 endogène, sauf pour le miR-4504 (Figure 31D). En effet, les cellules HEK293 n'étant pas porteuses de l'allèle T du rs7143400 (Figure 31C), le miR-4504 ne peut donc pas avoir d'effet sur l'expression de FERMT2. En revanche, la transfection du miR-4504 a diminué l'expression de FERMT2 endogène, tout comme les 4 autres miRs dans les cellules HEK293^{rs7143400-G/T} éditées par CRISPR-Cas9 et dans les cellules HELA (Figure 31D), précédemment géotypées hétérozygotes pour le polymorphisme rs7143400 (Figure 31C).

Tableau 6 : Liste des gènes ciblés par les 41 miRs après correction de Bonferroni. Le facteur de risque pour la MA FERMT2 et les miRs prédits pour le cibler sont indiqués en gras.

Gene	p-value	predicted miRNAs
<i>CHP1</i>	< 1E-06	miR-3188, miR-506-3p, miR-5582-5p, miR-6884-5p, miR-7-5p, miR-761
<i>NAV1</i>	4.00E-06	miR-1343-3p, miR-194-3p, miR-506-3p, miR-5193, miR-6783-3p, miR-6884-5p, miR-7-5p, miR-761
<i>CTDSPL2</i>	1.60E-05	miR-16-1-3p, miR-193a-3p, miR-193b-3p, miR-200b-3p, miR-3663-3p, hsa-miR-892b
<i>GPR20</i>	5.20E-05	miR-193a-3p, miR-193b-3p
FERMT2	8.00E-05	miR-582-5p, miR-200b-3p, miR-221-3p, miR-222-3p
<i>NTF3</i>	1.54E-04	miR-200b-3p, miR-221-3p, miR-222-3p
<i>CBL</i>	1.91E-04	miR-181b-3p, miR-506-3p, miR-5582-5p, miR-6783-3p, miR-7-5p, miR-761

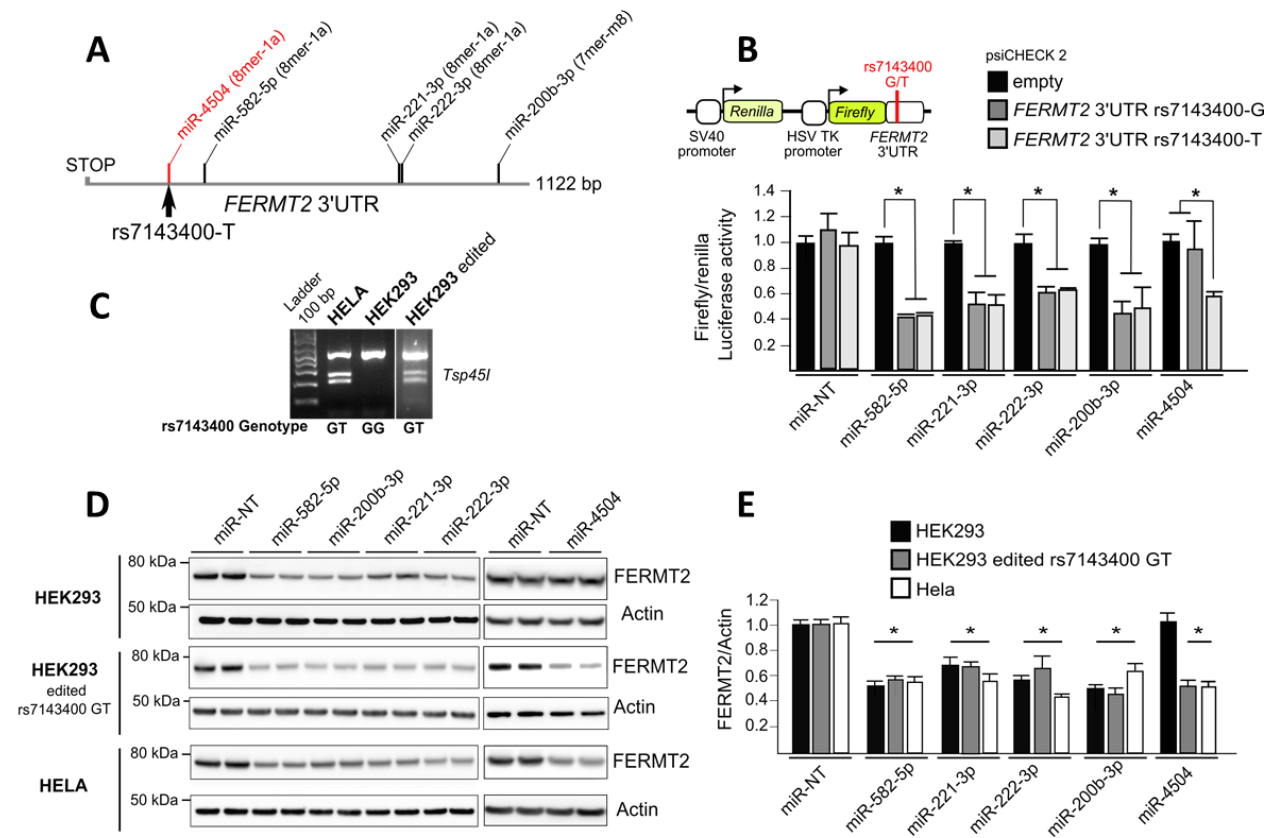


Figure 31 : Validation des miRs fonctionnels ciblant la région 3'UTR de *FERMT2*. **A**, Position relative des sites ciblés par les miRs dans la région 3'UTR de *FERMT2*. Le site créé par le polymorphisme rs7143400-T, associé au risque de développer la MA, est marqué en rouge. **B**, Activité Luciférase montrant l'effet du polymorphisme rs7143400-G/T sur l'activité de répresseur des miRs. **C**, Génotypage RFLP (restriction fragment length polymorphism) des cellules HELA, HEK293 et HEK293 éditées par CRISPR-Cas9 pour le polymorphisme rs7143400. **D**, Cellules HELA, HEK293 et HEK293 éditées par CRISPR-Cas9 transfectées transitoirement avec les miRs pendant 72H. Les lysats cellulaires ont ensuite été analysés par WB afin d'évaluer le niveau d'expression de *FERMT2* endogène. **E**, Quantification des WB provenant de trois expériences indépendantes. Les histogrammes représentent la moyenne \pm écart-type. * $p < 0.05$, test Mann-Whitney.

Finalement, ces données indiquent que l'expression endogène de *FERMT2* est dépendante des miRs et qu'un variant fonctionnel, associé à une augmentation du risque de développer la MA, est capable de moduler l'expression de *FERMT2* en créant un site de fixation pour un miR.

2.3- Les miRs régulent le métabolisme de l'APP via la sous-expression de *FERMT2*

Au regard des données issues des criblages, nous avons émis l'hypothèse que les 5 miRs ciblant *FERMT2*, sont des candidats probables pour moduler le métabolisme de l'APP au travers de la sous-expression de

FERMT2. Il est donc attendu que l'effet de chacun de ces miRs sur le métabolisme de l'APP soit dans la même direction que celui du siRNA contre FERMT2 (siFERMT2).

2.3.1- Impact du miR222-3p sur le métabolisme de l'APP

En premier lieu, et pour répondre à cette question, les miR-582-5p, miR-200b-3p, miR-221-3p et miR-222-3p ont été transfectés dans les cellules HEK293 et les taux d'APP endogènes ont été quantifiés. De façon intéressante, parmi les 4 miRs identifiés lors du criblage, seul le miR-222-3p montre une augmentation du taux d'APP par rapport au contrôle (Figure 32A). Il faut également noter que les miR-582-5p et miR-200b-3p, en plus de cibler FERMT2, sont également prédits pour cibler directement l'APP. De ce fait, il est donc impossible d'évaluer l'effet direct de ces miRs sur le métabolisme de l'APP via la sous-expression de FERMT2.

Comme le miR-222-3p est le seul à montrer le même impact sur le métabolisme de l'APP que nous avons déjà décrit pour le siFERMT2, nous avons donc évalué par la suite l'impact de ce miR sur le niveau de sécrétion des peptides A β . Une co-transfection du miR-222-3p avec l'ADNc de l'APP a été réalisée dans les cellules HEK293 et les résultats montrent que plus le miR-222-3p est exprimé, plus l'expression de FERMT2 est diminuée et plus la sécrétion de peptides A β est augmentée (Figure 32B). Encore une fois, ces résultats sont en adéquation avec les résultats précédemment décrits suite à la transfection du siFERMT2 dans le même modèle.

2.3.2- Impact du polymorphisme rs7143400 et du miR-4504 sur le métabolisme de l'APP

Concernant le miR-4504, son impact sur la sous-expression de FERMT2 est dépendant de la présence du polymorphisme rs7143400. C'est pourquoi nous avons utilisé les cellules HEK293^{WT}, HEK293^{rs7143400-G/T} ou HELA, que nous avons transfectées avec le miR-4504, et évalué l'accumulation d'APP endogène. Tout comme le miR-222-3p, la transfection du miR-4504 est associée à une augmentation de la quantité totale d'APP dans les HEK293^{rs7143400-G/T} et les cellules HELA mais pas dans les HEK293 homozygotes GG pour le rs7143400 (Figure 32C).

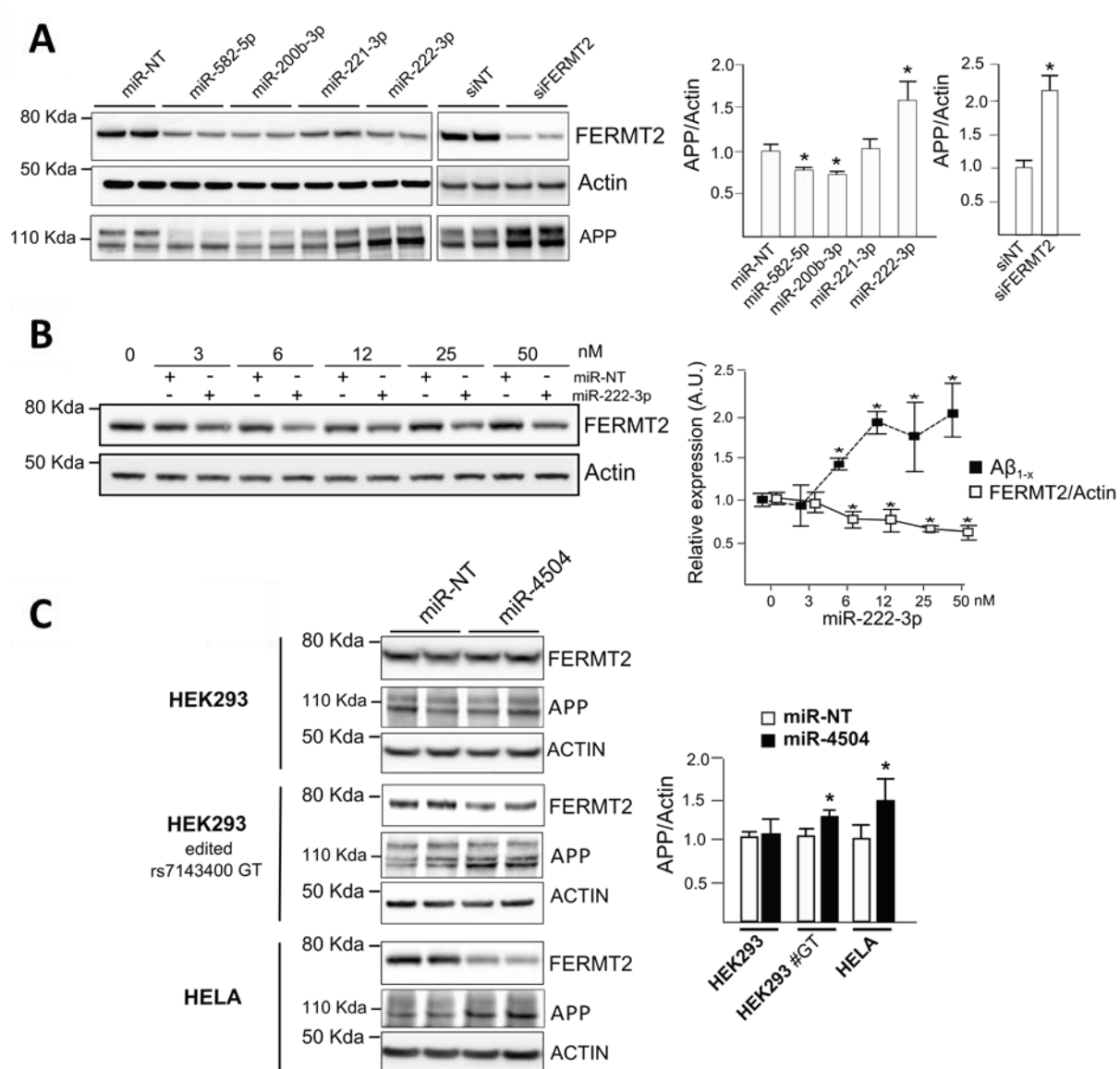


Figure 32 : Impact des miRs sur le métabolisme de l'APP. **A**, Les cellules HEK293 ont été transfectées transitoirement avec les miRs indiqués pendant 72H. Les niveaux de FERMT2 et APP endogènes ont été évalués par WB. **B**, Les cellules HEK293-APP^{WT} ont été transfectées transitoirement avec le miR-222-3p selon les concentrations indiquées pendant 72H. Le niveau de FERMT2 endogène a été évalué par WB et les taux d'Aβ_{1-x} sécrétés dans le milieu ont été analysés après un dosage AlphaLISA. **C**, Niveaux d'expression de FERMT2 et APP endogènes évalués par WB après transfection transitoire (72H) du miR-4504 dans les lignées cellulaires portant ou non l'allèle T du rs7143400. Les histogrammes indiquent la moyenne ± l'écart-type (A.U) unité arbitraire. * p<0.05, test Mann-Whitney.

3- L'interaction FERMT2-APP contrôle le métabolisme de l'APP

3.1-Caractérisation de l'interaction FERMT2-APP

Comme mentionné précédemment, nous avons démontré que FERMT2 est impliqué dans le métabolisme de l'APP mais sans aucune indication sur la nature des mécanismes mis en jeu. Dans la littérature, l'interaction directe entre FERMT2 et les intégrines s'effectue sur le motif NxTY de la queue β des intégrines. Or, ce motif est également présent sur le domaine intracellulaire de l'APP (Figure 33) et participe au recrutement de différents partenaires régulant son métabolisme tels que Fe65 (Sabo et al., 2003).

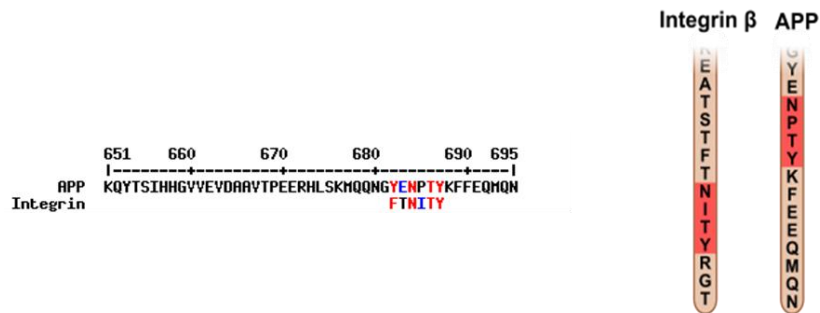


Figure 33 : Les intégrines et l'APP possèdent tous deux le même motif NxTY.

De façon intéressante, tout comme FERMT2, l'APP interagit avec les intégrines (Hoe et al., 2009; Shi et al., 2007) renforçant ainsi l'idée que l'APP et FERMT2 puissent former un complexe. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'au-delà de son impact sur la voie des intégrines, FERMT2 pourrait peut-être interagir directement avec l'APP et contrôler son métabolisme. C'est pourquoi nous avons évalué si l'impact de FERMT2 sur le métabolisme de l'APP peut résulter d'une interaction entre les deux protéines. Tout d'abord, cette interaction a été suggérée par des expériences de PLA dans des neurones primaires d'hippocampes (CPN) (Figure 34A). Par la suite, nous avons voulu valider la formation d'un complexe potentiel entre les deux protéines via des approches complémentaires (i) de co-immunoprécipitation entre l'APP et FERMT2 endogènes issus de CPN (Figure 34B), (ii) de co-immunoprécipitation entre FERMT2^{WT} surexprimé dans des HELA et un fragment recombinant APP C-terminal (APPC-100) (Figure 34D). (iii) De plus, nous avons généré une forme mutante de FERMT2 Q₆₂₁W₆₂₂AA (FERMT2^{QW}) (Figure 34C) qui a déjà été montrée pour abolir l'interaction entre le domaine F3 de FERMT2 et un motif NxTY (présent dans le domaine C-terminal de l'APP) (Montanez et al., 2008; Shi et al., 2007). De façon intéressante, lorsque nous avons surexprimé FERMT2^{QW} dans les cellules HELA, nous ne pouvions plus précipiter le fragment recombinant

APPC-100 (Figure 34D). Ces données confirment bien l'interaction directe entre FERMT2 et l'APP. Basé sur la structure cristallographique de FERMT2 (Li et al., 2017), nous avons développé par la suite un modèle structural pour le complexe FERMT2/APP (Figure 34E).

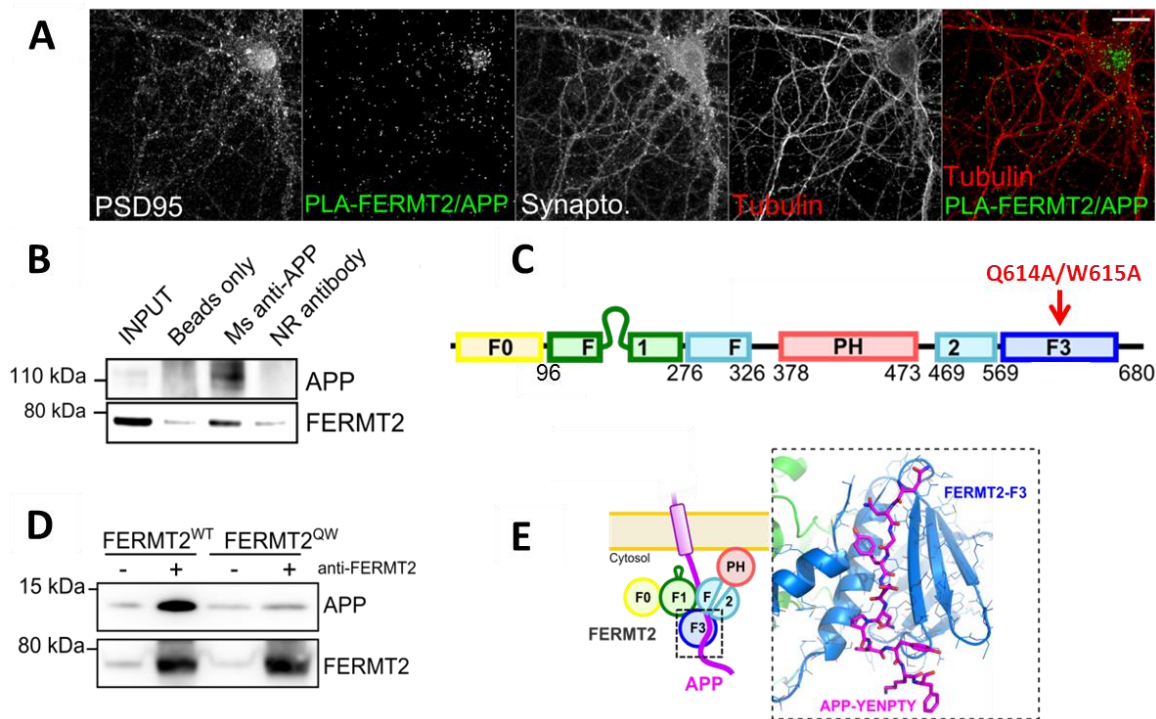


Figure 34 : L'interaction entre FERMT2 et l'APP contrôle le métabolisme de l'APP. **A**, Localisation des points de PLA entre FERMT2 et APP endogènes dans les neurones hippocampaux. Un co-marquage pour la synaptophysin I, PSD95 et l' α -Tubulin a été réalisé par immunofluorescence. Echelle 10 μ m. **B**, Co-immunoprécipitation entre FERMT2 et l'APP à partir d'extraits membranaires de cultures primaires neuronales. Les lysats cellulaires ont été incubés avec des billes seules, un anticorps anti-souris dirigé contre l'APP (4G8) ou un autre anticorps anti-souris non relevant (NR). **C**, Représentation schématique de FERMT2. La mutation Q614A/W615A (QW) est connue pour inhiber l'interaction entre le domaine F3 de FERMT2 et le motif NxTY. **D**, Expérience de Pull-down de FERMT2^{WT} ou FERMT2^{QW}. Les lysats cellulaires de cellules HELA surexprimant FERMT2^{WT} ou FERMT2^{QW} ont été incubés avec un fragment recombinant C-terminal de l'APP (C-100). **E**, Proposition de la structure du complexe FERMT2/APP basée sur la structure cristallographique de FERMT2 (Li et al., 2017).

3.2- Impact de la perte de l'interaction FERMT2-APP sur le métabolisme de l'APP

Par la suite, nous avons évalué l'impact de cette interaction FERMT2/APP sur le métabolisme de l'APP. La sur-expression de FERMT2^{WT} dans les cellules HEK-APP diminue le taux d'APP mature à la surface cellulaire (Figure 35). Par ailleurs, un effet dominant négatif de FERMT2^{QW} a été observé. En effet, sa sur-expression impacte le métabolisme de l'APP de façon similaire à la sous-expression de FERMT2, c'est-à-dire qu'elle résulte d'une augmentation d'APP mature à la surface cellulaire ainsi que d'une augmentation de la production de peptides A β (Figure 35) comme reporté précédemment.

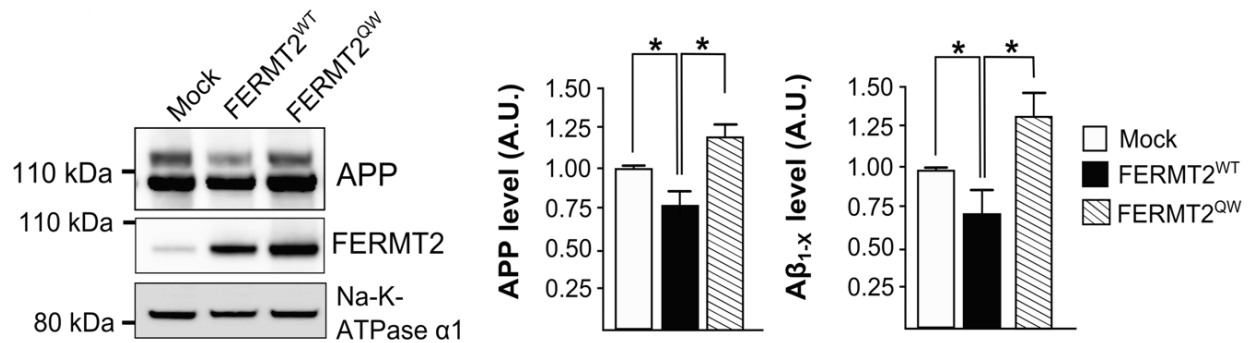


Figure 35 : L'impact de FERMT2 sur le métabolisme de l'APP est inhibé par la surexpression de FERMT2^{QW} par rapport à la surexpression de FERMT2^{WT} dans les cellules HEK293-APP^{695WT}. Les histogrammes montrent la moyenne ± l'écart-type. * p<0.05, test non paramétrique.

3.3- Conclusion intermédiaire

En conclusion, nos résultats indiquent que miR-222-3p et miR-4504 ont le même impact sur le métabolisme de l'APP que la sous-expression de FERMT2 par le siFERMT2. Ces résultats suggèrent un effet de ces deux miRs sur le métabolisme de l'APP via la sous-expression de FERMT2, sachant que l'impact de miR-4504 sur ce métabolisme n'a été observé que dans les cellules HEK293 et HELA porteuses de l'allèle T du polymorphisme rs7143400. En effet, ce polymorphisme crée un site de fixation parfait pour le miR-4504 qui peut exercer sa fonction de répresseur sur la traduction de FERMT2 en protéine (Figure 36). La sous-expression de FERMT2 conduit par la suite à des perturbations du métabolisme de l'APP via une perte de l'interaction FERMT2-APP et conduit à (i) l'augmentation du taux d'APP à la surface cellulaire par l'augmentation de son recyclage et (ii) l'augmentation de la sécrétion de peptides Aβ.

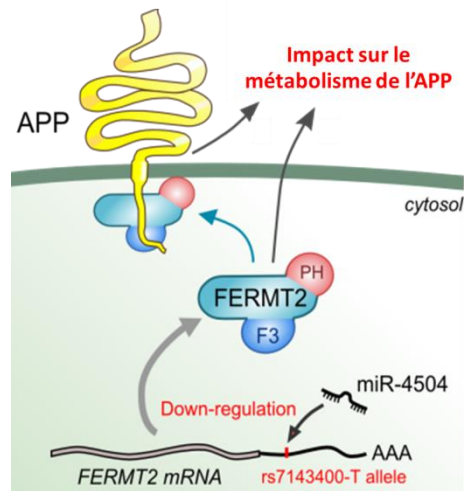


Figure 36 : Schéma représentant l'impact du polymorphisme rs7143400 sur le métabolisme de l'APP. L'allèle mineur T du polymorphisme rs7143400 crée un site de fixation pour le miR-4504. Ce dernier se fixe au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm de *FERMT2* et diminue son expression conduisant à une perte de l'interaction FERMT2-APP. Ceci engendre par la suite des perturbations du métabolisme de l'APP.

4- Conséquences de la sous-expression de FERMT2, dans un contexte neuronal

4.1- Le miR-4504 est exprimé dans les neurones et est surexprimé dans le cerveau de patients atteints de la MA

Afin de vérifier la présence des miR-222-3p et miR-4504 impliqués dans le métabolisme de l'APP dans les neurones, nous avons réalisé des expériences de ViewRNA qui ont permis de les détecter à la résolution d'une cellule unique dans des cultures primaires d'hippocampes (Figure 37A). Finalement, nous avons mesuré le taux d'expression des miR-222-3p et miR-4504 dans les cerveaux de sujets contrôles ou de patients atteints de la MA *post-mortem*. Nous avons observé que le niveau d'expression du miR-4504, mais non du miR-222-3p, est significativement augmenté dans les cerveaux des patients atteints de la MA par rapport aux contrôles (Figure 37B).

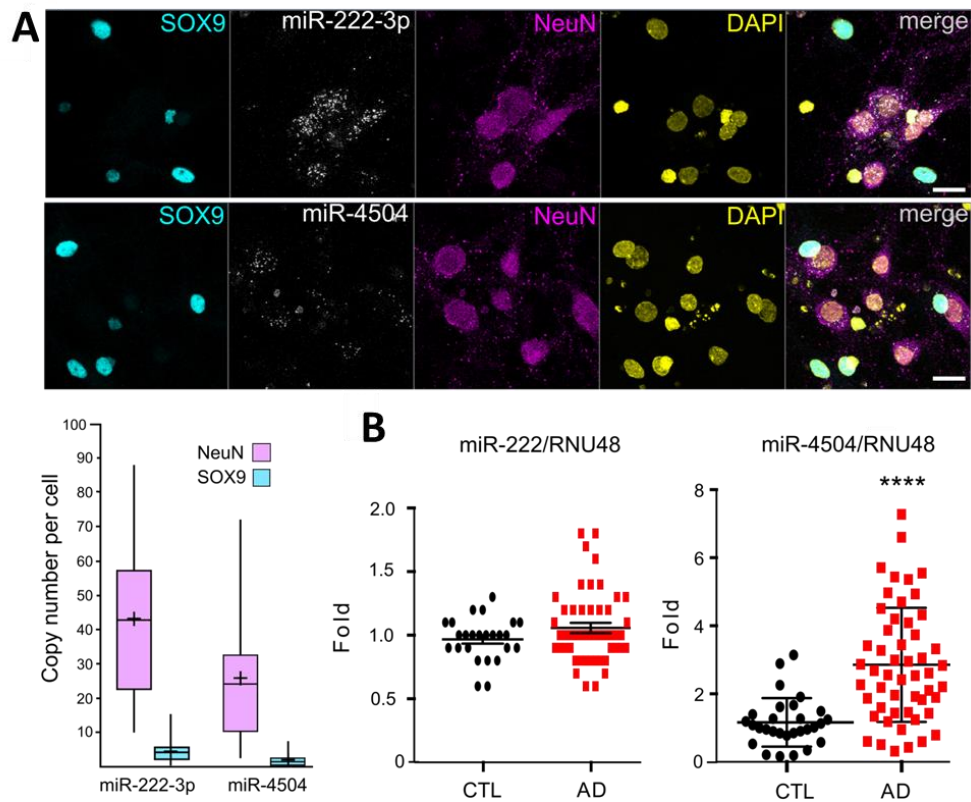


Figure 37 : Localisation des miR-222-3p et miR-4504 dans les neurones issus de cultures primaires d'hippocampes. **A**, L'expérience d'hybridation RNAView permettant la visualisation des miRs est combinée avec une immunofluorescence contre les astrocytes, marqués par SOX9 et les neurones, marqués par NeuN. La barre d'échelle correspond à 20 μ m. Le box plot montre la quantification dans 30 cellules, du nombre de copies de chaque miR dans les neurones et les astrocytes. La croix représente la moyenne du nombre de copies par cellules. La ligne du milieu représente la médiane. La ligne du haut représente l'inclusion à 75% et la ligne du bas, l'inclusion à 25%. **B**, Niveau d'expression relatif des miR222-3p et miR-4504 dans le lobe temporal de patients contrôles (CTL) en noir, ou de patients atteints de la MA (AD) en rouge. Test Mann-Whitney **** p , <0.0001.

4.2- Impact de la sous-expression de FERMT2 sur le métabolisme de l'APP

Afin de confirmer les résultats précédents dans un contexte neuronal, nous avons sous-exprimé FERMT2 par transduction lentivirale d'un shRNA dirigé contre FERMT2 dans les neurones issus de cultures primaires d'hippocampes de rats nouveaux nés. Comme attendu, la sous-expression de FERMT2 conduit également à une augmentation du taux d'APP mature endogène à la surface cellulaire (Figure 38).

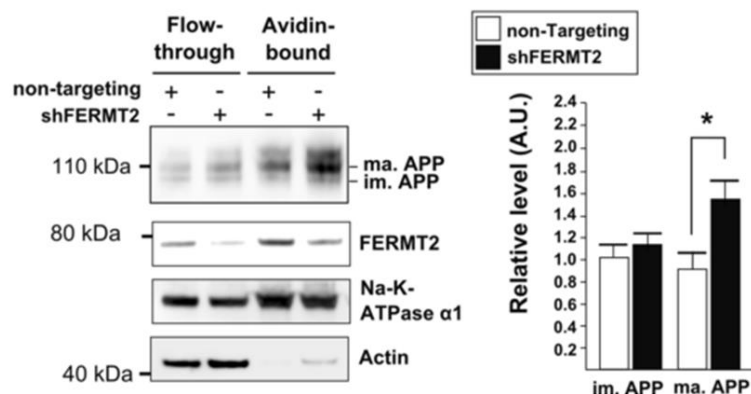


Figure 38 : Expérience de biotinylation des protéines de surface de neurones issus de cultures primaires d'hippocampes de rats nouveaux nés après transduction lentivirale avec un shRNA contrôlé non-targeting ou un shRNA dirigé contre FERMT2 (shFERMT2). Les histogrammes montrent la moyenne \pm l'écart-type. * $p < 0.05$, test non paramétrique.

Comme mentionné dans le paragraphe 1.5, les voies de signalisation comme le guidage axonal ou les adhésions focales (Tableau 4 et 5) seraient impliquées lors de perturbations du métabolisme de l'APP. En effet, dans la voie de signalisation des adhésions focales dont FERMT2 fait partie, les analyses ont permis de mettre en lumière de nombreux modulateurs du métabolisme de l'APP impliqués dans cette voie. C'est pourquoi nous avons voulu caractériser l'interaction entre FERMT2 et l'APP au niveau moléculaire et déterminer si la sous-expression de FERMT2 module les phénotypes neuronaux dans lesquels l'APP prend part.

4.3- Le complexe FERMT2/APP est impliqué dans la croissance axonale

Pour évaluer la validité et la pertinence de l'interaction FERMT2/APP, nous avons voulu vérifier si FERMT2 peut moduler les fonctions de l'APP. Étant donné que le guidage axonal et les adhésions focales ont déjà été mentionnés précédemment et impliquent l'APP, nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur l'étude de la croissance axonale. Pendant le développement cérébral, l'APP mature est enrichi dans les cônes de croissance et agit comme un co-récepteur pour le guidage axonal et la migration cellulaire au travers de son interaction avec la matrice extra-cellulaire (Behar et al., 1999; Sabo et al., 2003; Soldano & Hassan, 2014; Sosa et al., 2013; Young-Pearse et al., 2008). Il semblerait donc que l'APP mature à la surface du cône de croissance soit d'une importance particulière. De façon intéressante nous avons décrit précédemment que FERMT2 est impliqué dans le métabolisme de l'APP en contrôlant son niveau d'expression à la surface cellulaire.

En utilisant des neurones primaires hippocampaux dans des microfluidiques qui utilisent la mécanique des fluides pour isoler les axones de leur corps cellulaire, nous avons d'abord observé la co-localisation de FERMT2 et de l'APP par immunofluorescence et PLA dans les cônes de croissance (Figure 39A). Ces données suggèrent un rôle potentiel du complexe FERMT2/APP dans la croissance axonale.

Dans le but de caractériser plus en détails l'impact de l'expression de FERMT2 et/ou de l'APP sur la croissance axonale, nous avons réalisé une vidéo-microscopie et mesuré la vitesse de la croissance axonale à DIV 5 suite à une transduction lentivirale à DIV 1 (shNT, shFERMT2, shAPP, Mock, FERMT2^{WT}, FERMT2^{QW}) des neurones en microfluidiques. La sous-expression de FERMT2 conduit à une augmentation de la vitesse de la croissance axonale (Figure 39B). Au contraire, la sous-expression d'APP conduit à une diminution de la vitesse de la croissance axonale (Figure 39B) comme il a déjà été reporté par de nombreux auteurs (Hoe et al., 2009; Sosa et al., 2013; Southam et al., 2019). Lorsque FERMT2 et l'APP sont sous-exprimés simultanément, l'impact sur la croissance axonale correspond à celle observée lorsque l'APP seul est sous-exprimé (Figure 39B). Ceci suggère que l'APP est requis pour les mécanismes moléculaires dans lesquels FERMT2 contrôle la vitesse de la croissance axonale. De plus, bien que la sur-expression de FERMT2 n'ait pas d'effet sur la croissance axonale, un effet dominant négatif du mutant FERMT2^{QW} a été encore une fois observé après sa sur-expression (Figure 39B). L'étude de Tan *et al.*, avait également rapporté une diminution de la croissance des neurites après la sur-expression de FERMT2^{QW} (Tan et al., 2012). Ces résultats supportent donc l'implication du complexe FERMT2/APP dans le contrôle de la croissance axonale dépendante de l'APP.

Comme le cône de croissance permet de diriger les axones vers leurs cibles en détectant des signaux moléculaires dans leur environnement (Sosa et al., 2017), nous avons voulu observer l'impact de la sous-expression de FERMT2 sur la morphologie des cônes de croissance pouvant expliquer les modulations de la croissance axonale. Après transduction avec des vecteurs lentiviraux exprimant soit un shRNA contre FERMT2 (shFERMT2) ou un shRNA contrôle (non-targeting shNT), nous avons remarqué que la sous-expression de FERMT2 conduit à une diminution significative de la taille des cônes de croissance (9.13 ± 0.71 vs $12.79 \pm 1.10 \mu\text{m}^2$) (Figure 39C). De plus, dans la région périphérique du cône de croissance, des structures appelées filopodes participent à la motilité. Ces filopodes sont très enrichis en filaments d'actine longs et parallèles qui sont indispensables pour la formation des mouvements des filopodes du cône de croissance, en réponse à l'environnement (Hotulainen & Hoogenraad, 2010; Sabo et al., 2003). De ce fait, l'extension et la rétractation des filopodes reflètent la balance entre la polymérisation de l'actine et le flux rétrograde d'actine dans les filaments (Dickson, 2003). La diminution de la dispersion angulaire des filopodes suggère une perturbation potentielle du comportement exploratoire des cônes de croissance après la sous-expression de FERMT2 (Figure 39C). En revanche, nous n'avons pas observé de différence dans le flux rétrograde d'actine dans les filopodes (0.166 ± 0.003 vs $0.157 \pm 0.002 \mu\text{m/s}$) (Figure 39C). La sous-

expression de FERMT2 est également associée à une accumulation d'APP endogène dans le cône de croissance (1.38 ± 0.11 vs 0.85 ± 0.08) (Figure 39C) (après normalisation par l'aire du cône de croissance). Ces données sont consistantes et en adéquation avec les fonctions connues de l'APP comme molécule d'adhésion dans le cône de croissance. Elles indiquent que FERMT2, en contrôlant le niveau d'APP à la surface cellulaire, module la croissance axonale, dépendante de l'APP.

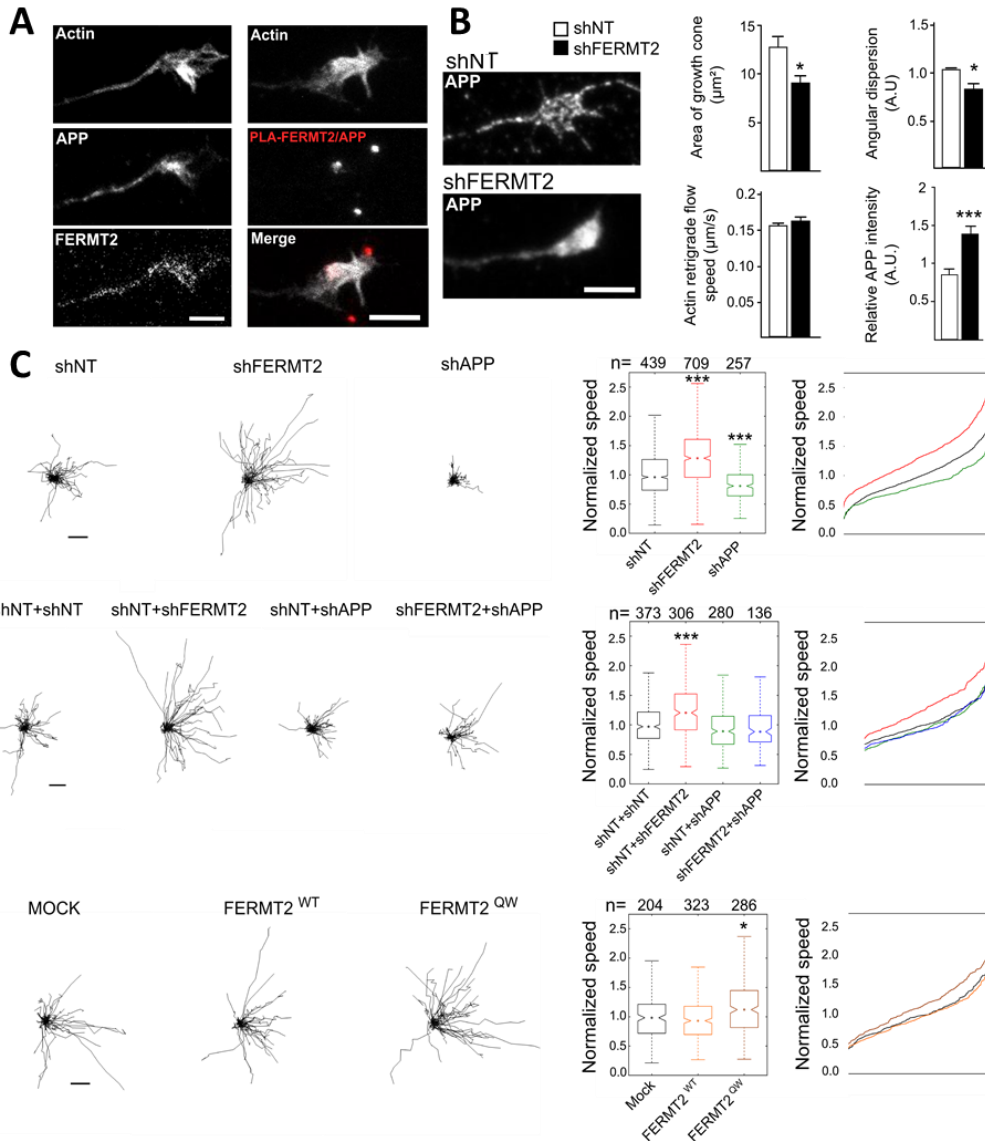


Figure 39 : Le complexe FERMT2-APP est impliqué dans la croissance axonale. **A**, Immunofluorescence montrant la présence de FERMT2 et APP endogènes dans le cône de croissance de neurones issus de cultures primaires d'hippocampes, marqués avec une sonde sir-Actine. Le panel de droite montre la présence de points de PLA pour le complexe FERMT2-APP dans le cône de croissance. **B**, Impact de la transduction lentivirale du shNT (non-targeting) et du shFERMT2 sur la taille des cônes de croissance, la dispersion angulaire des filopodes et le marquage APP. Test non-paramétrique. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$. **C**, Impact de la transduction lentivirale sur la vitesse de la croissance axonale. Le trajet des axones d'un set représentatif de chaque condition a été tracé selon un plan X, Y. Echelle = 50 μm . Les box plots représentent la distribution cumulative de la vitesse axonale. N est le nombre d'axones analysés dans au moins trois expériences indépendantes. Test statistique Kruskal-Wallis ANOVA avec comparaisons multiples ; * $p < 5 \times 10^{-3}$; *** $p < 5 \times 10^{-7}$.

4.4- Impact de la sous-expression de FERMT2 au niveau synaptique

4.4.1- FERMT2 est localisé dans les compartiments pré- et post-synaptiques avec l'APP

Par la suite, nous avons décidé d'étudier l'impact de l'expression de FERMT2 au niveau synaptique. Tout d'abord, un co-marquage de FERMT2 avec les marqueurs pré- et post- synaptiques (Synaptophysin I et Homer, respectivement) suggère une potentielle localisation de FERMT2 à la synapse (Figure 40A). La présence de FERMT2 dans les deux compartiments pré- et post-synaptiques a été confirmée par extraction de synaptosomes (Figure 40B). De plus, le signal PLA FERMT2/APP, colocalisé avec les marqueurs synaptiques (Figure 40C) montre une potentielle interaction des deux protéines au niveau synaptique.

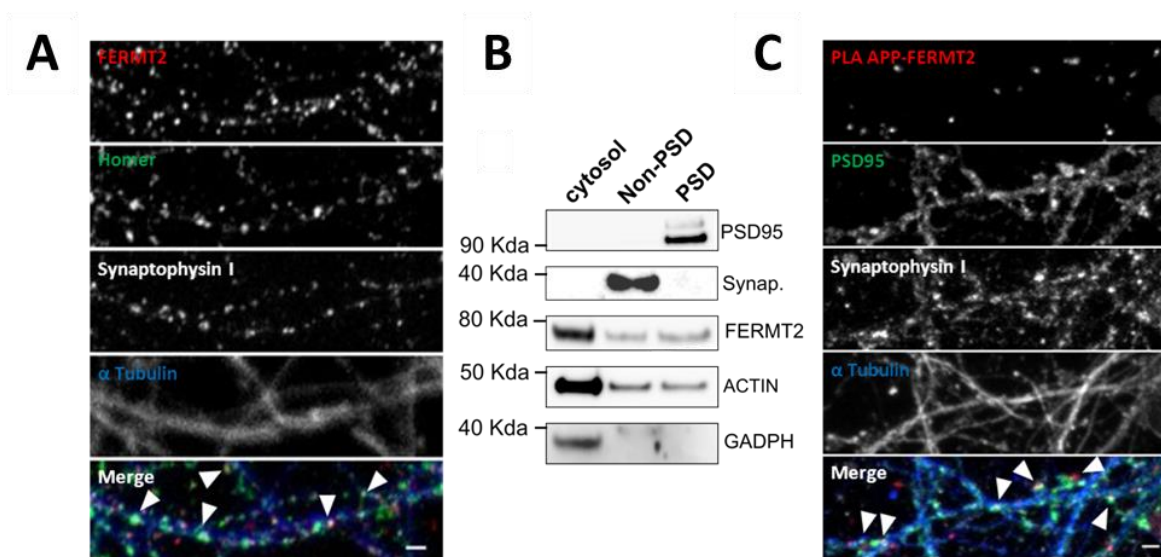


Figure 40 : Impact de l'expression de FERMT2 sur la densité synaptique. **A**, Immunofluorescence du réseau neuronal de cultures primaires d'hippocampes en microfluidique montrant la co-localisation de FERMT2 avec les marqueurs pré- et post- synaptiques (Synaptophysin I et Homer respectivement). **B**, Fractionnement synaptique révélant la présence de FERMT2 dans les compartiments pré- et post-synaptiques. **C**, PLA entre FERMT2 et l'APP observé au niveau synaptique, colocalisé avec les marqueurs pré- et post-synaptiques (Synaptophysin I et PSD95 respectivement).

4.4.2- La sous-expression de FERMT2 conduit à des perturbations de la plasticité synaptique après la maturation neuronale

L'APP étant classée comme une molécule d'adhésion cellulaire et étant impliquée dans la stabilisation des synapses et la plasticité synaptique (Dawson et al., 1999 ; Ring et al., 2007 ; Montagna *et al.*, 2017), nous avons émis l'hypothèse que le niveau d'expression de FERMT2 pourrait contrôler la plasticité synaptique au travers des fonctions de l'APP. Pour cela, nous avons réalisé en collaboration avec E-PHY-SCIENCE des

expériences d'électrophysiologie. Des injections stéréotaxiques avec les lentivirus (shNT, shAPP, shFERMT2 ou shAPP+shFERMT2) ont été réalisées dans les hippocampes droit et gauche de souris sauvages C57bl6 âgées de 10 semaines. Une semaine après les injections, des coupes sagittales d'hippocampes ont été effectuées pour chaque groupe de souris. La plasticité synaptique basale a été mesurée par les pentes des potentiels post-synaptiques excitateurs de champs (fEPSPs) grâce à un protocole IV entrées-sorties. La LTP a été mesurée après une stimulation téτανique à haute fréquence (post-HFS) et quantifiée en comparant la moyenne des pentes des fEPSPs post-HFS avec la moyenne des pentes pendant l'activité synaptique basale. La Figure 41A montre les fEPSPs représentatifs pour chaque groupe de souris pendant l'activité synaptique basale. La moyenne normalisée des pentes des fEPSPs pendant la réponse entrées-sorties basale est représentée en Figure 41B. Aucune différence significative n'est reportée entre les différents groupes injectés indiquant l'absence d'altération de la transmission synaptique basale CA1 dans chaque groupe analysé. En revanche, après la stimulation à haute fréquence, les résultats montrent une diminution significative de la LTP seulement suite à la sous-expression de FERMT2. Cet effet est annulé suite à la sous-expression simultanée de FERMT2 et APP (Figures 41C et 41D). Finalement, les résultats suggèrent une nouvelle fois que la sous-expression de FERMT2 perturbe la LTP et que cet effet est dépendant de l'expression de l'APP ou d'un de ses métabolites.

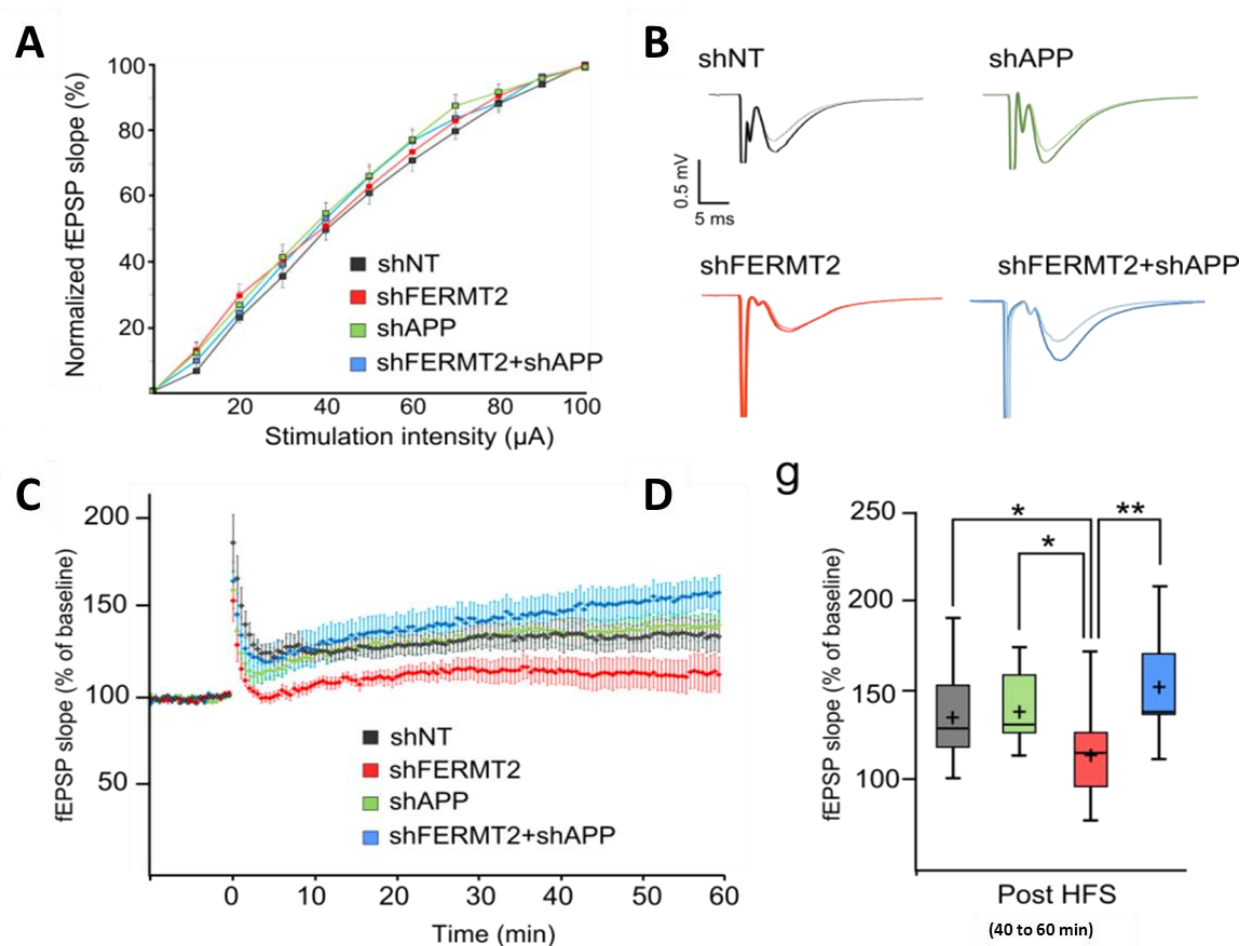


Figure 41 : Impact de la sous-expression de FERMT2 sur la potentialisation à long terme. **A**, Moyenne des pentes normalisées de fEPSP évoqué pendant la réponse entrées-sorties pour chaque groupe injecté. **B**, fEPSPs représentatifs pendant la plasticité synaptique basale (en noir) ou après l'induction de la LTP (en gris) pour chaque groupe de souris injectées avec le shNT, shAPP, shFERMT2 ou shAPP+shFERMT2. **C**, Évolution dans le temps de la pente moyenne des fEPSPs induites après l'induction de la LTP par un protocole de stimulation téτανique au niveau des synapses de la corne d'Ammon CA1 de l'hippocampe de souris après injection virale du shNT, shAPP, shFERMT2, ou shAPP+shFERMT2. Le temps 0 représente la délivrance des stimulations téτανiques. Les pentes de chaque fEPSPs sont normalisées par rapport à la plasticité synaptique de base et tracées en fonction du temps. **D**, Box-plot représentant la réponse moyenne des pentes après l'induction de la LTP. N=5 souris ; 2 coupes par animal. t-Test; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

4.4.3- Conclusion intermédiaire

L'ensemble de nos résultats montrent finalement que dans le contexte de la MA, l'augmentation de l'expression du miR-4504 diminue l'expression de FERMT2 chez les patients porteurs de l'allèle mineur T du variant rs7143400. La sous-expression de FERMT2 au niveau neuronal perturbe le métabolisme de l'APP, notamment en augmentant le recyclage de ce dernier à la surface cellulaire et conduisant à une augmentation de la sécrétion de peptides A β . Ce dernier pourrait par la suite perturber la plasticité synaptique pendant la MA (Figure 42). En revanche, nos résultats ne nous permettent pas de déterminer comment FERMT2 perturbe la plasticité synaptique.

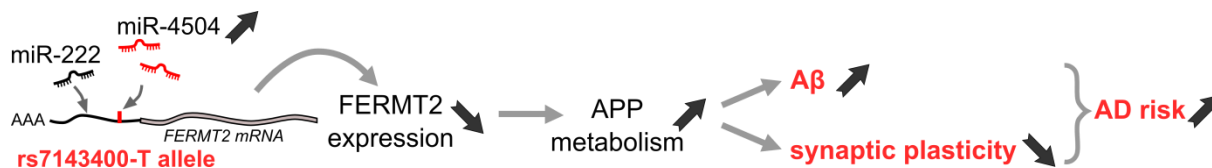


Figure 42 : L'augmentation du miR-4504 observée dans le cerveau de patients atteints de la MA pourrait diminuer l'expression de FERMT2 chez les individus porteurs de l'allèle T du variant rs7143400. Cette sous-expression de FERMT2 dans les neurones pourrait moduler le métabolisme de l'APP, augmentant ainsi la production de peptides A β et conduisant à des perturbations de la plasticité synaptique.

4.4.4- L'expression de FERMT2 au niveau pré-synaptique est requise pour la formation des synapses

Puisque FERMT2 est retrouvé à la fois dans les compartiments pré- et post-synaptiques, nous avons voulu finalement discriminer l'impact de la sous-expression de FERMT2 dans ces 2 compartiments. En effet, dans la littérature, il est connu que l'APP est impliqué dans la formation des synapses (Wang *et al.*, 2009 ; Stahl *et al.*, 2014). Nous avons donc émis l'hypothèse que le niveau d'expression de FERMT2 pourrait contrôler l'adhésion à la synapse au travers des fonctions de l'APP dans les mécanismes de synaptogénèse. Pour contrôler l'expression de shRNAs séparément dans les neurones pré- et/ou post-synaptiques, les neurones primaires hippocampaux ont été cultivés dans des microfluidiques qui permettent la formation des synapses dans une chambre isolée des corps cellulaires (Taylor *et al.*, 2010). Grâce à l'utilisation de fins micro-canaux, les microfluidiques isolent les neurites des corps cellulaires et permettent de réaliser des transductions lentivirales différentes dans les différents compartiments. Nous avons donc sous-exprimé FERMT2 à DIV 1 au niveau pré- et/ou au niveau post-synaptique (Figure 43A). Les effets de l'expression des lentivirus sur la densité synaptique à DIV 14 ont été évalués par microscopie confocale (en mode AiryScan à haute résolution) par immunofluorescence des marqueurs pré- et post-synaptiques (Synaptophysin I en vert et Homer en rouge respectivement). Grâce à la reconstruction 3D des spots verts et rouges, nous avons pu quantifier l'appariement des compartiments post-synaptiques (marqués par Homer) à un compartiment pré-synaptique (marqué par Synaptophysin I) (Figure 43B). Un spot marqué par la synaptophysin I associé à un spot Homer à une distance maximale de 1 μ m traduit une synapse fonctionnelle. Ainsi, lorsqu'un signal Synaptophysin n'est pas attribué à un signal Homer, aucune synapse dite fonctionnelle n'est établie entre ces 2 signaux. Une baisse du pourcentage de signaux Synaptophysin apparié à un signal Homer, traduit alors une diminution globale du nombre de synapses. Une fluctuation de ce paramètre pour les différentes conditions testées ici peut donc être révélatrice d'une variation de la densité synaptique. Les résultats préliminaires montrent en premier lieu que la sous-expression de FERMT2 au niveau pré-synaptique diminue le pourcentage de Synaptophysin I apparié à un compartiment post-synaptique. De même, la sous-expression d'APP au niveau pré-synaptique diminue l'appariement entre les comparti-

ments pré- et post-synaptiques (Figure 43C). Récemment, une autre étude a également montré des résultats similaires dans des cultures primaires neuronales issues de souris KO APP (Southam et al., 2019). Enfin, la diminution de la densité synaptique est abolie par la sous-expression d'APP co-transduit avec le shFERMT2 (Figure 43C), suggérant que l'effet délétère de la sous expression de FERMT2 nécessite la présence de l'APP ou d'un de ses métabolites.

Nos résultats suggèrent donc que l'expression de FERMT2 au niveau pré-synaptique est requise pour le contrôle de la densité synaptique et ce, de façon dépendante de l'expression de l'APP. A partir de ce même modèle, des expérimentations sont en cours de réalisation afin d'évaluer l'impact de la sous-expression de FERMT2 au niveau post-synaptique.

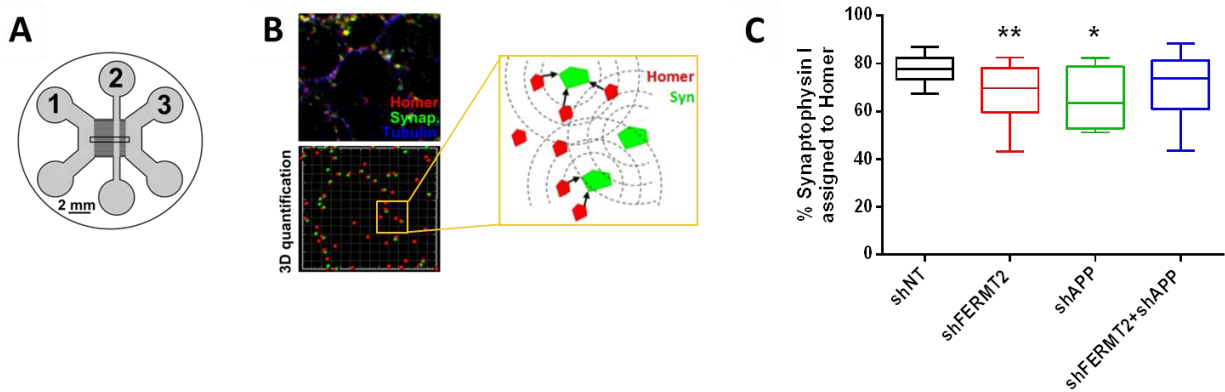


Figure 43 : Quantification de la densité synaptique via la quantification du pourcentage d'appariement entre les compartiments pré- (vert) et post- (rouge) synaptiques. **A**, Schéma d'un microfluidique ; les synapses quantifiées ont été imagées dans le compartiment synaptique central (2) provenant de neurones pré-synaptiques (1) et post-synaptiques (3). La sous-expression de FERMT2 et/ou APP a eu lieu dans le(s) compartiment(s) 1 et/ou 3 de façon indépendante. **B**, La reconstruction 3D des images d'immunofluorescences par le logiciel IMARIS permet de quantifier le nombre de spots marqués par la Synaptophysin I en vert et Homer en Rouge. La quantification du pourcentage d'appariement entre les spots verts et rouges a été effectuée après un process Matlab. **C**, Les neurones issus de cultures primaires d'hippocampes ont été transduits avec les lentivirus shNT, shFERMT2, shAPP à DIV 1. Le box plot représente le pourcentage de synaptophysin I apparié à un compartiment post-synaptique. Test Kruskal Wallis . **, $p < 0.01$ *, $p < 0.05$.

A thick blue vertical bar runs down the left side of the page. A blue arrow points from the bar towards the right, pointing to the section header.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1- Une régulation de l'expression de FERMT2 favoriserait le développement de la MA

1.1- La sous-expression de FERMT2 induite par le variant rs7143400 est dépendante du miR-4504

Précédemment, nous avons vu qu'il existe plusieurs niveaux de régulations du métabolisme de l'APP. Premièrement, la variation d'expression de gènes pourrait moduler le métabolisme de l'APP. Deuxièmement, ces variations d'expression de gènes modulateurs pourraient être conduites par l'expression de miRs, eux-mêmes sur-représentés pendant la MA. Enfin, la fixation de ces miRs sur leur ARNm cibles pourrait être conditionnée par la présence de variants associés au risque de développer la MA (Figure 16). Nos résultats ont tout d'abord permis de mettre en évidence de nouveaux miRs, modulateurs du métabolisme de l'APP grâce au criblage à haut contenu. Parmi, les 50 miRs identifiés pour moduler le métabolisme de l'APP, seulement 41 ont été sélectionnés pour cibler 180 gènes (précédemment identifiés dans le criblage de siRNAs) et dont la variation d'expression module également le métabolisme de l'APP. Parmi eux, le facteur de risque génétique *FERMT2* a été retrouvé dans les deux criblages et est ciblé par 4 miRs : miR-200b-3p, miR-220-3p, miR221-3p, miR582-5p. Par ailleurs, nous avons précédemment caractérisé un polymorphisme rs7143400G/T dans la région 3'-UTR de *FERMT2* où l'allèle T, mineur, crée un site de fixation pour un miR supplémentaire : le miR-4504 (Delay et al., 2016). Même si les 5 miRs sont capables de conduire à la sous-expression de *FERMT2*, seuls les miR222-3p et miR-4504 reproduisent les effets déjà observés de la sous-expression de *FERMT2* sur le métabolisme de l'APP. Une autre étude avait souligné l'effet du miR-138-5p qui interagit directement avec la région 3'UTR de l'ARNm de *FERMT2* et conduit à diminuer son expression tout comme les miRs que nous avons identifiés (Figure 31). L'étude reporte que dans de rares cas, la duplication du gène *MIR138-2*, conduit à la production du miR-138-5p dans le cerveau et le LCR des patients atteints de la MA (Boscher et al., 2019). La sous-expression de *FERMT2* par le miR-138-5p augmente le taux de BACE1 et la phosphorylation de Tau au travers d'une augmentation du taux de GSK-3 β et augmente également les taux d'APP et d'A β (Boscher et al., 2019). Bien que nous n'ayons pas identifié le miR-138-5p dans notre criblage, nos résultats montrent également une augmentation du taux d'APP ainsi que de la production d'A β en réponse à la sous-expression de *FERMT2* induite par le miR222-3p. Concernant le miR-4504, la sous-expression de *FERMT2* est induite seulement en présence de l'allèle T du polymorphisme rs7143400 dans la région 3'UTR de *FERMT2*, et conduit également à une augmentation du taux d'APP total. Ces résultats sont donc cohérents et reportent tous deux le même impact des miRs sur le métabolisme de l'APP via la sous-expression de *FERMT2*.

Puisque *FERMT2* semble être un régulateur important du métabolisme de l'APP via les miRs nous avons voulu vérifier son implication dans la MA. Nous avons mesuré les niveaux d'expression des miR222-3p et

miR-4504 dans le cerveau de patients atteints de la MA et de façon intéressante, seul le miR-4504 est surexprimé (Figure 37). Ces résultats suggèrent qu'une sous-expression de FERMT2 favoriserait le développement de la maladie. De plus, les variants de *FERMT2* associés à une augmentation du risque de développer la MA comme le rs1743400, sont également des eQTL (expression Quantitative Trait Loci). Ces eQTL sont identifiés par la recherche de corrélation entre la présence des allèles portés par des individus et le niveau d'expression de gènes dans différents tissus. D'après la base de données GTEx (Genotype-Tissue Expression) (GTEx Consortium et al., 2015), le variant rs7143400, associé à une augmentation du risque de développer la MA est aussi associé à une diminution de 20% du taux d'ARNm de FERMT2 cérébral. Ainsi, cet eQTL pourrait expliquer la variabilité d'expression de FERMT2 en fonction des allèles du rs7143400 et semble conforter l'hypothèse d'un effet délétère de la baisse d'expression de FERMT2 favorisant le développement de la MA.

Cependant, dans un contexte pathologique, des analyses de séquençages d'ARN (Mayo Clinic Brain Bank Carrasquillo et al., 2017; Sullivan et al., 2019) ont rapporté une surexpression de l'ARNm de FERMT2 dans les cerveaux *post-mortem* de patients atteints de la MA par rapport aux contrôles. Même si nous n'avons pas observé de modification au niveau de l'ARNm de FERMT2 dans un petit nombre de cerveaux, nous avons cependant constaté une augmentation du taux protéique de FERMT2 en fonction des stades de Braak, surtout pour les stades avancés (Annexe 2). Pourtant, il se pourrait qu'aux stades précoces de la MA, une sous-expression de FERMT2 soit délétère, alors qu'à des stades beaucoup plus avancés de la maladie, une surexpression de FERMT2 apparaisse comme une conséquence du processus physiopathologique. Nos résultats montrent que la sous-expression précoce de FERMT2 dépend de la présence de l'allèle T du rs7143400, ayant une fréquence de 9% dans les populations caucasiennes, et de l'expression du miR-4504 dans les neurones. On comprend alors qu'il est difficile d'observer une diminution du taux d'ARNm de FERMT2 dépendant du miR-4504. Par ailleurs, FERMT2 est exprimé principalement et en plus forte quantité dans les astrocytes (Zhang et al., 2017). Une telle différence d'expression dans les astrocytes pourrait ainsi masquer la diminution d'expression de FERMT2 dans les neurones de patients atteints de la MA.

1.2- Conséquences de la sous-expression de FERMT2 dans un contexte neuronal

FERMT2 est une molécule d'adhésion et permet l'activation de la voie des intégrines impliquées dans les mécanismes d'adhésions focales (Harburger et al., 2009). De même, l'APP est également impliqué dans les mécanismes d'adhésions telles que la croissance des neurites, la stabilisation des synapses et la plasticité

synaptique (Sabo et al., 2003; Southam et al., 2019; Wang et al., 2008). Dans ce contexte, il est donc attendu que la sous-expression de FERMT2 par les miRs conduise à une altération des mécanismes d'adhésions cellulaires via l'inhibition de la voie des intégrines mais surtout via une perturbation du métabolisme de l'APP.

1.2.1- Inhibition de l'interaction FERMT2-APP

En 2009, Caswell et al ont suggéré que l'inhibition de la voie des intégrines promeut le recyclage du récepteur VEGF via la voie de recyclage médiée par Rab4, vers la membrane plasmique et le dévie de la voie de la dégradation (Caswell et al., 2009). Par analogie, nous avons émis l'hypothèse dans un premier temps que l'APP étant une glycoprotéine transmembranaire (comme le récepteur VEGF), la sous-expression de FERMT2 pourrait d'abord conduire à l'inhibition de la voie des intégrines puis conduire *in fine* à une augmentation d'APP mature à la surface cellulaire par l'augmentation de son recyclage via les endosomes Rab4 positifs (Figure 30). En revanche, nous avons montré par la suite que FERMT2 interagit directement avec l'APP au travers du domaine F3 de FERMT2 et du motif NxTY de l'APP. Ces résultats suggèrent donc qu'il y aurait une voie directe permettant à FERMT2 de contrôler le métabolisme de l'APP et que la sous-expression de FERMT2 pourrait ainsi conduire à une diminution du nombre de complexe FERMT2/APP dans la cellule. La forme mutée FERMT2^{QW} est d'abord connue dans la littérature pour abolir l'interaction entre FERMT2 et les intégrines (Shi et al., 2007). Les effets obtenus suite à la transfection de FERMT2^{QW} pourraient donc être le résultat d'une perte d'interaction entre FERMT2 et les intégrines et non pas un effet de la perte d'interaction FERMT2-APP. Dans notre étude, l'utilisation du shRNA dirigé contre l'APP s'est révélé indispensable pour confirmer que l'impact de la sous-expression de FERMT2 est dépendant de l'expression de l'APP et est bien la conséquence d'une perte d'interaction entre FERMT2 et l'APP.

Néanmoins, l'APP peut aussi lier les intégrines (Young-Pearse et al., 2008) plus particulièrement à la surface des axones et aux sites des adhésions focales (Hoe et al., 2009; Storey et al., 1996). Cette interaction est requise pour la croissance des neurites et leur orientation (Sosa et al., 2013 ; Young-Pearse et al., 2008). Par ailleurs, les intégrines et l'APP partagent de nombreux interacteurs communs comme par exemple Fe65 pour former un complexe de trois protéines (Dourlen et al., 2019; Sabo et al., 2003). En effet, l'APP colocalise avec Fe65 dans le cône de croissance et influence la croissance axonale (Müller et al., 2017). Par analogie, il serait fort probable qu'en fait le complexe APP-FERMT2 implique également les intégrines pour former un complexe tripartite.

1.2.2- Accélération de la vitesse de la croissance axonale

Étant donné que le principal rôle de l'APP connu est la croissance des neurites, nous avons évalué l'impact de la sous-expression de FERMT2 sur la croissance axonale de neurones issus de cultures primaires

d'hippocampes. Lors de ma thèse, j'ai principalement eu recours à l'utilisation de microfuidiques. Ce dispositif a notamment permis de séparer les axones des corps cellulaires pendant la croissance axonale, rendant ainsi l'analyse et la quantification des cônes de croissance beaucoup plus évidentes.

En premier lieu, nos résultats montrent que la sous-expression d'APP diminue la vitesse de la croissance axonale. Ces données sont en adéquation avec les données de la littérature puisqu'il avait déjà été publié que la sous-expression d'APP diminuait la croissance des neurites dans des cultures primaires de neurones hippocampaux (Hoe et al., 2009, Sosa et al., 2013 ; Southam et al., 2019). Même si une étude a montré des résultats contradictoires (la sous-expression d'APP conduit à une augmentation de l'élongation des neurites) dans des cultures primaires de souris, les auteurs ont également montré que la croissance axonale induite par l'APP α n'est pas possible en l'absence d'APP (Young-Pearse et al., 2008). Malgré tout, ces résultats suggèrent donc que l'APP est essentiel à la croissance axonale et qu'une diminution de son expression, affecte l'adhésion du cône de croissance.

D'autre part, la sous-expression de FERMT2 conduit à une augmentation de la vitesse de la croissance axonale et une augmentation du taux d'APP dans le cône de croissance (Figure 39). En outre, nous avons observé une augmentation du taux d'APP à la surface (Figure 29), induite par la sous-expression de FERMT2, qui pourrait ainsi être responsable de l'augmentation de la croissance axonale. En effet, Hoe et al., ont également montré que la surexpression d'APP augmente la croissance des neurites (Hoe et al., 2009). Cette hypothèse est renforcée par la double sous-expression de FERMT2 et APP simultanément (Figure 39) où aucune différence n'a été observée par rapport au contrôle. Ceci suggère que la présence d'APP ou l'un de ses métabolites, est requise pour observer l'effet de la sous-expression de FERMT2 sur la croissance axonale.

Au contraire, la surexpression de FERMT2^{WT} ne conduit pas à l'augmentation de la croissance axonale. Encore une fois, nos résultats sont cohérents avec les données de la littérature. En effet, Tan et al., avaient déjà rapporté que la surexpression de FERMT2 dans des cultures primaires neuronales provenant des ganglions de la racine dorsale de rats adultes, ne modifiait pas la croissance axonale à DIV2 par rapport au contrôle (Tan et al., 2012). Par contre, nos résultats montrent que la surexpression de la forme mutée FERMT2^{QW} (qui inhibe l'interaction FERMT2-APP) conduit à une augmentation de la croissance axonale (Figure 39) tout comme la sous-expression de FERMT2. Cet effet dominant négatif de FERMT2^{QW} suggère qu'en plus de la présence de l'APP, l'interaction FERMT2-APP est requise pour observer l'impact de FERMT2 sur la croissance axonale.

Dans le cône de croissance, il a déjà été montré que la surexpression d'APP augmente le nombre de filopodes (Sosa et al., 2013) permettant ainsi d'expliquer l'augmentation de la vitesse de la croissance axonale. Nos résultats montrent que la sous-expression de FERMT2, conduisant à une augmentation d'APP, diminue la dispersion angulaire des filopodes (Figure 39). Une autre étude avait également rapporté que

l'APP, dans le cône de croissance, pourrait conduire à la rétractation des filopodes et diminuer leur exploration de façon dépendante à l'activation de Gαo (Ramaker & Copenhaver, 2017). L'ensemble des résultats suggère donc, que la sous-expression de FERMT2 diminue le comportement exploratoire des filopodes conduisant à accélérer la croissance axonale.

Par ailleurs, dans les neurones de patients atteints du syndrome de Down (SD) ou Trisomie 21, la surexpression d'APP est observée plus particulièrement au niveau du cône de croissance et conduit à une augmentation de la vitesse de la croissance axonale (Sosa et al., 2014). Les auteurs ont suggéré que cette surexpression d'APP pouvait être responsable d'une perturbation de la croissance axonale et de la formation des circuits neuronaux dans le cerveau en développement chez ces patients (Sosa et al., 2014). Ces observations semblent donc conforter notre hypothèse : une sous-expression de FERMT2 serait délétère en inhibant les propriétés de molécule d'adhésion de l'APP.

1.2.3- Diminution de la LTP

L'induction de la sous-expression de FERMT2 par injection stéréotaxique de souris âgées de 10 semaines révèle une diminution de la LTP. Cet impact de la sous-expression de FERMT2 sur la LTP est inhibé en absence d'APP alors que la sous-expression d'APP seule ne modifie pas la LTP par rapport au contrôle. Cependant, plusieurs études ont reporté des déficits chez des souris KO déficientes APP-/- notamment au niveau de l'apprentissage et de la mémoire, attribuable à des perturbations de la LTP (SOUTHAM et al., 2018). Néanmoins, dans ces études, les effets ont été rapportés chez des souris âgées de 9 à 12 mois alors que dans notre étude, les souris, plus jeunes, âgées de 2 mois et demi, pourraient présenter un mécanisme de compensation de la perte d'APP dépendant de l'âge des souris.

Suivant notre hypothèse, la sous-expression de FERMT2 induite par le miR-4504, inhiberait l'interaction FERMT2-APP perturbant le métabolisme de l'APP et pourrait avoir un effet délétère pendant le processus physiopathologique de la MA via une inhibition de la plasticité synaptique (Figure 41). En effet, nous avons pu montrer dans un premier temps que la sous-expression de FERMT2 augmente les niveaux d'Aβ sécrétés. De façon intéressante, une étude a montré que le traitement de peptides Aβ dans des cultures primaires neuronales augmente la densité synaptique, la croissance des neurites et leur arborisation pendant 24 à 48H (Evans et al., 2008). D'autre part, le clivage anormal de l'APP via la sous-expression de FERMT2 pourrait aussi perturber ses fonctions d'adhésion cellulaire (Sheng et al., 2009). En revanche, Evans et al., ont également montré qu'après 72H, un traitement de cultures primaires de neurones par des oligomères Aβ conduit à une perte synaptique évidente (Evans et al., 2008). Dans ce contexte, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'avec le temps, la surproduction d'Aβ conduirait à une diminution de la LTP (Figure 44). A présent, il s'agirait donc de confirmer cette hypothèse et de déterminer par quel(s)

mécanisme(s) la sous-expression de FERMT2 perturbe la LTP. Nous avons montré précédemment qu'en plus de conduire à une surproduction de peptides A β , tous les métabolites issus du métabolisme de l'APP sont augmentés après la sous-expression de FERMT2 (Figure 29). D'autre part, de nouvelles études récentes soulignent l'impact du fragment C99 dans le processus physiopathologique de la MA. En effet, ce fragment C99 se trouve accumulé au niveau intra-neuronal et conduirait à de nombreuses perturbations synaptiques conduisant à des altérations de l'apprentissage ou encore un phénotype apathique (Bourgeois et al., 2018). Ainsi, à l'heure actuelle, il n'est pas possible de distinguer, si l'effet de la sous-expression de FERMT2 sur la LTP est dû à une accumulation des formes totales de l'APP ou d'un de ces métabolites en particulier.

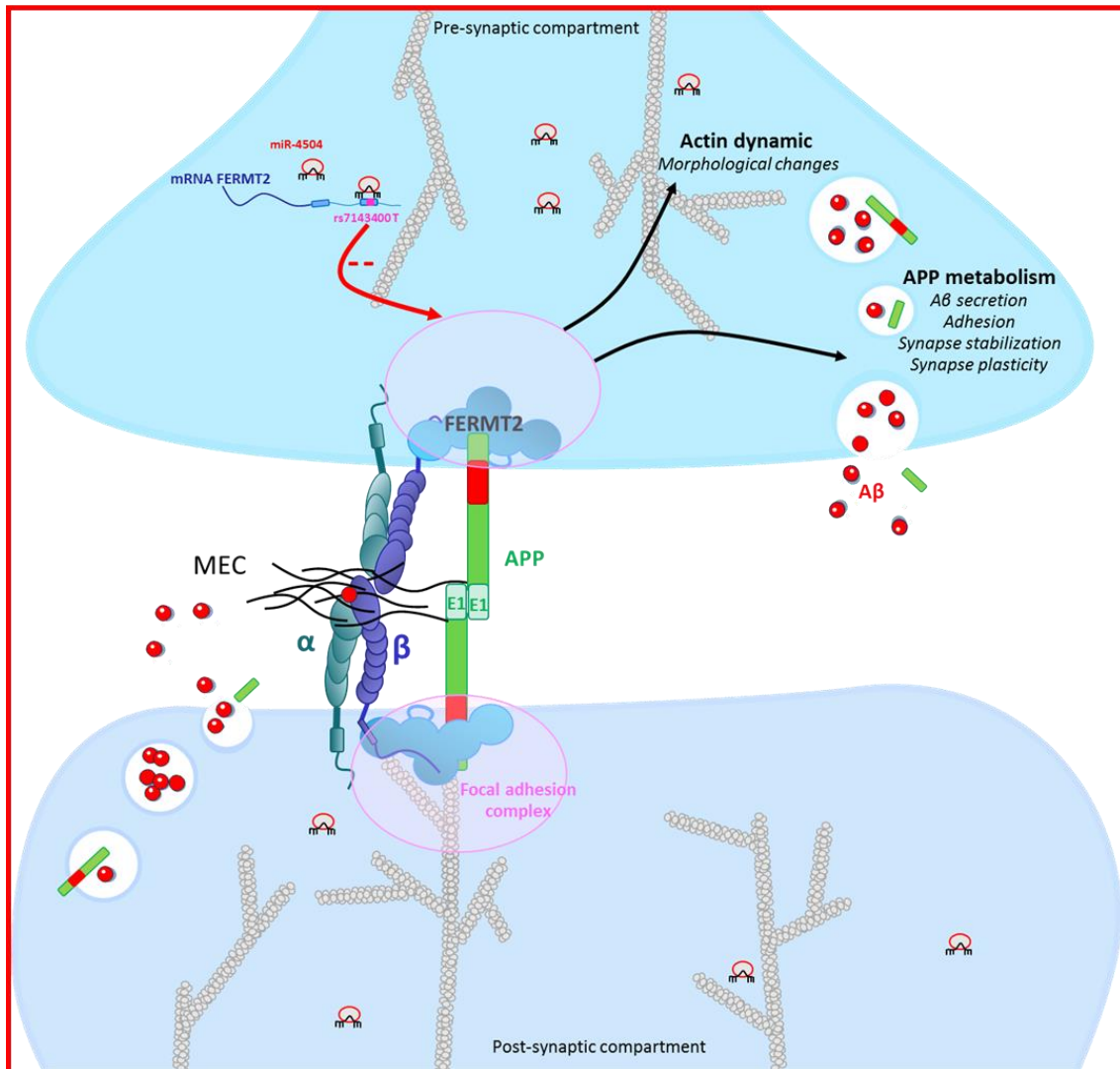
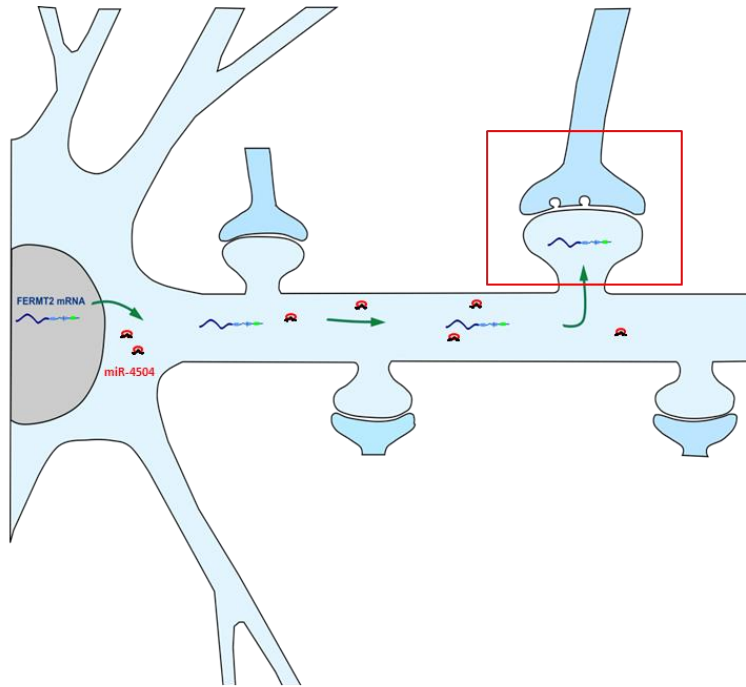


Figure 44 : Schéma récapitulatif de l'impact de la sous-expression de FERMT2 au niveau synaptique dans le contexte physiopathologique de la MA. Le miR-4504, surexprimé dans le cerveau des patients atteints de la MA se fixe sur la région 3'UTR de l'ARNm de FERMT2 présentant le polymorphisme rs7143400 T et transporté jusqu'à la synapse. Ici, la fixation du miR conduit à une inhibition de la traduction de la protéine FERMT2 qui n'interagit plus avec l'APP. La perturbation de cette interaction conduit à plusieurs déficits à la synapse. (i) Le métabolisme de l'APP est perturbé conduisant à une augmentation de la production de peptides A β . (ii) Par ailleurs, l'APP n'assure plus ses fonctions de molécule d'adhésion entraînant une perte de la stabilisation des synapses et une diminution de la plasticité synaptique. (iii) La sous-expression de FERMT2 conduit également à une diminution de l'activation de la voie des intégrines. Tout comme pour l'APP, les intégrines sont nécessaires pour assurer le bon fonctionnement synaptique. (iv) Enfin, l'A β surexprimé pourrait également se fixer au niveau des intégrines et conduire à leur activation aberrante aboutissant également à la perte synaptique en induisant des changements morphologiques via la dynamique d'actine.

1.3- Importance de FERMT2 dans le fonctionnement synaptique

Puisque FERMT2 est présent tant au niveau pré-synaptique qu'au niveau post-synaptique et perturbe les fonctions synaptiques telle que la plasticité, nous avons voulu étudier plus précisément le rôle de FERMT2 dans chaque compartiment synaptique. Pour cela, l'utilisation de microfluidiques s'est révélée encore une fois indispensable. Nous avons pu ainsi visualiser les synapses créées entre un neurone pré-synaptique issu du compartiment pré-synaptique et des dendrites de neurones post-synaptiques issus du compartiment post-synaptique. De ce fait, la sous-expression de FERMT2 et/ou APP dans le compartiment pré-synaptique a été réalisée dans un premier temps à DIV 1 dans le but d'évaluer son impact dans un contexte développemental. Nos résultats préliminaires montrent que la sous-expression de FERMT2 au niveau pré-synaptique diminue également la densité synaptique. En revanche, la co-transduction des deux shFERMT2 et shAPP simultanément ne modifie pas la densité synaptique. En d'autres termes et quel que soit le mécanisme observé (élongation des axones, plasticité synaptique et densité synaptique), l'expression de l'APP est nécessaire pour observer l'impact de la sous-expression de FERMT2 dans les neurones. Il est également à noter que le procédé utilisé dans notre étude concernant la quantification de la densité synaptique via l'analyse de l'appariement des compartiments pré- et post-synaptiques, a été développé par la suite pour des plaques 384 puits dans un contexte de criblage à haut débit. Cette méthode permettrait d'analyser à grande échelle l'impact des gènes et miRs, régulateurs du métabolisme de l'APP, sur la densité synaptique.

La sous-expression de FERMT2 augmente le taux d'A β sécrété qui pourrait, à terme, s'accumuler et conduire à la perte synaptique (Mairet-Coello et al., 2013). Cependant, cette sous-expression pourrait conduire à bien d'autres perturbations au niveau synaptique. Mis à part dans le cône de croissance, les filopodes issus des structures post-synaptiques sont considérés comme les précurseurs des épines dendritiques. Les synapses naissent donc entre un axone et ces filopodes au niveau des dendrites et c'est la transition des filopodes en épines dendritiques, accompagnant la maturation neuronale, qui permet de

stabiliser les synapses (Ziv & Smith, 1996). Ces données corroborent donc nos résultats puisque la sous-expression de FERMT2 au niveau pré-synaptique semble diminuer la densité synaptique. Les expériences conduisant à la sous-expression de FERMT2 et/ou l'APP au niveau post-synaptique sont en cours de finalisation et nous permettront de déterminer si FERMT2 a un rôle différent selon sa localisation en pré- ou en post-synaptique pour la formation des synapses.

En outre, le domaine intracellulaire de l'APP est connu pour jouer un rôle dans la plasticité synaptique ainsi que la morphologie des synapses (Stahl et al., 2014). En interagissant via ce domaine intracellulaire avec FERMT2, il est fort probable que ce dernier participe également aux diverses fonctions synaptiques dans le contexte de la MA. Récemment, un nouveau modèle réévaluant la cascade amyloïde a d'ailleurs été proposé sans pour autant la disqualifier. Ce modèle implique un cercle vicieux où l'adhésion focale, impliquant FERMT2 et APP, serait finalement au centre du processus physiopathologique de la MA et la toxicité des oligomères A β , le métabolisme de l'APP et l'excitotoxicité de Tau conduisent tous aux dysfonctions synaptiques (Dourlen et al., 2019). Cette hypothèse est appuyée par une étude montrant que les mutations responsables des formes autosomiques dominantes de la MA altèrent également l'activité de FAK, impliquée dans les adhésions focales, et conduisent à une perturbation de la migration et de l'adhésion cellulaire dans les cellules neuroblastomes N2a (Sheng et al., 2009). De plus, plusieurs gènes GWAS impliqués dans les adhésions focales (*PTK2B*, *Cass4*, *EPHA1*) sont également impliqués dans la toxicité liée à Tau chez la drosophile (Dourlen et al., 2017) et pourraient expliquer en partie l'association systématique des pathologies amyloïdes et Tau dans la MA. De même, FERMT2 pourrait être impliquée dans des mécanismes moléculaires à l'interface de ces deux lésions car il a été décrit pour moduler la toxicité de la protéine Tau, également chez la drosophile (Shulman et al., 2014).

2- Perspectives

2.1- Etude de la régulation de l'expression du miR-4504

Comme nous l'avons vu le miR-4504, principalement exprimé dans les neurones, a été retrouvé sur-exprimé dans le cerveau de patients par rapport à celui de témoins. Nous pouvons supposer qu'un stress neuronal serait à l'origine de cette augmentation d'expression. Or, cette sur-expression conditionne la fonctionnalité du variant rs7143400. Ainsi, lutter contre l'apparition de cette sur-expression serait un moyen de limiter ses effets délétères passant par la sous expression de FERMT2.

Afin de mieux comprendre les facteurs favorisant l'expression du miR-4504, nous pourrions étudier les niveaux d'expression de ce miR à partir de cultures de neurones issus d'iPSC et traitées par différents

composés. Il serait particulièrement intéressant d'évaluer si une exposition des neurones aux oligomères d'A β mimerait un contexte pathologique favorisant l'expression du miR-4504.

D'autre part, l'étude de la régulation du gène (*MIR 4504*) à l'origine de l'expression du miR-4504 permettrait d'identifier les facteurs de transcription modulant son niveau d'expression. Ainsi, une inactivation pharmacologique des voies conduisant à la sur-expression du miR-4504 pourrait être envisagée. Par ailleurs, l'utilisation d'un anti-miR, séquence complémentaire du miR endogène, pourrait alors permettre de limiter son expression. Cependant ces stratégies thérapeutiques visant à cibler l'expression du miR-4504 s'avèrent complexes du fait de la non spécificité du miR-4504 vis-à-vis de FERMT2, entraînant potentiellement des effets indésirables.

2.2- Caractérisation de l'interaction FERMT2-APP

Nous avons montré que l'effet de FERMT2 sur le métabolisme de l'APP nécessite une interaction directe entre ces deux protéines. Ainsi, la caractérisation de l'interaction FERMT2-APP et de ses modulateurs devrait permettre une meilleure compréhension de l'impact de FERMT2 sur le métabolisme de l'APP. En collaboration avec le Dr Xavier Hanouille (UMR8576, CNRS, Lille), nous étudierons quels sont les acides aminés nécessaires et/ou suffisants à l'interaction des protéines recombinantes de FERMT2 et APP par résonance magnétique nucléaire (RMN). Par ailleurs, les profils RMN à partir des domaines recombinants F3 de FERMT2^{WT} et FERMT2^{QW} pourront être comparés. Enfin, des expériences de cristallographie aux rayons X permettront de déterminer la structure tridimensionnelle du complexe FERMT2-APP.

2.3- Discriminer l'impact de la sous-expression de FERMT2 entre les compartiments pré- et post-synaptiques après la maturation neuronale

Nos résultats issus du modèle de microfluidique ont montré que l'expression de FERMT2 au niveau pré-synaptique était nécessaire pour la synaptogénèse. Cependant, ces résultats ont été obtenus après une induction de la sous-expression de FERMT2 de façon précoce (DIV1) et ne reflètent pas la sous-expression de FERMT2 dans le contexte physiopathologique de la MA qui interviendrait après la maturation neuronale. Il s'agirait donc d'étudier par la suite la sous-expression de FERMT2 sur la densité synaptique au travers d'une transduction lentivirale du shFERMT2 après maturation neuronale. En effet, pendant la MA, une diminution d'environ 25% du marqueur pré-synaptique Synaptophysin I est observée dans le compartiment pré-synaptique (Masliah et al., 2001). Cette perspective permettrait *in fine* de déterminer les conséquences de la sous-expression de FERMT2 au niveau pré- et/ou post-synaptique. Etant donné

que la sous-expression de FERMT2 diminue la LTP dans des coupes d'hippocampes de souris âgées de 10 semaines, on pourrait s'attendre à ce que la sous-expression de FERMT2 au niveau post-synaptique ait également un effet délétère et diminue la densité synaptique tout comme la sous-expression de FERMT2 au niveau pré-synaptique.

2.4- Identifier comment la sous-expression de FERMT2 diminue la LTP et quelles sont les conséquences sur les mécanismes de mémoire et d'apprentissage

Un des mécanismes pouvant expliquer la diminution de la LTP implique l'augmentation de la production des peptides A β suite à la sous-expression de FERMT2. Tout d'abord, le peptide A β peut interagir avec les intégrines (Sabo et al., 1995) et activer la voie de signalisation de façon soutenue (au lieu d'être transitoire). Dans ce contexte, l'A β serait donc neurotoxique (Wright et al., 2007). Même si les mécanismes expliquant cette neurotoxicité est encore controversée, les auteurs s'accordent pour conclure à une activation aberrante de la voie des intégrines (Grace & Busciglio, 2003; Wright et al., 2007) qui augmenterait la sensibilité des récepteurs NMDA tout en diminuant la LTP et conduirait à la dystrophie neuronale (Grace & Busciglio, 2003; Juhász et al., 2010; Wang et al., 2008).

Une autre hypothèse suggère que les oligomères A β peuvent lier les β -intégrines dans leur conformation active intermédiaire et conduire à l'activation de la cofilin (par déphosphorylation). La cofilin permet la dépolymérisation des filaments d'actine et dans ce contexte, pourrait conduire à des réarrangements morphologiques aberrants des épines dendritiques pouvant inhiber la formation des synapses (Webb et al., 2007) et également participer à la diminution de la LTP (Hotulainen & Hoogenraad, 2010; Spence & Soderling, 2015).

L'ensemble de ces données suggère donc que l'augmentation de la production de peptides β amyloïdes via la sous-expression de FERMT2 conduirait à des modifications morphologiques via un réarrangement des filaments d'actine mais aussi des modifications biochimiques via une augmentation de la sensibilité des récepteurs NMDA, tous deux pouvant conduire à une diminution de la LTP (Figure 44). En sous-exprimant FERMT2 simultanément à une inhibition de la voie des intégrines par exemple, on pourrait s'attendre à augmenter la production de peptides A β mais perdre l'effet de la sous-expression de FERMT2 sur la plasticité synaptique si de tels mécanismes étaient mis en jeu. La phosphorylation des sous-unités NR2A et NR2B des récepteurs NMDA pourrait être vérifiée par WB ainsi que la polymérisation des filaments d'actine après un fractionnement d'actine G (monomérique) soluble et d'actine F (filamenteuse) insoluble associée au cytosquelette.

Par ailleurs, l'utilisation d'un modèle murin KO conditionnel pour FERMT2 disponible depuis quelques semaines au laboratoire permettrait d'engager de nouvelles perspectives de recherches concernant les mécanismes moléculaires impliquant FERMT2 dans le processus physiopathologique de la MA. Puisque la sous-expression de FERMT2 au stade précoce du développement est létale (Montanez et al., 2008), nous avons choisi de sous-exprimer FERMT2 uniquement dans les neurones des souris à partir du 14^e jour post-natal. Pour cela, deux lignées murines sont nécessaires. La première lignée de souris FERMT2^{flox} contient la construction du gène de FERMT2, dont les exons 5 et 6 sont inclus entre deux sites LoxP. Ce modèle provient de l'IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire) de Strasbourg. L'expression de la Cre pourrait alors être apportée par le modèle murin CaMKII^{Cre}, également disponible au laboratoire et basé sur l'expression d'un transgène Cre recombinase sous contrôle du promoteur CaMKII α (protéine kinase Ca²⁺/Calmoduline dépendante) (Tsien et al., 1996). L'expression de la Cre pourra par la suite permettre l'excision des exons 5 et 6, invalidant ainsi le gène dans les neurones.

A partir de ces souris KO conditionnelles FERMT2, plusieurs études pourront être réalisées pour leur caractérisation. FERMT2 est d'abord connu dans la littérature pour son implication dans le développement et la progression de plusieurs types de cancers (Shi & Wu, 2008). Par ailleurs, FERMT2 participe aussi au développement des muscles cardiaque et squelettiques (Rognoni et al., 2016). Il s'agira donc de s'assurer dans un premier temps que les souris ne développent pas de tumeurs de façon précoce et ne présentent pas de troubles musculaires pouvant altérer les résultats issus d'analyses de comportements. Par exemple, le test de reconnaissance d'objets ou le Barnes Maze permettront de corroborer les résultats obtenus sur la plasticité synaptique et indiqueront si les souris KO FERMT2 montrent des altérations du comportement, d'apprentissage ou de mémoire. Dans un deuxième temps, si les souris KO FERMT2 ne présentent pas de phénotype, elles pourront être croisées avec des souris hAPPJ20 disponibles au laboratoire. Même si ce modèle murin ne permet pas de reproduire totalement tous les phénotypes et symptômes de la MA, il reste utile pour l'étude des mécanismes physiopathologiques de la maladie. Ce modèle surexprime une forme de l'APP présentant les deux mutations Swedish (APP KM670/671NL) et Indiana (APP V717F) retrouvées dans les formes familiales de la MA. Par la surexpression de l'APP doublement muté au niveau du néocortex et de l'hippocampe, ce modèle murin présente déjà une augmentation de production du peptide β -amyloïde ainsi que la formation de plaques amyloïdes à partir de 5 mois. Des perturbations de la plasticité synaptique ainsi que des déficits de la mémoire et de l'apprentissage sont également caractéristiques de ce modèle. Dans ce contexte, nous pourrions donc comparer les 3 modèles murins, KO FERMT2, hAPPJ20 et les souris issues du croisement de ces deux lignées par des études de comportements. Par ailleurs, nous pourrions évaluer si la sous-expression de FERMT2 chez les souris hAPPJ20 aggrave ou

non les altérations cognitives déjà présentes par un effet synergique. Puisque FERMT2 pourrait potentiellement jouer un rôle dans la pathologie liée à Tau (Dourlen et al., 2017; Shulman et al., 2014), le croisement des souris KO FERMT2 avec un modèle murin plus pertinent de la MA et présentant également des dégénérescences neurofibrillaires, comme les souris 3xTgAD (APP^{swe} KM670/671NL, Tau_{P301L}, PS1_{M146V}) permettrait d'évaluer l'impact de la sous-expression de FERMT2 sur la toxicité liée à Tau.

2.5- Implication pour les stratégies post-GWAS

2.5.1- Etude d'autres gènes impliqués dans le métabolisme de l'APP

Notre hypothèse de départ précisait que la présence de variant(s), associé(s) au risque de développer la MA, pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes GWAS et le contrôle du métabolisme de l'APP via la création et/ou suppression de sites de fixation pour des miRs. Nos travaux ont confirmé cette hypothèse dans le cadre de la sous-expression délétère de FERMT2 dépendante de l'allèle T du variant rs7143400 et de l'expression du miR-4504. Cependant, au-delà de FERMT2, nos criblages ont généré de nombreuses données et ont identifié plusieurs gènes (832) et miR (50) susceptibles d'avoir un fort impact sur le métabolisme de l'APP. Ces résultats pourront faire l'objet d'analyses croisées avec les nouvelles données génétiques qui seront bientôt disponibles au laboratoire. En effet, notre laboratoire pilote le projet European Alzheimer DNA Biobank (EADB) permettant l'étude de population de plus grande taille, susceptible d'augmenter significativement le nombre de *loci* associés au risque de développer la MA et donc le nombre de gènes d'intérêts. Les gènes associés, dont l'expression aura été montrée comme capable de moduler le métabolisme de l'APP lors de nos criblages HCS, pourront faire l'objet d'une analyse approfondie en suivant la même méthodologie que celle développée au cours de ma thèse.

A plus long terme, ces travaux permettraient une vision plus intégrée du rôle des différents facteurs de prédisposition génétique tout en les positionnant dans la physiopathologie en lien avec le métabolisme de l'APP.

2.5.2- Elargissement des modèles de criblage

Les régions chromosomiques associées au risque de développer la MA qui sont identifiées par les GWAS, correspondent à des signaux complexes pour lesquels il n'est pas possible de préjuger de la fonctionnalité des gènes, ni des variants réellement impliqués dans le processus physiopathologique. Même si notre modèle de criblage s'est révélé pertinent pour l'identification de la régulation de l'expression de FERMT2 par les miRs, il présente certaines limites qui pourraient rendre impossible l'identification de ce

mode de régulation pour d'autres gènes. En effet, un gène ou un miR non exprimé dans les cellules HEK293 rendent impossible l'identification de ceux-ci par nos criblages. Dans ce contexte, l'évolution des modèles de criblage à partir d'iPSC différenciées en neurones permettrait de mettre à jour d'autres régulations de gènes impliqués dans le métabolisme de l'APP par les miRs. La reprogrammation cellulaire des fibroblastes issus de patients permettrait d'obtenir des modèles cellulaires incluant les variants d'intérêt. Cependant, les allèles à risques sont le plus souvent présents à des fréquences faibles dans la population générale (10% ou moins) rendant particulièrement difficile la mise en place de ces modèles. De plus, seule la comparaison de cellules isogéniques, ne différant que par les allèles du variant à étudier, peut apporter réellement la démonstration de la fonctionnalité de ce variant. Aussi, les cellules iPCS éditées par la technologie CRISPR-Cas9 pour générer les différents allèles d'un variant constituent actuellement le meilleur modèle actuel que nous cherchons à développer au sein du laboratoire.

Ce projet a finalement été développé dans le but d'identifier des modulateurs du métabolisme de l'APP. Il conviendrait donc de multiplier les approches HCS qui semblent être les plus adaptées au criblage fonctionnel d'un si grand nombre de gènes. Par exemple, d'autres modèles cellulaires sont en cours de développement afin de cribler l'impact de ces gènes dans d'autres phénotypes associés à la MA (perte synaptique, phosphorylation de la protéine Tau...). Ces efforts devraient permettre à plus long terme d'inscrire ces recherches dans le cadre du développement d'une médecine personnalisée cherchant à moduler spécifiquement, chez des individus porteurs d'un génotype donné, les mécanismes moléculaires précisément impliqués.



CONCLUSION

En conclusion, les résultats issus de ce travail de thèse ont permis d'identifier de nouveaux modulateurs du métabolisme de l'APP que ce soit des gènes ou des miRs régulateurs de ces derniers. D'autre part, la présence de variants, associés au risque de développer la MA, conditionne la fixation de certains miRs dans la région 3'UTR des gènes régulateurs. Nous avons identifié le facteur de risque génétique *FERMT2* comme acteur majeur du métabolisme de l'APP. La présence du variant rs7143400, associé au risque de développer la MA, permet la création d'un site de fixation pour le miR-4504, surexprimé dans le cerveau de patients atteints de la MA. La fixation de ce miR dans la région 3'UTR de l'ARNm de *FERMT2* conduit à la sous-expression de la protéine de *FERMT2* aboutissant à plusieurs altérations associées aux fonctions connues de l'APP. Tout d'abord, le métabolisme de l'APP est augmenté avec une hausse de la production de peptides β amyloïdes. En interagissant directement avec l'APP, *FERMT2* assurerait les fonctions connues de molécule d'adhésion de l'APP. En effet, la sous-expression de *FERMT2* accélère la croissance axonale et entraîne une diminution de la densité synaptique, deux phénomènes mettant en jeu les mécanismes d'adhésion cellulaire. De plus, la sous-expression tardive de *FERMT2* qui serait induite par le variant rs7143400 pourrait limiter la plasticité synaptique. Dans le cadre de la MA, cette sous-expression de *FERMT2* au travers de l'expression des miRs pourrait donc être délétère et conduire à de nombreuses perturbations synaptiques et ce, de façon dépendante de l'expression d'APP.

Les résultats issus de ce projet nous permettraient de mieux comprendre les mécanismes étiologiques conditionnés par le génotype du patient et à plus long terme de développer de nouvelles approches thérapeutiques personnalisées. De façon plus générale, la poursuite de l'étude de l'implication de *FERMT2* pourrait aboutir à proposer une approche thérapeutique originale, centrée sur le maintien des fonctions d'adhésions cellulaires plutôt que sur l'élimination des peptides β amyloïdes dans le cerveau des patients.

A thick blue vertical bar runs down the left side of the page. A blue arrow points from the bar towards the right, pointing to the word 'BIBLIOGRAPHIE'.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Alzheimer A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie*, *64*, 146–148.
- Andersen, O. M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., ... Willnow, T. E. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(38), 13461–13466. <http://doi.org/10.1073/pnas.0503689102>
- Apostolova, L. G., Risacher, S. L., Duran, T., Stage, E. C., Goukasian, N., West, J. D., ... Saykin, A. J. (2018). Associations of the top 20 Alzheimer disease risk variants with brain amyloidosis. *JAMA Neurology*, *75*(3), 328–341. <http://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.4198>

B

- Bartel, D. P., Lee, R., & Feinbaum, R. (2008). MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function Genomics : The miRNA Genes, *116*(C), 281–297. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Behr, D., Elle, C., Underwood, J., Davis, J. B., Ward, R., Karran, E., ... Multhaup, G. (1999). Proteolytic fragments of Alzheimer's disease-associated presenilin 1 are present in synaptic organelles and growth cone membranes of rat brain. *Journal of Neurochemistry*, *72*(4), 1564–1573. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.721564.x>
- Bertrand, E., Brouillet, E., Caillé, I., Bouillot, C., Cole, G. M., Prochiantz, A., & Allinquant, B. (2001). A short cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis in vitro and in vivo. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *18*(5), 503–511. <http://doi.org/10.1006/mcne.2001.1030>
- Bledzka, K., Bialkowska, K., Sossey-Alaoui, K., Vaynberg, J., Pluskota, E., Qin, J., & Plow, E. F. (2016). Kindlin-2 directly binds actin and regulates integrin outside-in signaling. *Journal of Cell Biology*, *213*(1), 97–108. <http://doi.org/10.1083/jcb.201501006>
- Bloom, G. S. (2014). Amyloid- β and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurology*, *71*(4), 505–508. <http://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.5847>
- Boscher, E., Husson, T., Quenez, O., Laquerrière, A., Marguet, F., Cassinari, K., ... Rovelet-Lecrux, A. (2019). Copy Number Variants in miR-138 as a Potential Risk Factor for Early-Onset Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *68*(3), 1243–1255. <http://doi.org/10.3233/JAD-180940>
- Böttcher, R. T., Stremmel, C., Meves, A., Meyer, H., Widmaier, M., Tseng, H. Y., & Fässler, R. (2012). Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of β 1 integrins by binding to the β 1-integrin tail. *Nature Cell Biology*, *14*(6), 584–592. <http://doi.org/10.1038/ncb2501>
- Bourgeois, A., Lauritzen, I., Lorivel, T., Bauer, C., Checler, F., & Pardossi-Piquard, R. (2018). Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3xTgAD and 2xTgAD mice. *Neurobiology of Aging*, *71*, 21–31. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.038>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, *82*(4), 239–59. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1759558>

- Bray, M., & Carpenter, A. (2017). Advanced Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening and Analysis. *Assay Guidance Manual*, 1–31.
- Brodin, P., Delnery, E., & Soleilhac, E. (2015). Criblage phénotypique à haut contenu pour la chémobiologie et ses enjeux. *Medecine/Sciences*, 31(2), 187–196. <http://doi.org/10.1051/medsci/20153102016>
- Buchser, W., Collins, M., Garyantes, T., R, G., Haney, S., Lemmom, V., ... Trask Jr, O. . (2012). Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening , High Content Analysis and High Content Imaging Assay Guidance Manual. *Assay Guidance Manual*.
- Bukhari, H., Glotzbach, A., Loosse, C., & Leonhardt, G. (2017). Small things matter: Implications of APP intracellular domain AICD nuclear signaling in the progression and pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Progress in Neurobiology*, 156, 189–213. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.05.005>

C

- Cacace, R., Slegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of Alzheimer disease revisited. *Alzheimer’s and Dementia*, 12, 733–748. <http://doi.org/10.1055/s-2008-1040852>
- Carey, R. M., Balcz, B. a., Lopez-Coviella, I., & Slack, B. E. (2005). Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid β protein. *BMC Cell Biology*, 6(30), 1–10. <http://doi.org/10.1186/1471-2121-6-30>
- Carrasquillo, M. M., Allen, M., Burgess, J. D., Wang, X., Strickland, S. L., Aryal, S., ... Ertekin-Taner, N. (2017). A candidate regulatory variant at the TREM gene cluster associates with decreased Alzheimer’s disease risk and increased TREML1 and TREM2 brain gene expression. *Alzheimer’s and Dementia*, 13(6), 663–673. <http://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.10.005>
- Caswell, P. T., Vadrevu, S., & Norman, J. C. (2009). Integrins: Masters and slaves of endocytic transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(12), 843–853. <http://doi.org/10.1038/nrm2799>
- Chapuis, J., Flaig, A., Grenier-Boley, B., Eysert, F., Pottiez, V., Deloison, G., ... Lambert, J. C. (2017). Genome-wide, high-content siRNA screening identifies the Alzheimer’s genetic risk factor FERMT2 as a major modulator of APP metabolism. *Acta Neuropathologica*, 133(6), 955–966. <http://doi.org/10.1007/s00401-016-1652-z>
- Cheah, M., & Andrews, M. (2018). Integrin Activation: Implications for Axon Regeneration. *Cells*, 7(3), 20. <http://doi.org/10.3390/cells7030020>
- Chen, Z., Mengel, D., Keshavan, A., Rissman, R. a., Perkinson, M., Percival-alwyn, J., ... Walsh, D. M. (2019). Learnings about the complexity of extracellular tau aid development of a blood-based screen for Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s and Dementia*, 15(3), 487–496. <http://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.09.010.Learnings>
- Cluzel, C., Saltel, F., Lussi, J., Paulhe, F., Imhof, B. a., & Wehrle-Haller, B. (2005). The mechanisms and dynamics of $\alpha\beta3$ integrin clustering in living cells. *Journal of Cell Biology*, 171(2), 383–392. <http://doi.org/10.1083/jcb.200503017>
- Corder EH, Saunders WJ. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer’s disease in late onset families. *Science*, 261(5123), 921–923. <http://doi.org/10.1126/science.8346443>
- Coulson, E. J., Paliga, K., Beyreuther, K., & Masters, C. L. (2000). What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochemistry International*, 36(3), 175–84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676850>

D

- Dawson, G. R., Seabrook, G. R., Zheng, H., Smith, D. W., Graham, S., O'Dowd, G., ... Sirinathsinghji, D. J. S. (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the β -amyloid precursor protein. *Neuroscience*, *90*(1), 1–13. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(98\)00410-2](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(98)00410-2)
- Delay, C., Grenier-Boley, B., Amouyel, P., Dumont, J., & Lambert, J. C. (2016). MiRNA-dependent target regulation: Functional characterization of singlenucleotide polymorphisms identified in genome-wide association studies of Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, *8*(1), 1–11. <http://doi.org/10.1186/s13195-016-0186-x>
- DeMattos, R. B., Cirrito, J. R., Parsadanian, M., May, P. C., O'Dell, M. a, Taylor, J. W., ... Holtzman, D. M. (2004). ApoE and Clusterin Cooperatively Suppress A β Levels and Deposition. *Neuron*, *41*(2), 193–202. [http://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00850-x](http://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00850-x)
- Dickson, B. J. (2003). Molecular Mechanisms of Axon Guidance on JSTOR, *298*(January). Retrieved from http://www.jstor.org.proxy.cc.uic.edu/stable/3833118?seq=1#page_scan_tab_contents
- Dinkins, M. B., Dasgupta, S., Wang, G., Zhu, G., & Bieberich, E. (2014). Exosome Reduction in Vivo is associated with lower amyloid Plaque Load in the 5XFAD Mouse Model of Alzheimer ' s Disease. *Neurobiology of Aging*, *35*(8), 1792–1800. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.012>
- Dourlen, P., Chapuis, J., & Lambert, J.-C. (2018). Using High-Throughput Animal or Cell-Based Models to Functionally Characterize GWAS Signals. *Current Genetic Medicine Reports*, *6*(3), 107–115. <http://doi.org/10.1007/s40142-018-0141-1>
- Dourlen, P., Fernandez-Gomez, F. J., Dupont, C., Grenier-Boley, B., Bellenguez, C., Obriot, H., ... Deraut, B. (2017). Functional screening of Alzheimer risk loci identifies PTK2B as an in vivo modulator and early marker of Tau pathology. *Molecular Psychiatry*, *22*(6), 874–883. <http://doi.org/10.1038/mp.2016.59>
- Dourlen, P., Kilinc, D., Malmanche, N., Chapuis, J., & Lambert, J. C. (2019). The new genetic landscape of Alzheimer's disease: from amyloid cascade to genetically driven synaptic failure hypothesis? *Acta Neuropathologica*, (0123456789). <http://doi.org/10.1007/s00401-019-02004-0>

E

- Evans, N. a., Facci, L., Owen, D. E., Soden, P. E., Burbidge, S. a., Prinjha, R. K., ... Skaper, S. D. (2008). A β 1-42 reduces synapse number and inhibits neurite outgrowth in primary cortical and hippocampal neurons: A quantitative analysis. *Journal of Neuroscience Methods*, *175*(1), 96–103. <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.08.001>

F

- Farfel, J. M., Yu, L., Buchman, A. S., Schneider, J. a., De Jager, P. L., & Bennett, D. a. (2016). Relation of genomic variants for Alzheimer disease dementia to common neuropathologies. *Neurology*, *87*(5), 489–496. <http://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002909>
- Ferretti, M. T., Iulita, M. F., Cavedo, E., Chiesa, P. A., Dimech, A. S., Chadha, A. S., ... Hampel, H. (2018). Sex differences in Alzheimer disease — The gateway to precision medicine. *Nature Reviews Neurology*, *14*(8), 457–469. <http://doi.org/10.1038/s41582-018-0032-9>
- Frandemiche, M. L., De Seranno, S., Rush, T., Borel, E., Elie, a., Arnal, I., ... Buisson, a. (2014). Activity-Dependent Tau Protein Translocation to Excitatory Synapse Is Disrupted by Exposure to Amyloid-Beta Oligomers. *Journal of Neuroscience*, *34*(17), 6084–6097. <http://doi.org/10.1523/jneurosci.4261-13.2014>
- Furukawa, K., Sopher, B. L., Rydel, R. E., Begley, J. G., Pham, D. G., Martin, G. M., ... Mattson, M. P. (1996). 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), 1882–1896. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67051882.x>

G

- Gao, J., Khan, A. A., Shimokawa, T., Zhan, J., Strömlad, S., Fang, W., & Zhang, H. (2013). A feedback regulation between Kindlin-2 and GLI1 in prostate cancer cells. *FEBS Letters*, *587*(6), 631–638. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.028>
- Gatz, M., Fiske, A., Pedersen, N. L., Fratiglioni, L., Reynolds, C. a., Johansson, B., ... Berg, S. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Archives of General Psychiatry*, *63*(2), 168–174. <http://doi.org/10.1001/archpsyc.63.2.168>
- Gentier, R. J., & van Leeuwen, F. W. (2015). Misframed ubiquitin and impaired protein quality control: an early event in Alzheimer's disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *8*(September), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00047>
- Ghosal, K., Vogt, D. L., Liang, M., Shen, Y., Lamb, B. T., & Pimplikar, S. W. (2009). Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(43), 18367–18372. <http://doi.org/10.1073/pnas.0907652106>
- Goate, Chartier-Harlin, Mullan, Brown, Crawford, Fidani, Giuffra, Haynes, Irving, James, Mant, Newton, Rooke, Roques, Talbot, Pericak-Vance, Roses, Williamson, Rossor, Owen, H. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid β -protein precursor gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, *349*, 704–706. <http://doi.org/10.3233/jad-2006-9s338>
- Goedert, M. (2015). Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. *Science*, *349*(6248). <http://doi.org/10.1126/science.1255555>
- Grace, E. a., & Busciglio, J. (2003). Aberrant activation of focal adhesion proteins mediates fibrillar amyloid β -induced neuronal dystrophy. *Journal of Neuroscience*, *23*(2), 493–502.

- Grashoff, C., Thievensen, I., Lorenz, K., Ussar, S., & Fässler, R. (2004). Integrin-linked kinase: Integrin's mysterious partner. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(5), 565–571. <http://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.07.004>
- Griciuc et al. (2013). Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of Amyloid beta. *Neuron*, 78(4), 631–643. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>
- GTEX Consortium, K. G., Deluca, D. S., Segre, A. V., Sullivan, T. J., Young, T. R., Gelfand, E. T., ... Dermitzakis, E. T. (2015). Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6235), 648–60. <http://doi.org/10.1126/science.1262110>

H

- Harburger, D. S., Bouaouina, M., & Calderwood, D. a. (2009). Kindlin-1 and -2 directly bind the C-terminal region of β integrin cytoplasmic tails and exert integrin-specific activation effects. *Journal of Biological Chemistry*, 284(17), 11485–11497. <http://doi.org/10.1074/jbc.M809233200>
- Hardy, J. a., & Higgins, G. a. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184–185. <http://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Hardy, J., Selkoe, D. J., Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *American Association for the Advancement of Science*, 297(5580), 353–356.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Hamshere, M., Pahwa, J. S., ... Pankratz, V. S. (2009). Genome-Wide Association Study Identifies Variants at CLU and PICALM Associated with Alzheimer's Disease, and Shows Evidence for Additional Susceptibility Genes. *Nature Genetics*, 41(10), 1088–1093. <http://doi.org/10.1038/ng.440>. Genome-wide
- He, Z., Guo, J. L., McBride, J. D., Narasimhan, S., Kim, H., Changolkar, L., ... Lee, V. M.-Y. (2018). Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nature Medicine*, 24(1), 29–38. <http://doi.org/10.1038/nm.4443>
- Hébert, S. S., & Delay, C. (2011). MicroRNAs and Alzheimer's disease mouse models: Current insights and future research avenues. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2011. <http://doi.org/10.4061/2011/894938>
- Herrup, K. (2015). The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nature Neuroscience*, 18(6), 794–799. <http://doi.org/10.1038/nn.4017>
- Hoe, H., Lee, K. J., Carney, R. S. E., Lee, J., Lee, J., Howell, B. W., ... Rebeck, G. W. (2009). Interaction of Reelin with APP promotes neurite outgrowth. *Journal of Neuroscience*, 29(23), 7459–7473. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4872-08.2009>. Interaction
- Hollingworth, P. (2011). Common variants in ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 43(5), 429–435. <http://doi.org/10.1038/ng.803>. Common
- Hotulainen, P., & Hoogenraad, C. C. (2010). Actin in dendritic spines: Connecting dynamics to function. *Journal of Cell Biology*, 189(4), 619–629. <http://doi.org/10.1083/jcb.201003008>

- Huang, Y. A., Zhou, B., Wernig, M., & Südhof, T. C. (2018). StarMethods:ApoE2, ApoE3, and ApoE4 Differentially Stimulate APP Transcription and Ab Secretion, *168*(3), 427–441. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.044.ApoE2>
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, *110*(6), 673–687. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6)

I

- Iaccarino, L., Tammewar, G., Ayakta, N., Baker, S. L., Bejanin, A., Boxer, A. L., ... Rabinovici, G. D. (2018). Local and distant relationships between amyloid, tau and neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *NeuroImage: Clinical*, *17*(February 2017), 452–464. <http://doi.org/10.1016/j.nicl.2017.09.016>
- Itoh, T., & De Camilli, P. (2006). BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH domains in the regulation of membrane-cytosol interfaces and membrane curvature. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1761*(8), 897–912. <http://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.06.015>
- Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., ... Götz, J. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in alzheimer's disease mouse models. *Cell*, *142*(3), 387–397. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.036>

J

- Jack Jr. (2013). Update on hypothetical model of Alzheimer's disease biomarkers. *Lancet Neurol*, *12*(2), 207–216. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70291-0.Update](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70291-0.Update)
- Jäger, S., Leuchtenberger, S., Martin, A., Czirr, E., Wesselowski, J., Dieckmann, M., ... Pietrzik, C. U. (2009). α -secretase mediated conversion of the amyloid precursor protein derived membrane stub C99 to C83 limits A β generation. *Journal of Neurochemistry*, *111*(6), 1369–1382. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06420.x>
- Jansen, I. E., Savage, J. E., Watanabe, K., Bryois, J., Williams, D. M., Steinberg, S., ... Posthuma, D. (2019). Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nature Genetics*, *51*(3), 404–413. <http://doi.org/10.1038/s41588-018-0311-9>
- Jefferson, T., Čaušević, M., Auf Dem Keller, U., Schilling, O., Isbert, S., Geyer, R., ... Becker-Pauly, C. (2011). Metalloprotease mepripin β generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(31), 27741–27750. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.252718>
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. ., Snaedal, J., ... et al. (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of AD. *New England Journal of Medicine*, *368*(2), 107–116. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1211103.Variant>
- Jucker & Walker. (2011). Pathogenic Protein Seeding in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Annals of Neurology*, *70*(4), 532–540. <http://doi.org/10.1002/ana.22615.Pathogenic>
- Jucker & Walker. (2013). Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*, *501*(7465), 45–51.

Juhász, G., Vass, G., Hunya, Á., Fülöp, L., Penke, B., Barkóczi, B., ... Budai, D. (2010). Fibrillar A β 1-42 enhances NMDA receptor sensitivity via the integrin signaling pathway. *Journal of Alzheimer's Disease*, 19(3), 1055–1067. <http://doi.org/10.3233/JAD-2010-1301>

K

Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols*, 1(5), 2406–2415. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.356>

Khera, R., & Das, N. (2009). Complement Receptor 1: Disease associations and therapeutic implications. *Molecular Immunology*, 46(5), 761–772. <http://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.09.026>

Kim, H. J., Park, J. W., Park, J. W., Byun, J. H., Vahidi, B., Rhee, S. W., & Jeon, N. L. (2012). Integrated microfluidics platforms for investigating injury and regeneration of CNS axons. *Annals of Biomedical Engineering*, 40(6), 1268–1276. <http://doi.org/10.1007/s10439-012-0515-6>

Kim, J., Basak, J. M., & Holtzman, D. M. (2009). The role of Apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*, 63(3), 287–303. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.026>.The

Kim, W. S., Li, H., Ruberu, K., Chan, S., Elliott, D. a., Low, J. K., ... Garner, B. (2013). Deletion of Abca7 Increases Cerebral Amyloid- Accumulation in the J20 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, 33(10), 4387–4394. <http://doi.org/10.1523/jneurosci.4165-12.2013>

Klevanski, M., Herrmann, U., Weyer, S. W., Fol, R., Cartier, N., Wolfer, D. P., ... Muller, U. C. (2015). The APP Intracellular Domain Is Required for Normal Synaptic Morphology, Synaptic Plasticity, and Hippocampus-Dependent Behavior. *Journal of Neuroscience*, 35(49), 16018–16033. <http://doi.org/10.1523/jneurosci.2009-15.2015>

Koo & Squazzo. (1994). Evidence that production and release of Amyloid b-protein involves the endocytic pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(26), 17386–17389.

Kunkle, B. W., Grenier-Boley, B., Sims, R., Bis, J. C., Damotte, V., Naj, A. C., ... Pericak-Vance, M. a. (2019). Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nature Genetics*, 51(3), 414–430. <http://doi.org/10.1038/s41588-019-0358-2>

Kwart, D., Gregg, A., Scheckel, C., Murphy, E., Paquet, D., Duffield, M., ... Tessier-Lavigne, M. (2019). A Large Panel of Isogenic APP and PSEN1 Mutant Human iPSC Neurons Reveals Shared Endosomal Abnormalities Mediated by APP β -CTFs, Not A β . *Neuron*, 1–15. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.010>

L

Lai-Cheong, J. E., Parsons, M., & McGrath, J. a. (2010). The role of kindlins in cell biology and relevance to human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 42(5), 595–603. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.10.015>

Lalowski, M., Golabek, A., Lemere, C. ., Selkoe, D. ., Wisniewski, H. ., Beavis, R. ., ... Wisniewski, T. (1996). The “nonamyloidogenic” p3 fragment (amyloid β 17-42) is a major constituent of Down's syndrome

- cerebellar preamyloid. *Journal of Biological Chemistry*, 271(52), 33623–33631. <http://doi.org/10.1074/jbc.271.52.33623>
- Lambert, J. C., & Amouyel, P. (2011). Genetics of Alzheimer's disease: New evidences for an old hypothesis? *Current Opinion in Genetics and Development*, 21(3), 295–301. <http://doi.org/10.1016/j.gde.2011.02.002>
- Lambert, J. C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., ... Pilotto, A. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 41(10), 1094–1099. <http://doi.org/10.1038/ng.439>
- Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. a., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., ... Seshadri, S. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 45(12), 1452–1458. <http://doi.org/10.1038/ng.2802>
- Lannfelt, Lars, H. B. (1995). Decreased a-secretase-cleaved amyloid precursor protein as a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 1(8), 829–832.
- Larner. (1999). Hypothesis: Amyloid β -peptides truncated at the N-terminus contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 20(1), 65–69. [http://doi.org/10.1016/S0197-4580\(99\)00014-7](http://doi.org/10.1016/S0197-4580(99)00014-7)
- Lasagna-Reeves, C. a., Castillo-Carranza, D. L., Sengupta, U., Guerrero-Munoz, M. J., Kiritoshi, T., Neugebauer, V., ... Kaye, R. (2012). Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau. *Scientific Reports*, 2. <http://doi.org/10.1038/srep00700>
- Letenneur, L. (1999). Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 66(2), 177–183. <http://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.177>
- Levy, E. (2017). Exosomes in the diseased brain: First insights from in vivo studies. *Frontiers in Neuroscience*, 11(MAR). <http://doi.org/10.3389/fnins.2017.00142>
- Li, H., Deng, Y., Sun, K., Yang, H., Liu, J., Wang, M., ... Yu, C. (2017). Structural basis of kindlin-mediated integrin recognition and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35), 9349–9354. <http://doi.org/10.1073/pnas.1703064114>
- Li, Rena, Jie Cui, Y. S. (2014). Brain sex matters : oestrogen in cognition and Alzheimer's disease. *Mol Cell Endocrinol*, 389(0), 13–21. <http://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Liu, Z., Lu, D., Wang, X., Wan, J., Liu, C., & Zhang, H. (2015). Kindlin-2 phosphorylation by Src at Y193 enhances Src activity and is involved in Migfilin recruitment to the focal adhesions. *FEBS Letters*, 589(15), 2001–2010. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.038>
- Lorent, K., Overbergh, L., Moechars, D., De Strooper, B., Van Leuven, F., & Van den Berghe, H. (1995). Expression in mouse embryos and in adult mouse brain of three members of the amyloid precursor protein family, of the alpha-2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and of its ligands apolipoprotein E, lipoprotein lipase, . *Neuroscience*, 65(4), 1009–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7542371>
- Lu, D. C., Soriano, S., Bredesen, D. E., & Koo, E. H. (2003). Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid β -protein toxicity. *Journal of Neurochemistry*, 87(3), 733–741. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02059.x>

M

- Mahley, R. W., & Huang, Y. (2012). Apolipoprotein E Sets the Stage: Response to Injury Triggers Neuropathology, Including Alzheimer's Disease. *Neuron*, 76(5), 871–885. <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-5915-6>
- Mairet-Coello, G., Courchet, J., Pieraut, S., Courchet, V., Maximov, A., & Polleux, F. (2013). The CAMKK2-AMPK Kinase Pathway Mediates the Synaptotoxic Effects of A β Oligomers through Tau Phosphorylation. *Neuron*, 78(1), 94–108. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.003>
- Maslah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L. a., McKeel, D. W., & Morris, J. C. (2001). Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*, 56(1), 127–129. <http://doi.org/10.1212/WNL.56.1.127>
- Modrego, P., & Lobo, A. (2019). A good marker does not mean a good target for clinical trials in Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis questioned. *Neurodegenerative Disease Management*, nmt–2019–0006. <http://doi.org/10.2217/nmt-2019-0006>
- Mondragón-Rodríguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N., & Boehm, J. (2012). Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(38), 32040–32053. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.401240>
- Montagna, E., Dorostkar, M. M., & Herms, J. (2017). The Role of APP in Structural Spine Plasticity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(May), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00136>
- Montanez, E., Ussar, S., Schifferer, M., Bösl, M., Zent, R., Moser, M., & Fässler, R. (2008). Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes and Development*, 22(10), 1325–1330. <http://doi.org/10.1101/gad.469408>
- Müller, U. C., Deller, T., & Korte, M. (2017). Not just amyloid: Physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(5), 281–298. <http://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>
- Müller, U. C., & Zheng, H. (2012). Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(2), 1–17. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006288>
- Muresan & Muresan. (2007). The amyloid-b precursor protein is phosphorylated via distinct pathways during differentiation, mitosis, stress, and degeneration. *Molecular Biology of the Cell*, 18, 3835–3844. <http://doi.org/10.1091/mbc.e06>

N

- Naj, A. C., Jun, G., Beecham, G. W., Wang, L., Narayan, B., Buross, J., ... Graff, N. R. (2011). Common variants in MS4A4/MS4A6E, CD2uAP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 43(5), 436–441. <http://doi.org/10.1038/ng.801>
- Nakamura, A., Kaneko, N., Villemagne, V. L., Kato, T., Doecke, J., Doré, V., ... Yanagisawa, K. (2018). High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature*, 554(7691), 249–254. <http://doi.org/10.1038/nature25456>

Nhan, C. and K. (2015). The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathologica*, 129(1), 1–19. <http://doi.org/10.1007/s00401-014-1347-2>.The

Nisbet, R. M., Polanco, J. C., Ittner, L. M., & Götz, J. (2015). Tau aggregation and its interplay with amyloid- β . *Acta Neuropathologica*, 129(2), 207–220. <http://doi.org/10.1007/s00401-014-1371-2>

O

Olson, M. I., & Shaw, C. (1969). Presenile Dementia and Alzheimer ' S Disease. *Brain*, 92, 147–156.

P

Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G., & Imbimbo, B. P. (2019). A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*, 15(2), 73–88. <http://doi.org/10.1038/s41582-018-0116-6>

Patrick, E., Rajagopal, S., Wong, H. K. A., McCabe, C., Xu, J., Tang, A., ... De Jager, P. L. (2017). Dissecting the role of non-coding RNAs in the accumulation of amyloid and tau neuropathologies in Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), 1–13. <http://doi.org/10.1186/s13024-017-0191-y>

Perez, R. G., Zheng, H., Van der Ploeg, L. H. T., & Koo, E. H. (1997). The β -Amyloid Precursor Protein of Alzheimer's Disease Enhances Neuron Viability and Modulates Neuronal Polarity. *The Journal of Neuroscience*, 17(24), 9407–9414. <http://doi.org/10.1523/jneurosci.17-24-09407.1997>

Peyrin, J. M., Deleglise, B., Saias, L., Vignes, M., Gougis, P., Magnifico, S., ... Brugg, B. (2011). Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab on a Chip*, 11(21), 3663–3673. <http://doi.org/10.1039/c1lc20014c>

Pfriege, F. W. (2003). Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(6), 1158–1171. <http://doi.org/10.1007/s00018-003-3018-7>

Pluskota, E., Ma, Y., Bledzka, K. M., Bialkowska, K., Soloviev, D. a., Szpak, D., ... Plow, E. F. (2013). Kindlin-2 regulates hemostasis by controlling endothelial cell-surface expression of ADP/AMP catabolic enzymes via a clathrin-dependent mechanism. *Blood*, 122(14), 2491–2499. <http://doi.org/10.1182/blood-2013-04-497669>

Prasher, V. P., Farrer, M. J., Kessling, A. M., Fisher, E. M. C., West, R. J., Barber, P. C., & Butler, a. C. (1998). Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Annals of Neurology*, 43(3), 380–383. <http://doi.org/10.1002/ana.410430316>

Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's and Dementia*, 9(1), 63–75.e2. <http://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>

Q

- Qu, H., Tu, Y., Guan, J. L., Xiao, G., & Wu, C. (2014). Kindlin-2 tyrosine phosphorylation and interaction with Src serve as a regulatable switch in the integrin outside-in signaling circuit. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 31001–31013. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.580811>
- Querfurth, H. W., & Laferla, F. M. (2010). Alzheimer's Disease, 329–344.

R

- Ramaker, J. M., & Copenhaver, P. F. (2017). Amyloid Precursor Protein family as unconventional G_o-coupled receptors and the control of neuronal motility. *Neurogenesis*, 4(1), e1288510. <http://doi.org/10.1080/23262133.2017.1288510>
- Ren, Y., Jin, H., Xue, Z., Xu, Q., Wang, S., Zhao, G., ... Huang, H. (2015). Kindlin-2 inhibited the growth and migration of colorectal cancer cells. *Tumor Biology*, 36(6), 4107–4114. <http://doi.org/10.1007/s13277-015-3044-8>
- Rogers, J., Li, R., Mastroeni, D., Grover, A., Leonard, B., Ahern, G., ... Sabbagh, M. (2006). Peripheral clearance of amyloid β peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes. *Neurobiology of Aging*, 27(12), 1733–1739. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.043>
- Rognoni, E., Ruppert, R., & Fässler, R. (2016). The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease. *Journal of Cell Science*, 129(1), 17–27. <http://doi.org/10.1242/jcs.161190>

S

- Sabo et al. (1995). Interaction of beta-amyloid peptides with integrins in a human nerve cell line, 184, 25–28.
- Sabo, S. L., Ikin, A. F., Buxbaum, J. D., & Greengard, P. (2003). The Amyloid Precursor Protein and Its Regulatory Protein, FE65, in Growth Cones and Synapses In Vitro and In Vivo. *The Journal of Neuroscience*, 23(13), 5407–5415. <http://doi.org/10.1523/jneurosci.23-13-05407.2003>
- Sannerud, R., Declerck, I., Peric, A., Raemaekers, T., Menendez, G., Zhou, L., ... Annaert, W. (2011). ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(34), E559–68. <http://doi.org/10.1073/pnas.1100745108>
- Schmidt, V., Sporbert, A., Rohe, M., Reimer, T., Rehm, A., Andersen, O. M., & Willnow, T. E. (2007). SorLA/LR11 regulates processing of amyloid precursor protein via interaction with adaptors GGA and PACS-1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(45), 32956–32964. <http://doi.org/10.1074/jbc.M705073200>

- Schratt, G. (2009). MicroRNAs at the synapse. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(12), 842–849. <http://doi.org/10.1038/nrn2763>
- Seabrook, G. R., Smith, D. W., Bowery, B. J., Easter, a., Reynolds, T., Fitzjohn, S. M., ... Hilla, R. G. (1999). Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology*, 38(3), 349–359. [http://doi.org/10.1016/S0028-3908\(98\)00204-4](http://doi.org/10.1016/S0028-3908(98)00204-4)
- Serpell, L. C. (2000). Alzheimer ' s amyloid fibrils : structure and assembly. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1502, 16–30.
- Seshadri, S. (2010). Genome-wide Analysis of genetic loci associated with Alzheimer's disease. *JAMA*, 303(18), 1832–1840. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>
- Sethupathy, P., & Collins, F. S. (2008). MicroRNA target site polymorphisms and human disease. *Trends in Genetics*, 24(10), 489–497. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2008.07.004>
- Sheng, B., Song, B., Zheng, Z., Zhou, F., Lu, G., Zhao, N., ... Gong, Y. (2009). Abnormal cleavage of APP impairs its functions in cell adhesion and migration. *Neuroscience Letters*, 450(3), 327–331. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.11.046>
- Shi et al. (2017). ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature*, 549(7673), 523–527. <http://doi.org/10.1002/cnrcr.31084.Talking>
- Shi, X., Ma, Y. Q., Tu, Y., Chen, K., Wu, S., Fukuda, K., ... Wu, C. (2007). The MIG-2/integrin interaction strengthens cell-matrix adhesion and modulates cell motility. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), 20455–20466. <http://doi.org/10.1074/jbc.M611680200>
- Shi, X., & Wu, C. (2008). A Suppressive Role of Mitogen Inducible Gene-2 in Mesenchymal Cancer Cell Invasion. *Molecular Cancer Research*, 6(5), 715–724. <http://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-07-2026>
- Shirotani, K., Tsubuki, S., Iwata, N., Takaki, Y., Harigaya, W., Maruyama, K., ... Saido, T. C. (2001). Neprilysin 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), 21895–21901. <http://doi.org/10.1074/jbc.M008511200>
- Shivers, B. D., Hilbich, C., Multhaup, G., Salbaum, M., Beyreuther, K., & Seeburg, P. H. (1988). Alzheimer's disease amyloidogenic. *The EMBO Journal*, 7(5), 1365–1370.
- Shulman, J. M., Imboywa, S., Giagtzoglou, N., Powers, M. P., Hu, Y., Devenport, D., ... Feany, M. B. (2014). Functional screening in Drosophila identifies Alzheimer's disease susceptibility genes and implicates Tau-mediated mechanisms. *Human Molecular Genetics*, 23(4), 870–7. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddt478>
- Siegel, D. H., Ashton, G. H. S., Penagos, H. G., Lee, J. V., Feiler, H. S., Wilhelmsen, K. C., ... Epstein, E. H. (2003). Loss of Kindlin-1, a Human Homolog of the Caenorhabditis elegans Actin–Extracellular-Matrix Linker Protein UNC-112, Causes Kindler Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, 73(1), 174–187. <http://doi.org/10.1086/376609>
- Sims, R. (2017). Rare coding variants in PLCG2, ABI3 and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in AD. *Nature Genetics*, 49(9), 1373–1384. <http://doi.org/10.1016/j.nbg.2017.04.008>
- Slunts, H. H., Thinakaran, G., & Sisodia, S. S. (1994). Y. L o a.
- Small, D. H., Clarris, H. L., Williamson, T. G., Reed, G., Key, B., Mok, S. S., ... Nurcombe, V. (1999). Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 1(4-5), 275–285. <http://doi.org/10.3233/JAD-1999-14-508>

- Soba, P., Eggert, S., Wagner, K., Zentgraf, H., Siehl, K., Kreger, S., ... Beyreuther, K. (2005). Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO Journal*, *24*(20), 3624–3634. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600824>
- Soldano, A., & Hassan, B. a. (2014). Beyond pathology : APP , brain development and Alzheimer ' s disease. *Current Opinion in Neurobiology*, *27*, 61–67. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2014.02.003>
- Sosa, L. J., Bergman, J., Estrada-Bernal, A., Glorioso, T. J., Kittelson, J. M., & Pfenninger, K. H. (2013). Amyloid Precursor Protein Is an Autonomous Growth Cone Adhesion Molecule Engaged in Contact Guidance. *PLoS ONE*, *8*(5), 1–16. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0064521>
- Sosa, L. J., Cáceres, A., Dupraz, S., Oksdath, M., Quiroga, S., & Lorenzo, A. (2017). The physiological role of the amyloid precursor protein as an adhesion molecule in the developing nervous system. *Journal of Neurochemistry*, *143*(1), 11–29. <http://doi.org/10.1111/jnc.14122>
- Sosa, L. J., Postma, N. L., Estrada-Bernal, A., Hanna, M., Guo, R., Busciglio, J., & Pfenninger, K. H. (2014). Dosage of amyloid precursor protein affects axonal contact guidance in Down syndrome. *FASEB Journal*, *28*(1), 195–205. <http://doi.org/10.1096/fj.13-232686>
- Sossey-Alaoui, K., & Plow, E. F. (2016). miR-138-Mediated Regulation of KINDLIN-2 Expression Modulates Sensitivity to Chemotherapeutics. *Molecular Cancer Research*, *14*(2), 228–238. <http://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-15-0299>
- Southam, K. a., Stennard, F., Pavez, C., & Small, D. H. (2019). Knockout of Amyloid β Protein Precursor (APP) Expression Alters Synaptogenesis, Neurite Branching and Axonal Morphology of Hippocampal Neurons. *Neurochemical Research*, *44*(6), 1346–1355. <http://doi.org/10.1007/s11064-018-2512-0>
- Spence, E. F., & Soderling, S. H. (2015). Actin out: Regulation of the synaptic cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(48), 28613–28622. <http://doi.org/10.1074/jbc.R115.655118>
- Spires-Jones & Hyman. (2014). *The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease* (Vol. 82). <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.004>.The
- Stahl, R., Schilling, S., Soba, P., Rupp, C., Hartmann, T., Wagner, K., ... Kins, S. (2014). Shedding of APP limits its synaptogenic activity and cell adhesion properties. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *8*(December), 1–11. <http://doi.org/10.3389/fncel.2014.00410>
- Storey, E., Beyreuther, K., & Masters, C. L. (1996). Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components. *Brain Research*, *735*(2), 217–231. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00608-7](http://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00608-7)
- Sullivan, S. E., Liao, M., Smith, R. V, White, C., Lagomarsino, V. N., Xu, J., ... Young-Pearse, T. L. (2019). Candidate-based screening via gene modulation in human neurons and astrocytes implicates *FERMT2* in A β and TAU proteostasis. *Human Molecular Genetics*, *28*(5), 718–735. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddy376>

T

- Tan, C. L., Andrews, M. R., Kwok, J. C. F., Heintz, T. G. P., Gumy, L. F., Fassler, R., & Fawcett, J. W. (2012). Kindlin-1 Enhances Axon Growth on Inhibitory Chondroitin Sulfate Proteoglycans and Promotes Sensory Axon Regeneration. *Journal of Neuroscience*, *32*(21), 7325–7335. <http://doi.org/10.1523/jneurosci.5472-11.2012>

- Tan, J. Z. a., & Gleeson, P. a. (2019). The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1861(4), 697–712. <http://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.013>
- Taylor, A. M., Dieterich, D. C., Ito, H. T., Kim, S. a., & Erin, M. (2010). Manipulation of Synapses. *NIH Public Access Author Manuscript*, 66(7491), 57–68. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.03.022>. Microfluidic
- Teunissen, C. E., Chiu, M. J., Yang, C. C., Yang, S. Y., Scheltens, P., Zetterberg, H., & Blennow, K. (2018). Plasma Amyloid- β (A β 42) Correlates with Cerebrospinal Fluid A β 42 in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 62(4), 1857–1863. <http://doi.org/10.3233/JAD-170784>
- Theodosiou, M., Widmaier, M., Böttcher, R. T., Rognoni, E., Veelders, M., Bharadwaj, M., ... Fässler, R. (2016). Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *eLife*, 5, 1–24. <http://doi.org/10.7554/elife.10130>
- Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *Journal of Biological Chemistry*, 283(44), 29615–29619. <http://doi.org/10.1074/jbc.R800019200>
- Tsien, J. Z., Chen, D. F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E. H., Anderson, D. J., ... Tonegawa, S. (1996). Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell*, 87(7), 1317–1326. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81826-7](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81826-7)
- Tu, Y., Wu, S., Chen, K., & Chuanyue, W. (2003). Migfilin and Mig-2 Link Focal Adhesions to Filamin and the Actin Cytoskeleton and Function in Cell Shape Modulation. *Cell*, 113, 37–47. [http://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00163-6](http://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00163-6)

U

- Ullah, M. F., Ahmad, A., Bhat, S. H., Abu-Duhier, F. M., Barreto, G. E., & Ashraf, G. M. (2019). Impact of sex differences and gender specificity on behavioral characteristics and pathophysiology of neurodegenerative disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 102, 95–105. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.04.003>
- Ussar, S., Wang, H. V., Linder, S., Fässler, R., & Moser, M. (2006). The Kindlins: Subcellular localization and expression during murine development. *Experimental Cell Research*, 312(16), 3142–3151. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.06.030>

V

- Vekrellis, K., Ye, Z., Qiu, W. Q., Walsh, D., Hartley, D., Chesneau, V., ... Selkoe, D. J. (2018). Neurons Regulate Extracellular Levels of Amyloid β -Protein via Proteolysis by Insulin-Degrading Enzyme. *The Journal of Neuroscience*, 20(5), 1657–1665. <http://doi.org/10.1523/jneurosci.20-05-01657.2000>
- Vingtdeux, V., Hamdane, M., Loyens, A., Gelé, P., Drobeck, H., Bégard, S., ... Sergeant, N. (2007). Alkalinizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *Journal of Biological Chemistry*, 282(25), 18197–18205. <http://doi.org/10.1074/jbc.M609475200>

- Walsh, D. M., Minogue, a. M., Sala Frigerio, C., Fadeeva, J. V., Wasco, W., & Selkoe, D. J. (2007). The APP family of proteins: similarities and differences. *Biochemical Society Transactions*, 35(2), 416–420. <http://doi.org/10.1042/BST0350416>
- Wang, Q., Klyubin, I., Wright, S., Griswold-Prenner, I., Rowan, M. J., & Anwyl, R. (2008). Av Integrins Mediate Beta-Amyloid Induced Inhibition of Long-Term Potentiation. *Neurobiology of Aging*, 29(10), 1485–1493. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.018>
- Wang, Z., Wang, B., Yang, L., Guo, Q., Aithmitti, N., Songyang, Z., & Zheng, H. (2009). Presynaptic and Postsynaptic Interaction of the Amyloid Precursor Protein Promotes Peripheral and Central Synaptogenesis. *Journal of Neuroscience*, 29(35), 10788–10801. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2132-09.2009>
- Webb, D. J., Zhang, H., Majumdar, D., & Horwitz, A. F. (2007). A5 Integrin Signaling Regulates the Formation of Spines and Synapses in Hippocampal Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 282(10), 6929–6935. <http://doi.org/10.1074/jbc.M610981200>
- Wei, W. (2002). Abeta 17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain*, 125(9), 2036–2043. <http://doi.org/10.1093/brain/awf205>
- Weller, J., & Budson, A. (2018). Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research*, 7(0), 1161. <http://doi.org/10.12688/f1000research.14506.1>
- Weuve J, McQueen MB, B. D. (2019). The AlzRisk Database. *Alzheimer Research Forum*, Available at: <http://www.alzforum.org>.
- Wick, M., Burger, C., Brusselbach, S., Lucibello, F. C., & Muller, R. (1994). Identification of serum-inducible genes: different patterns of gene regulation during G0→S and G1→S progression. *Journal of Cell Science*, 107, 227–239.
- Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M. A., Ovsepian, S. V., Chafai, M., Kootar, S., ... Haass, C. (2015). n-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*, 526(7573), 443–447. <http://doi.org/10.1038/nature14864>
- Williams & Waterson. (1994). Genes Critical for Muscle Development and Function in *Caenorhabditis elegans* Identified through Lethal Mutations. *The Journal of Cell Biology*, 124(4), 475–490.
- Willnow, T. E., & Andersen, O. M. (2013). Sorting receptor SORLA - a trafficking path to avoid Alzheimer disease. *Journal of Cell Science*, 126(13), 2751–2760. <http://doi.org/10.1242/jcs.125393>
- Winblad, B., Amouyel, P., Andrieu, S., Ballard, C., Brayne, C., Brodaty, H., ... Zetterberg, H. (2016). Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *The Lancet Neurology*, 15(5), 455–532. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00062-4](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00062-4)
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11(3), 228–34. <http://doi.org/10.1038/ncb0309-228>
- Woodruff, G., Reyna, S. M., Dunlap, M., Van Der Kant, R., Callender, J. a., Young, J. E., ... Goldstein, L. S. B. (2016). Defective Transcytosis of APP and Lipoproteins in Human iPSC-Derived Neurons with Familial Alzheimer's Disease Mutations. *Cell Reports*, 17(3), 759–773. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.034>

Wright, S., Malinin, N. L., Powell, K. a., Yednock, T., Rydel, R. E., & Griswold-Prenner, I. (2007). $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha V\beta 1$ integrin signaling pathways mediate amyloid- β -induced neurotoxicity. *Neurobiology of Aging*, 28(2), 226–237. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.12.002>

Wujak, L., Böttcher, R. T., Pak, O., Frey, H., El Agha, E., Chen, Y., ... Wygrecka, M. (2018). Low density lipoprotein receptor-related protein 1 couples $\beta 1$ integrin activation to degradation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(9), 1671–1685. <http://doi.org/10.1007/s00018-017-2707-6>

Y

Yamazaki T, Selkoe DJ, K. E. (1995). Trafficking of Cell Surface / 3-Amyloid Precursor Protein : Retrograde and Transcytotic Transport in Cultured Neurons Internalization Study in Rat Hippocampal Neurons, 129(2), 431–442.

Young-Pearse, T. L., Chen, A. C., Chang, R., Marquez, C., & Selkoe, D. J. (2008). Secreted APP regulates the function of full-length APP in neurite outgrowth through interaction with integrin beta1. *Neural Development*, 3(1). <http://doi.org/10.1186/1749-8104-3-15>

Z

Zempel, H., Luedtke, J., Kumar, Y., Biernat, J., Dawson, H., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. M. (2013). Amyloid- β oligomers induce synaptic damage via Tau-dependent microtubule severing by TTL6 and spastin. *EMBO Journal*, 32(22), 2920–2937. <http://doi.org/10.1038/emboj.2013.207>

Zhang, Y., Sloan, S. a, Clarke, L. E., Caneda, C., Plaza, C. a, Blumenthal, P. D., ... Barres, B. a. (2017). Purification and characterisation of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse, 89(1), 37–53. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.11.013>. Purification

Zhang, Z., Song, M., Liu, X., Su Kang, S., Duong, D. M., Seyfried, N. T., ... Ye, K. (2015). Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nature Communications*, 6, 1–16. <http://doi.org/10.1038/ncomms9762>

Zheng, H., & Koo, E. H. (2011). Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Molecular Neurodegeneration*, 6(1), 27. <http://doi.org/10.1186/1750-1326-6-27>

Ziv & Smith. (1996). Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*, 17, 91–102. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80283-4](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80283-4)

Zou, C., Crux, S., Marinesco, S., Montagna, E., Sgobio, C., Shi, Y., ... Herms, J. (2016). Amyloid precursor protein maintains constitutive and adaptive plasticity of dendritic spines in adult brain by regulating D-serine homeostasis. *The EMBO Journal*, 35(20), 2213–2222. <http://doi.org/10.15252/emboj.201694085>

Annexe 1

Acta Neuropathol. 2017 Jun;133(6):955-966. doi: 10.1007/s00401-016-1652-z. Epub 2016 Dec 8.

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

Chapuis J, Flaig A, Grenier-Boley B, **Eysert F**, Pottiez V, Deloison G, Vandeputte A, Ayrat AM, Mendes T, Desai S, Goate AM, Kauwe JSK, Leroux F, Herledan A, Demiautte F, Bauer C, Checler F, Petersen RC, Blennow K, Zetterberg H, Minthon L, Van Deerlin VM, Lee VM, Shaw LM, Trojanowski JQ, Albert M, Moghekar A, O'Brien R, Peskind ER, Malmanche N, Schellenberg GD, Dourlen P, Song OR, Cruchaga C, Amouyel P, Deprez B, Brodin P, Lambert JC; ADGC, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative

Annexe 2

Soumis à Molecular Psychiatry

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

Eysert F, Coulon A, Boscher E, Vreulx AC, Flaig A, Mendes T, Hughes S, Grenier-Boley B, Hanouille X, Demiautte F, Bauer C, Marttinen M, Takalo M, Amouyel P, Desai S, Pike I, Hiltunen M, Checler F, Farinelli M, Delay C, Malmanche N, Hébert S, Dumont J, Kilinc D, Lambert JC, Chapuis J.