



Université
de Lille



Inserm
La science pour la santé
From science to health



UNIVERSITE DE LILLE - ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE ET SANTE

THESE D'UNIVERSITE

Audrey COULON

**IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE
DETERMINANTS GENETIQUES DE LA PERTE
SYNAPTIQUE ASSOCIEE A LA MALADIE D'ALZHEIMER**

Thèse soutenue publiquement le 18 décembre 2023

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Lille

Laboratoire d'accueil : INSERM UMR1167 : Facteurs de risques et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement - Équipe 3 : Déterminants moléculaires de la maladie d'Alzheimer et syndromes apparentés

Dr Magalie LECOURTOIS - Université de Rouen
Dr Rebecca PISKOROWSKI - Université Paris Descartes
Dr Santiago RIVERA - Université d'Aix-Marseille
Dr Julien CHAPUIS - Université de Lille
Dr Julie DUMONT - Université de Lille
Dr Jean-Charles LAMBERT - Université de Lille

Rapportrice
Rapportrice
Examineur
Co-directeur
Co-directrice
Président du jury

En essayant continuellement on finit par réussir.

Donc : plus ça rate, plus on a de chance que ça marche.

Les Shadoks.

REMERCIEMENTS

Je tenais tout d'abord à remercier les membres du jury.

Merci aux Docteurs Magalie Lecourtois, Rebecca Piskorowski, et Santiago Rivera pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse, et pour me faire l'honneur de participer à cette soutenance.

Merci au Docteur Jean-Charles Lambert, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, et pour avoir accepté de me confier ce beau projet de recherche. Merci pour votre confiance et votre optimisme, qui m'ont permis de mener à bien ces travaux.

Merci au Docteur Julien Chapuis, pour m'avoir si bien encadrée depuis mon Master 2. Merci pour ton expertise, pour tous tes conseils, et pour tout le temps que tu m'as consacré. Merci de m'avoir accompagnée et soutenue toutes ces années, et de m'avoir conduit là où je suis.

Merci au Docteur Julie Dumont, pour guider mes pas depuis maintenant dix ans. Merci d'avoir cru en moi quand je n'étais encore qu'une petite étudiante en pharmacie. Merci pour tout le temps et l'énergie que tu m'as accordée. Merci de m'avoir fait découvrir ce monde de la recherche et de m'avoir accompagnée toutes ces années. Tu as été ma plus belle rencontre professionnelle, et je ne serais pas ici sans toi aujourd'hui.

Je tiens ensuite à remercier toute l'équipe U1167.

Merci Devrim, pour ton soutien tout au long de cette thèse. Merci de m'avoir aidée dans l'analyse de ce criblage, et dans la relecture de mes articles.

Merci Marcos, pour m'avoir aidée dans l'analyse des MEA, et dans la culture des iPSCs.

Merci Tiago, pour m'avoir formée aux techniques de criblages, et pour tous les bons moments partagés. Merci de m'avoir acceptée comme padawan !

Merci Orthis, pour m'avoir aidée à dompter les iPSCs, et pour tous les bons souvenirs, au laboratoire comme à l'extérieur. Merci de m'avoir fait sourire chaque jour, et d'avoir rendu cette thèse si agréable.

Merci Dolo, pour m'avoir aidée dans mon combat contre Imaris, et pour ce western-blot PLCG2 qui n'existe que grâce à ton talent ! Mais surtout, merci pour toutes ces soirées passées à danser, chanter, et rire, et merci d'être mon amie.

Merci Ana et Morgane, pour avoir affronté le RNA-seq à mes côtés. Grâce à vous, ces moments de détresse restent de bons souvenirs !

Merci Chloé, la meilleure fournisseuse de culture de cortex. Merci pour tous les bons moments partagés, et bon courage pour cette fin de thèse !

Merci aux piou-pious, la relève de ce laboratoire : Florian, Nina, Pauline et Valentin.

Merci Florian, pour avoir accepté de relever le défi PLCG2, et pour tout le travail que tu as abattu. Cette thèse n'aurait pas pu être finalisée sans ton aide !

Merci Nina, de m'avoir promue au grade de nounou. Merci pour ton aide dans mon travail, et surtout merci d'apporter autant de joie et d'amour dans le laboratoire. Merci d'être aussi maladroite et tête en l'air que moi, notre famille de labo ne s'est pas choisie pour rien.

Merci Pauline, pour m'avoir appris à faire de jolis dessins, et m'avoir aidée avec mes références, et surtout pour tous ces bons moments à discuter autour d'un café.

Merci à mes autres super co-locataires de bureau. Merci Florie, pour toutes ces journées passées à râler et à rire, merci d'être mon amie. Merci Erwan, pour avoir été un fantastique binôme dans cette traversée du master 2 et de la thèse. Merci Valentin, pour toutes nos discussions. Merci à tous, d'avoir mis de la joie dans notre bureau.

Merci Carla, pour n'avoir jamais désespéré de m'apprendre la MEA en microfluidique.

Merci Benjamin, pour m'avoir fournie la liste de gènes sur laquelle s'est basé tout mon travail.

Merci Anne-Marie, pour ton aide à l'animalerie

Merci Xavier, pour la re-lecture de cette thèse.

Merci à tous les autres membres de l'équipe, Pierre, Alejandra, Céline, Julie, Sagnik, Karine, Léo, Vinicius, Célia, Valérie, et Tommy. Merci de rendre ce laboratoire si accueillant !

Je tenais également à remercier mes proches.

Merci à mes amies de la Faculté de Pharmacie, Marjolène, Cloé, et Perrine, grâce à qui ces études ont été remplies de moments de bonheur.

Merci Max, pour m'avoir accompagnée tout au long de ces années de thèse. Merci de m'avoir écouté parler pendant de trop nombreuses heures de mes travaux. Merci de m'avoir soutenue dans tous mes doutes, et d'avoir partagé toutes mes joies.

Merci à mon frère, Arnaud, pour avoir été là chaque jour, et pour m'aider à prendre confiance en moi.

Enfin, je tiens surtout à remercier mes parents, qui m'ont toujours soutenu tout au long de ces dix années d'études. Merci de m'avoir offert cette chance de pouvoir faire un doctorat, et de m'avoir toujours encouragé à persévérer malgré les difficultés. Merci pour tous ces mots qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. *It ain't over 'til it's over.*

RESUME

La maladie d'Alzheimer (MA) représente la principale cause de démence, et la perte des synapses est perçue comme l'un des éléments centraux dans la physiopathologie de cette maladie. Bien que le premier facteur de risque soit l'âge, la MA présente également une importante composante génétique, et les études d'association pangénomiques (GWAS) ont permis de mettre en évidence 76 *loci* regroupant plusieurs centaines de gènes associés au risque de développer la maladie. Des analyses fonctionnelles post-GWAS sont désormais nécessaires pour préciser la fonction de ces gènes et identifier les mécanismes moléculaires expliquant leurs rôles dans la pathologie.

Dans ce contexte, mes travaux ont consisté à mettre en place différentes approches *in vitro* permettant l'identification et la caractérisation des gènes et des variants impliqués dans la perte synaptique associée à la MA.

En développant une nouvelle approche de criblage à haut-contenu, j'ai tout d'abord évalué l'effet de la sous-expression de chacun des facteurs de risque génétiques de la MA sur les synapses de neurones hippocampiques primaires. J'ai ainsi identifié plusieurs gènes impliqués dans la perte synaptique. De manière surprenante, l'un des gènes dont la sous-expression affectait le plus fortement la densité de synapses était le gène *PLCG2*, dont la fonction neuronale était jusqu'ici inconnue. Dans un second temps, j'ai donc cherché à caractériser de manière plus précise l'impact de l'inhibition de *PLCG2* en mesurant l'activité électrique neuronale et les phénotypes classiquement associés à la MA, dans un modèle de neurones humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites. Enfin, je me suis intéressée à un autre facteur de risque génétique impliqué dans la fonction synaptique, le gène *FERMT2*. Afin d'étudier le rôle fonctionnel du variant rs7143400 localisé dans la région 3' non traduite de ce gène, j'ai généré une lignée cellulaire porteuse du variant d'intérêt par CRISPR/Cas9, et évalué son impact sur la régulation de l'expression du gène, et sur le métabolisme du précurseur des peptides amyloïdes.

Dans l'ensemble, ces travaux permettent de mieux comprendre comment certains déterminants génétiques influencent le développement de la MA, aidant ainsi à l'identification des mécanismes moléculaires précocement impliqués dans la survenue de cette pathologie.

Mots-clés : Facteur de risque génétique, post-GWAS, criblage à haut-contenu

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the prime cause of dementia, and synaptic loss is central to its pathophysiology. Although the most important risk factor is age, AD also has a significant genetic component, and genome-wide association studies (GWAS) have identified 76 *loci* encompassing hundreds of genes associated with the risk of developing the disease. Post-GWAS functional analyses are now needed to clarify the function of these genes and to identify underlying molecular mechanisms.

In this context, I have developed different *in vitro* approaches to identify and characterize genes and variants involved in the AD-associated synaptic loss.

First, I have developed a high content screening to assess the impact of each GWAS-identified AD genetic risk factor on synapse number in rat primary hippocampal neurons. I have identified several genes whose under-expression led to a significant modulation of synaptic density. Surprisingly, one of the best hits was *PLCG2*, whose neuronal function was unknown so far. Second, I have characterized the impact of *PLCG2* gene silencing on neuronal electrical activity and AD-associated phenotypes in a model of induced pluripotent stem cells-derived neurons. Last, my work has focused on another AD genetic risk factor involved in synaptic function, the *FERMT2* gene. In order to assess the functional role of the rs7143400 variant, located within *FERMT2* gene 3'UTR, I have generated a cell line carrying this variant through CRISPR-Cas9 editing. This model has been used to evaluate the impact of the *FERMT2* rs7143400 variant on gene expression and amyloid peptide precursor metabolism.

Overall, this work helped to better understand how the *PLCG2* and *FERMT2* genetic risk factors influence the development of AD, giving further insights into the mechanisms involved the disease onset.

Key word: Genetic risk factor, post-GWAS, High-content screening

ABREVIATIONS

ADES	<i>Alzheimer Disease European Sequencing</i>
ADSP	<i>Alzheimer's Disease Sequencing Project</i>
AMPAR	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
APOE	Apolipoprotéine E
APP	<i>Amyloid-beta precursor protein</i> ou Précurseur du peptide amyloïde
ARNi	Interférence ARN
ARNm	ARN messenger
ASO	<i>Antisens oligonucléotide</i> ou Oligonucléotide anti-sens
A β	Peptide amyloïde β
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmoduline
CaMK	Calmoduline Kinase
CASS4	<i>Cas scaffolding protein family member 4</i>
CD2AP	<i>CD2-associated protein</i>
CDK5	<i>Cyclin-dependent kinase 5</i>
ChIP	<i>Chromatin immunoprecipitation</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CTF	<i>C-terminal fragment</i> ou fragment C-terminal
DAG	Diacylglycerol
DGKQ	<i>Diacylglycerol kinase theta</i>
DL	Déséquilibre de liaison
DNF	Dégénérescence neurofibrillaires
EADB	<i>European Alzheimer DNA Biobank</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDG	Fluorodésoxyglycose

FERMT2	<i>Fermitin family homolog 2</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GSK3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3 β</i>
GWAS	<i>Genome-wide association study</i> ou étude d'association pangénomique
HCS	<i>High-Content Screening</i> ou criblage à haut-contenu
HDR	<i>Homology directed repair</i> ou recombinaison homologue
HTS	<i>High-Throughput Screening</i> ou criblage haut-débit
IP3	myo-inositol 1,4,5-trisphosphate
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cells</i> ou cellules souches pluripotentes induites
IWG	<i>International Working Group</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LTD	<i>Long term depression</i> ou dépression à long terme
LTP	<i>Long term potentialisation</i> ou potentialisation à long terme
Lys	<i>Lysine</i>
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	<i>Microtubule-associated protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEA	<i>Micro-electrode Array</i> ou Matrice de micro-électrodes
Mg ²⁺	Magnésium
miR	micro-ARN
MMSE	<i>Mini-mental state examination</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MPRA	<i>Massively parallel reporter assays</i>
MTBR	<i>Microtubule-binding of Tau region</i>
NIA-AA	<i>National Institute on Aging-Alzheimer's Association</i>
NMDAR	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>
PA	<i>Phosphatidic acid</i>
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PHF	<i>Paired helical filaments</i> ou filaments hélicoïdaux appariés

PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	1-phosphatidyl-1D-myo-inositol 4,5-bisphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLCG2	Phospholipase C gamma 2
PSD95	<i>Post synaptic density 95</i>
PSEN	Présénillines
PTK2B	Protéine Tyrosine Kinase 2 Béta
QTL	<i>Quantitative trait loci</i>
sAPP	Fragment soluble de l'APP
Seq	Séquençage
Ser	Sérine
shARN	<i>small hairpin</i> ARN
siARN	<i>small interfering</i> ARN
SNC	Système nerveux central
TEP	Tomographie à Emission de Positons
Thr	Thréonine
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TWAS	<i>Transcription-wide association study</i>
WES	<i>Whole exome sequencing</i> ou séquençage de l'exome entier
WGS	<i>Whole genome sequencing</i> ou séquençage du génome entier

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
RESUME	3
ABSTRACT	4
ABREVIATIONS.....	5
AVANT-PROPOS.....	17
SOMMAIRE	9
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	15
INTRODUCTION	17
PARTIE 1 : EPIDEMIOLOGIE ET PRESENTATION CLINIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER	19
I) Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer	19
II) Facteurs de risques environnementaux de la MA.....	21
a. Facteurs de risques non-modifiables de la MA	21
i. Age.....	21
ii. Antécédents familiaux.....	21
iii. Sexe.....	22
b. Facteurs de risques modifiables de la MA.....	22
i. Maladies cardiovasculaires.....	22
ii. Maladies métaboliques	23
iii. Facteurs de risques psychologiques	23
c. Facteurs protecteurs de la MA.....	23
i. Exercice physique	23
ii. Réserve cognitive.....	23
III) Symptomatologie de la MA.....	24
a. Symptômes mnésiques.....	24
b. Symptômes non-mnésiques.....	25
c. Symptômes neuropsychiatriques.....	25
IV) Histoire naturelle de la MA	25
a. Phase pré-clinique ou asymptomatique à risque de MA	25
b. Phase de déficience cognitive légère	25
c. Phase de démence	26
PARTIE 2 : DIAGNOSTIC DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	27
I) Les tests d'orientation clinique	27
II) Développement des techniques d'imageries et des biomarqueurs spécifiques à la MA	27
a. Le développement des techniques d'imageries et des biomarqueurs remet en cause la définition de la MA.....	27

b.	Les différentes techniques d'imagerie	28
i.	IRM et TEP-FDG	28
ii.	TEP SCAN	28
c.	Les biomarqueurs du LCR	30
d.	Les biomarqueurs plasmatiques.....	31
PARTIE 3 : LA PATHOLOGIE AMYLOÏDE		33
I)	Le métabolisme de l'APP	33
a.	Voie non-amyloïdogène	33
b.	Voie amyloïdogène.....	34
II)	Rôles physiologiques de l'APP et de ses métabolites.....	34
III)	Les mutations des gènes <i>APP</i> et <i>PSEN</i> sont responsables de forme précoces de MA.....	35
a.	Les mutations du gène <i>APP</i>	35
b.	Les mutations des gènes <i>PSEN1</i> et <i>PSEN2</i>	36
IV)	Implication du métabolisme de l'APP dans les formes communes de MA.....	36
a.	Le facteur de risque génétique APOE4.....	37
b.	Les autres facteurs de risques génétiques modulant le métabolisme de l'APP	37
V)	Mécanismes de toxicité des peptides amyloïdes issus du métabolisme de l'APP	37
a.	Accumulation de formes neurotoxiques des peptides A β	37
i.	Clairance des peptides A β	37
ii.	Accumulation et agrégation des peptides A β	38
b.	Régulation de la pathologie amyloïde par les cellules microgliales et astrocytaires	39
VI)	Les thérapeutiques anti-amyloïdes	39
a.	Inhibiteurs de la γ -sécrétase et de la β -sécrétase	40
b.	Anticorps monoclonaux anti-A β	40
PARTIE 4 : LA PATHOLOGIE TAU		42
I)	Epissage alternatif et mutations du gène <i>MAPT</i>	42
II)	Rôles physiologiques de Tau	43
III)	Modifications post-traductionnelles de Tau et implication dans la MA	44
a.	Phosphorylation de Tau.....	44
b.	Modifications post-traductionnelle des résidus lysines de Tau : acétylation et ubiquitination	45
c.	Glycosylation de Tau	45
d.	Clivage protéolytique de Tau.....	46
IV)	Mécanismes de pathogénicité de Tau.....	47
a.	Agrégation de Tau	47
b.	Propagation de Tau	47

c.	Toxicité de Tau.....	48
V)	Les thérapeutiques anti-Tau.....	49
a.	Inhibition de l'expression de Tau par oligonucléotides antisens (ASO)	49
b.	Inhibition de l'hyperphosphorylation de Tau par des molécules inhibitrices des kinases	49
c.	Inhibition de l'agrégation de Tau	50
d.	Anticorps monoclonaux anti-Tau : immunothérapie passive et active.....	50
VI)	Interaction entre pathologie amyloïde et pathologie Tau	51
PARTIE 5 : LA PERTE SYNAPTIQUE ASSOCIEE A LA MALADIE D'ALZHEIMER		53
I)	Physiologie synaptique.....	53
a.	Induction de la LTP	53
b.	Maintien de la LTP	53
c.	LTD.....	54
d.	Corrélation entre LTP fonctionnelle et LTP structurelle.....	55
II)	Perte synaptique associée à la MA.....	55
a.	La perte synaptique est corrélée avec le déclin cognitif	55
b.	La perte synaptique est un événement précoce de la MA.....	55
c.	Altération de l'expression des protéines synaptiques dans la MA	56
d.	Altération morphologique des synapses dans la MA.....	56
III)	Synaptotoxicité de la pathologie amyloïde	56
a.	Liens entre pathologie amyloïde et dysfonction synaptique	56
b.	Mécanismes moléculaires de la synaptotoxicité du peptides A β	57
IV)	Synaptotoxicité de la pathologie Tau	58
a.	Liens entre pathologie Tau et dysfonction synaptique	58
b.	Mécanismes moléculaires de la synaptotoxicité de Tau.....	59
PARTIE 6 : ETUDE DES DETERMINANTS GENETIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER		61
I)	Arguments en faveur d'un rôle important des facteurs génétiques dans l'étiologie de la MA	61
II)	Etudes d'association par approche gène-candidat	61
III)	Apports des études d'association pangénomique dans l'identification des déterminants génétiques de la MA.....	62
a.	Définition et intérêt des études GWAS	62
b.	Identification des facteurs de risques génétiques de la MA par les études GWAS	62
c.	Limites des études GWAS.....	63
d.	Identification des facteurs de risques génétiques de la MA par des approches de séquençage de génomes et d'exomes.	64
e.	Des études d'association pangénomique à l'analyse des réseaux de gènes	64

i.	Les facteurs de risques génétiques impliqués dans la pathologie amyloïde et leurs liens avec la synapse	65
ii.	Les facteurs de risques génétiques impliqués dans la pathologie Tau et leurs liens avec la synapse	66
iii.	Les facteurs de risques génétiques impliqués dans le système immunitaire et leurs liens avec la synapse.....	67
iv.	Les facteurs de risques génétiques impliqués dans le métabolisme des lipides et leurs liens avec la synapse.....	69
v.	Les facteurs de risques génétiques impliqués dans l'endocytose et leurs liens avec la synapse	70
PARTIE 7 : LE CRIBLAGE A HAUT CONTENU (HCS) POUR LES ETUDES POST-GWAS.....		72
I)	L'intérêt du criblage dans les études post-GWAS	72
II)	Les modèles de criblages invertébrés	72
a.	<i>Caenorhabditis Elegans</i>	72
b.	<i>Drosophila Melanogaster</i>	73
III)	Les modèles de criblage cellulaire.....	73
a.	Le modèle cellulaire.....	74
b.	La banque d'ARNs interférents	74
c.	L'imagerie cellulaire.....	75
d.	L'analyse d'images.....	75
e.	Les limites des criblages à haut-contenu par interférence ARN	76
IV)	L'HCS pour l'étude des phénotypes de la MA	77
a.	L'HCS pour l'étude de la pathologie amyloïde	77
b.	L'HCS pour l'étude de la pathologie Tau	78
c.	L'HCS pour l'étude des synapses	78
i.	Etude des neurites.....	79
ii.	Etude de la densité synaptique	79
PARTIE 8 : RECHERCHE DES VARIANTS FONCTIONNELS DANS LES <i>LOCi</i> ASSOCIES AU RISQUE DE MALADIE D'ALZHEIMER.....		81
I)	Analyse des variants codants	81
II)	Analyse des variants non-codants.....	82
a.	Priorisation des variants par analyses statistiques	83
b.	Priorisation des variants localisés dans des régions annotées comme fonctionnelles.....	84
c.	Priorisation des variants par analyses de co-localisation des traits moléculaires quantitatifs (QTL).....	85
i.	eQTL.....	85
ii.	pQTL et mQTL	86
iii.	Une régulation tissu-spécifique	86

iv. Les études TWAS	87
d. Comment le variant génétique influence-t-il l'expression génique ?	88
III) Validation expérimentale de la fonctionnalité des variants	90
a. Etudes de l'interaction gène-facteur de transcription, et gène-gène.....	90
b. Analyses de gènes rapporteurs luciférase.....	90
c. Etude de l'impact de la régulation du gène par le variant sur les phénotypes associés à la MA 91	
i. La technologie CRISPR-Cas9	91
ii. L'édition par CRISPR/Cas9 de cellules iPSCs pour l'étude des variants génétiques associés à la MA	93
iii. Les avantages de l'utilisation de modèles cellulaires iPSCs pour modéliser la MA.....	94
OBJECTIFS DE LA THESE.....	97
RESULTATS.....	99
Article 1 : HIGH-CONTENT SCREENING OF SYNAPTIC DENSITY MODULATORS IN PRIMARY NEURONAL CULTURES.....	99
I) Contexte bibliographique et objectifs.....	99
II) Résultats	99
III) Commentaires	100
Article 2 : REVEALING THE IMPACT OF THE ALZHEIMER GENETIC RISK FACTOR <i>PLCG2</i> ON SYNAPTIC FUNCTIONS AND ALZHEIMER-RELATED PATHOPHYSIOLOGICAL HALLMARKS	125
I) Contexte bibliographique et objectifs.....	125
II) Résultats	125
III) Commentaires	128
IV) Expériences complémentaires	128
Article 3 : ALZHEIMER'S GENETIC RISK FACTOR <i>FERMT2</i> (KINDLIN-2) CONTROLS AXONAL GROWTH AND SYNAPTIC PLASTICITY IN AN APP-DEPENDENT MANNER.....	151
I) Contexte bibliographique et objectifs.....	151
II) Résultats	152
III) Commentaires	152
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	191
Analyser l'impact des gènes identifiés par les études GWAS sur les synapses par une approche HCS	191
Convergences des mécanismes impliquant <i>PLCG2</i> et <i>FERMT2</i> dans la modulation des fonctions synaptiques	195
Définir les mécanismes moléculaires reliant les effets des variants des gènes <i>PLCG2</i> et <i>FERMT2</i> au niveau de la synapse et sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer	196
Effets spécifiques vs pléiotropes des variants des gènes <i>FERMT2</i> et <i>PLCG2</i> ?	197
Impact de l'exposition aux peptides amyloïdes sur les effets de <i>FERMT2</i> et <i>PLCG2</i>	197

Identifier les voies biologiques dépendantes de <i>PLCG2</i> et <i>FERMT2</i>	198
Développer un nouveau modèle HCS pour le criblage pharmacologique	199
BIBLIOGRAPHIE.....	201

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Nombre estimé de personnes atteintes de maladie d'Alzheimer en France en 2018, 2025, et 2050.....	19
Figure 2 : Prévalence de la maladie d'Alzheimer en Europe en fonction de l'âge et du sexe.....	22
Figure 3 : Facteurs de risques modifiables de la maladie d'Alzheimer.	24
Figure 4 : Imageries cérébrales comparative entre un patient sain et un patient atteint de maladie d'Alzheimer.	29
Figure 5 : Evolution de l'imagerie et des biomarqueurs dans la progression de la maladie d'Alzheimer	31
Figure 6 : La pathologie amyloïde.	33
Figure 7 : Métabolisme endoprotéolytique de l'APP.....	34
Figure 8 : Représentation schématique de l'agrégation des peptides amyloïde.....	38
Figure 9 : La pathologie Tau.	42
Figure 10 : Epissage alternatif du gène MAPT et différentes isoformes de Tau.....	43
Figure 11 : Principaux épitopes de phosphorylation de Tau spécifiques de la MA.	45
Figure 12 : Illustration des principales modifications post-traductionnelles de la protéine Tau.....	46
Figure 13 : A. Induction et maintien de la LTP.....	54
Figure 14 : Synaptotoxicité des oligomères A β	58
Figure 15 : Synaptotoxicité de Tau.	60
Figure 16. Les <i>loci</i> génétiques associés au risque de MA.....	63
Figure 17 : Plusieurs déterminants génétiques de la maladie d'Alzheimer jouent un rôle à la synapse.	71
Figure 18 : Les différentes étapes du criblage HCS par interférence ARN.....	76
Figure 19 : Imagerie HCS pour l'étude de la connectivité neuronale.....	80
Figure 20 : L'étude des variants non-codants.	88
Figure 21 : Edition du génome par CRISPR/Cas9.....	92
Figure 22 : Localisation des variants P522R, Q816X, et R953X de PLCG2.....	126
Figure 23 : Etude de la sous-expression de Plcg2 dans le gyrus denté de souris sur la morphologie des dendrites.	127
Figure 24. Modèle de culture mixtes de neurones et d'astrocytes humains dérivés d'iPSCs exprimant un shARN dirigé contre PLCG2 (shPLCG2) ou un shARN contrôle (shNT, Non-Targeting).....	127
Figure 25 : Mécanismes moléculaires reliant le variant rs7143400 du gène FERMT2 au risque de développer la maladie d'Alzheimer.....	152
Figure 26 : Les voies biologiques impactées par PLCG2 et FERMT2 convergent vers GSK3 β et regroupent plusieurs autres facteurs de risques génétiques de la maladie d'Alzheimer.....	196

AVANT-PROPOS

En 1907, Aloïs Alzheimer décrivait pour la première fois la maladie qui portera son nom chez l'une de ses jeunes patientes atteintes de démence. Il faudra cependant attendre 1984-85 pour que soient identifiés pour la première fois les composants biologiques majeurs des deux lésions caractéristiques de la maladie : l'accumulation de peptides β -amyloïdes (A β) provoquant la formation de plaques séniles, et l'accumulation de protéines Tau hyperphosphorylées caractérisant les dégénérescences neurofibrillaires. Dans les années 1990, plusieurs études montrent qu'une perte de synapses est également observée dans le tissu cérébral des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, et de façon corrélée au déclin cognitif observé chez ces personnes. Ces recherches ont permis une meilleure description ainsi qu'une meilleure compréhension de la maladie mais les mécanismes biologiques à l'origine de la pathologie restent pour autant peu connus, ce qui rend difficile le développement de traitements efficaces.

La maladie d'Alzheimer est une maladie multifactorielle, qui résulte de l'interaction entre facteurs de risques environnementaux et facteurs de risques génétiques, ces derniers contribuant pour 60 à 80% au risque de développer la pathologie selon les études de jumeaux. Après la découverte du gène *APOE* comme facteur de risque génétique majeur de la maladie en 1993, les études d'association pangénomiques développées au cours des 15 dernières années ont conduit à l'identification de 75 régions chromosomiques regroupant plusieurs centaines de gènes dont la variabilité module le risque de développer la maladie d'Alzheimer. Le défi actuel consiste désormais à comprendre comment ces déterminants génétiques influencent le développement de la pathologie afin de permettre l'identification de mécanismes pathogéniques originaux susceptibles de constituer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans cette ère post-GWAS, et se basent sur l'hypothèse selon laquelle la diminution de densité synaptique observée au cours du développement de la maladie d'Alzheimer pourrait dépendre, au moins en partie, de facteurs génétiques. Dans un exposé bibliographique, ce manuscrit présentera tout d'abord les aspects épidémiologiques, cliniques, et diagnostiques de la maladie d'Alzheimer. Puis, seront abordés de façon synthétique les altérations moléculaires observées dans le cadre de la pathologie amyloïde, la pathologie Tau, et la perte synaptique. Nous décrirons également la contribution des études d'association pangénomiques à l'élucidation des mécanismes physiopathologiques sous-jacents à la maladie. Cet exposé nous amènera à proposer l'utilisation d'approches de criblages à haut-contenu afin d'identifier la fonction des gènes identifiés par les études d'association pangénomiques, ainsi que différentes méthodologies permettant de caractériser les variants fonctionnels de ces gènes.

Finalement, ces approches seront illustrées par la présentation de mes travaux visant à mieux comprendre l'implication des gènes *PLCG2* et *FERMT2* dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer par des approches *in vitro*.

INTRODUCTION

PARTIE 1 : EPIDEMIOLOGIE ET PRESENTATION CLINIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

I) Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer

En 2019, le Yearbook of Dementia in Europe indiquait que plus de 9 millions de personnes étaient atteintes de MA en Europe (1). En 2018, en France, on estimait que près de 374 000 hommes et 853 000 femmes souffraient de démence, soit un total de plus d'1,2 millions de personnes.

La MA est classiquement décrite sous deux formes. Les formes précoces dont les signes cliniques se développent avant 65 ans et sont entièrement déterminées par la génétique selon une transmission autosomique dominante ne représente qu'1% des cas de MA. Pour la grande majorité des cas, il s'agit de formes sporadiques de MA d'apparition tardive, sans agrégation familiale évidente, résultant de l'interaction entre facteurs génétiques et environnementaux, dont l'âge reste le principal facteur de risque.

Entre 2002 et 2017, l'espérance de vie en Europe est passée de 77,7 à 80,9 ans. La prévalence de la MA est estimée à 0.6% pour les personnes entre 60 et 65 ans, mais atteint plus de 40% après 90 ans (1). En supposant que les taux de prévalence de la maladie ne changent pas dans les années à venir, on estime que le nombre de personnes atteintes en Europe aura alors presque doublé d'ici 2050 (**Figure 1**). Un facteur clé de ce changement semble être l'augmentation significative du nombre de personnes âgées de plus de 75 ans, et en particulier de la tranche d'âge des plus de 85 ans, qui fait plus que doubler entre 2018 et 2050.

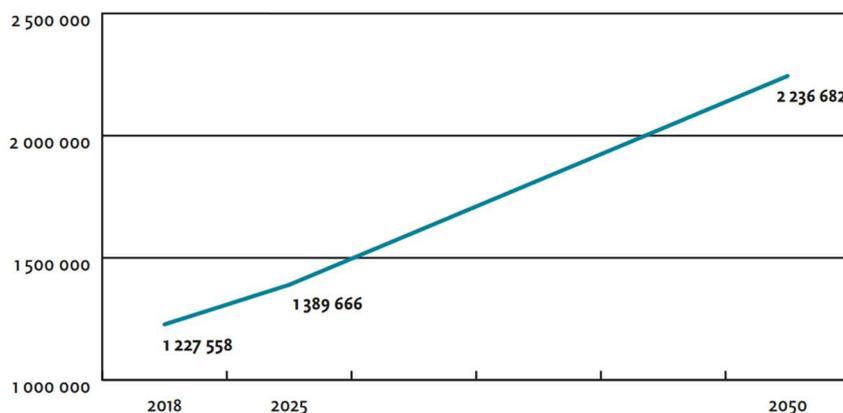


Figure 1 : Nombre estimé de personnes atteintes de maladie d'Alzheimer en France en 2018, 2025, et 2050. En raison du vieillissement de la population, on estime que le nombre de personnes atteintes de MA en France aura presque doublé d'ici 2050 (1).

Ces chiffres, bien qu'impressionnants, sont pourtant encore plus élevés lorsque les études se basent sur une définition biologique (plutôt que clinique) de la MA. En effet, la grande majorité des personnes souffrant de MA ne sont pas atteintes de démence mais se trouvent à des stades pré-démenciels de la maladie. Si l'on considère les stades antérieurs à la démence clinique, le nombre de personnes atteintes de la MA est beaucoup plus important que ce qui était précédemment estimé (2). Le nombre total de personnes atteintes de démence, de démence prodromique et de démence préclinique en Europe a été estimé respectivement à 6,9, 15,2 et 52,3 millions. Ensemble, elles représentaient ainsi 74,5 millions de personnes sur l'ensemble du continuum de la MA.

Pour une personne âgée de 70 ans, les estimations de durée de la maladie sont de 10 ans pour le stade préclinique, 4 ans pour le stade prodromique et 6 ans pour le stade démentiel de MA, soit un total de 20 ans (3). La longue durée de la maladie avant le décès contribue de manière significative à l'impact de la MA sur la santé publique, car une grande partie de cette période est passée dans un état de handicap et de dépendance graves. La MA est aujourd'hui la cinquième cause de mortalité dans le monde (4), mais surtout la quatrième cause d'années de vie en bonne santé perdues chez les personnes âgées de 75 ans et plus (5).

Une personne qui vit de 70 à 80 ans avec une démence de type Alzheimer passera en moyenne 40 % de cette période au stade sévère (6). Une grande partie de cette période sera passée en institution. À l'âge de 80 ans, environ 75 % des personnes atteintes de la MA vivent dans une maison de retraite, contre seulement 4 % de la population générale âgée de 80 ans. De plus, la plupart des patients ont un ou plusieurs aidants familiaux qui consacrent du temps et des efforts aux soins, ce qui entraîne une morbidité psychologique, un isolement social, et des difficultés financières pour ces personnes accompagnatrices (7).

Ainsi, la MA représente actuellement un enjeu majeur de santé publique et de société, qui doit pouvoir s'assurer que les systèmes de santé et d'aide sociale sont en mesure de fournir des soins et un soutien de haute qualité aux personnes vivant avec la maladie, depuis le diagnostic jusqu'aux soins de fin de vie. L'investissement dans la recherche contre la MA apparaît donc comme une priorité, que ce soit au niveau de la recherche fondamentale afin de mieux appréhender les bases physiopathologiques de la maladie, ou au niveau de la recherche pharmaceutique afin de fournir aux malades des thérapeutiques adaptées.

Un certain nombre d'études ont cependant fait état d'une récente diminution du taux d'incidence de la MA au cours de la dernière décennie (6). Cette baisse a été attribuée à l'amélioration, au cours du 20e siècle, des mesures de prévention contre les facteurs de risque de la MA, tels que le traitement de l'hypertension et l'augmentation du niveau d'instruction. Toutefois, même avec ce taux

d'incidence potentiellement plus faible, le nombre absolu de personnes atteintes de la MA devrait continuer à augmenter en raison de la forte hausse du nombre d'adultes âgés de 65 ans et plus, le groupe d'âge le plus exposé à la MA.

II) Facteurs de risques environnementaux de la MA

a. Facteurs de risques non-modifiables de la MA

Les études épidémiologiques ont permis d'identifier plusieurs facteurs de risques de MA. Les facteurs de risques non modifiables regroupent l'âge, la génétique, les antécédents familiaux, et le sexe d'un individu.

i. Age

Le vieillissement est considéré comme le principal facteur de risque de la MA. En effet, on estime que l'incidence de la MA double tous les cinq ans après l'âge de 65 ans, et que 40% de la population âgée de 90 ans ou plus souffre de MA (1) (**Figure 2**). Ce phénomène est probablement dû à une perturbation avec l'âge des voies du système inflammatoire, de l'homéostasie lipidique, ainsi que de la dégradation et de la synthèse des protéines (8). Cependant, la MA n'est pas le résultat d'un vieillissement cérébral normal, et il existe des différences significatives entre les personnes atteintes de la maladie, et une personne non-atteinte du même âge (9). Au niveau clinique, les patients atteints de MA présentent un déficit accentué de la mémoire, alors que le vieillissement cérébral normal est plutôt associé à des dysfonctionnements exécutifs. Il existe également des différences dans les régions cérébrales atteintes, avec un déficit d'activité neuronale touchant plus particulièrement les régions cérébrales médiotemporales chez les patients atteints de MA, tandis que les personnes âgées en bonne santé présentent des changements d'activité du cortex préfrontal. Ces différences suggèrent clairement que la MA ne peut pas être simplement considérée comme un processus de vieillissement accéléré.

ii. Antécédents familiaux

Les antécédents familiaux, qui représentent une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux partagés entre les membres de la famille, augmentent également considérablement le risque de MA. Les personnes dont un parent au premier degré (tel qu'un parent, un frère ou une sœur) est atteint de la maladie ont un risque 4 à 10 fois plus élevé de la développer (10).

iii. Sexe

Enfin, il existe des différences significatives en fonction du sexe des individus, les femmes étant plus à risque, et progressant plus rapidement dans la maladie que les hommes (**Figure 2**). Ces différentes vulnérabilités pourraient être expliquées à la fois par des différences génétiques et hormonales (11). Le rôle des œstrogènes dans le cerveau a notamment fait l'objet de nombreuses recherches qui ont mis en évidence l'implication des hormones dans la neuroprotection.

Tranche d'âge	Prévalence de la MA en Europe		
	Homme	Femme	Total
60–64	0,2	0,9	0,6
65–69	1,1	1,5	1,3
70–74	3,1	3,4	3,3
75–79	7,0	8,9	8,0
80–84	10,7	13,1	12,1
85–89	16,3	24,9	21,9
90+	29,7	44,8	40,8

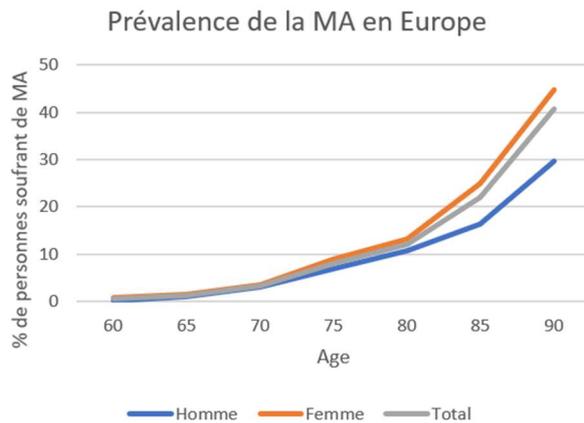


Figure 2 : Prévalence de la maladie d'Alzheimer en Europe en fonction de l'âge et du sexe. La prévalence de la MA augmente fortement avec l'âge, et les femmes sont plus à risque que les hommes de développer la pathologie (1).

b. Facteurs de risques modifiables de la MA

Les différentes études épidémiologiques ont également permis de mettre en évidence plusieurs facteurs de risque potentiellement modifiables de MA, principalement liés au mode de vie et à l'environnement (**Figure 3**).

i. Maladies cardiovasculaires

On sait notamment qu'il existe un lien très fort entre MA et maladies cardiovasculaires (12). L'intégrité du système vasculaire est essentielle au fonctionnement normal du cerveau et les modifications du système vasculaire peuvent entraîner une fuite de la barrière hémato-encéphalique et une diminution du tonus vasculaire cérébral. Entre autre, l'hypertension peut provoquer des changements dans les parois vasculaires, ce qui peut entraîner une hypoperfusion et une hypoxie cérébrale, contribuant ainsi au déclenchement de la MA (13). Les personnes souffrant d'insuffisance cardiaque ou d'accidents vasculaires cérébraux présentent également un risque plus élevé de développer la maladie (14). Les facteurs de risques de maladies cardiovasculaires tels que le tabagisme, l'abus d'alcool, ou une mauvaise alimentation, contribuent donc également au risque de MA.

ii. Maladies métaboliques

L'obésité a également été associée au risque de démence, un indice de masse corporelle (IMC) plus élevé augmentant proportionnellement le risque de MA (15). Cela pourrait être expliqué par le fait que les changements métaboliques associés à l'obésité altèrent la plasticité des neurones. Les dyslipidémies, et en particulier des concentrations plasmatiques élevées de cholestérol, contribuent au risque de maladie, principalement en raison de l'implication du cholestérol cérébral dans la synthèse, l'élimination, et la neurotoxicité des peptides amyloïdes (16). Un effet bénéfique a pu être observé chez les utilisateurs de statines, avec une réduction de l'incidence de la MA et une amélioration de la progression de la maladie (17). Les études épidémiologiques indiquent également une association claire entre le diabète de type 2 et le risque accru de développer la MA (18). Plusieurs mécanismes sont suggérés pour expliquer cette association, notamment la toxicité neuronale de l'hyperglycémie et des produits de glycation.

iii. Facteurs de risques psychologiques

En plus de ces perturbations métaboliques, plusieurs facteurs de risques psychologiques ont également été mis en évidence. Le stress est notamment suggéré comme un facteur de risque de déclin cognitif, et des études menées sur des modèles animaux de MA ont montré que le stress provoquait une augmentation du dépôt de peptides amyloïde dans certaines régions cérébrales (19). La présence de troubles du sommeil ou de troubles psychiatriques favorise également l'apparition de la pathologie (20).

c. Facteurs protecteurs de la MA

D'autres facteurs environnementaux ont quant à eux été identifiés comme protecteurs (**Figure 3**).

i. Exercice physique

Il a entre autres été suggéré que l'exercice physique permettait de préserver la cognition, et pouvait réduire le risque de MA de près de 45 % (21). Cet effet bénéfique est lié à la réduction de la pression artérielle et de l'obésité, ainsi qu'à un meilleur flux sanguin cérébral et, par conséquent, à une meilleure oxygénation des zones importantes pour la fonction cognitive. Une bonne alimentation protégerait également de la MA, et l'on recommande notamment le régime méditerranéen riche en lipides insaturés et en antioxydants (22).

ii. Réserve cognitive

De plus, une activité cognitive accrue tout au long de la vie pourrait réduire le risque de MA (23). Dans de nombreux cas, on a observé un décalage entre le degré de lésions cérébrales constatées

dans les analyses histopathologiques et la gravité du déclin cognitif. Pour expliquer ces résultats, on a proposé la théorie de la réserve cognitive. Plusieurs éléments sont associés à une plus grande réserve cognitive, tels que le niveau d'éducation, le niveau de la profession, la pratique de loisirs, et une bonne socialisation. Ainsi, une bonne santé et un mode de vie sain sont autant de facteurs associés à une meilleure cognition et à un risque diminué de développer la MA.

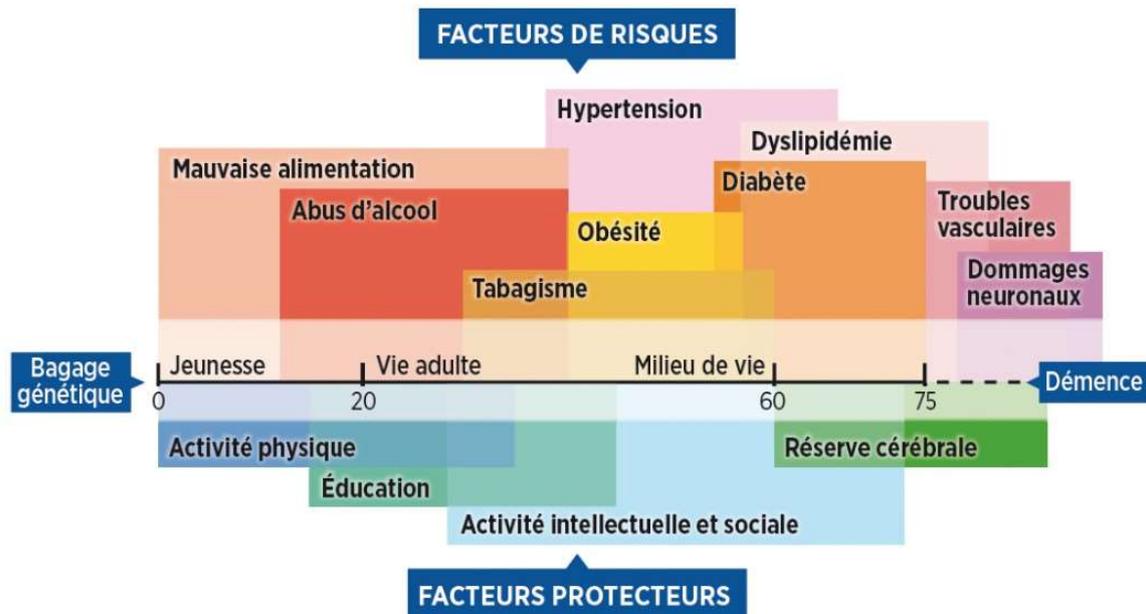


Figure 3 : Facteurs de risques modifiables de la maladie d'Alzheimer. Le risque de développer la MA est influencé par différents facteurs environnementaux et comportements tout au long de la vie. La présence de maladies cardiovasculaires et métaboliques favorise le développement de MA, tandis que l'exercice physique et la réserve cérébrale constituent des facteurs protecteurs de la maladie (24,25).

III) Symptomatologie de la MA

a. Symptômes mnésiques

Les principaux symptômes de la MA sont la perte de mémoire, et en particulier de la mémoire à court terme (26). La personne aura tendance à oublier les dates et rendez-vous importants, posera des questions répétitives dans un court laps de temps, et aura de plus en plus recours à des aide-mémoires pour des tâches qu'elle avait l'habitude d'effectuer seule. On retrouve également des difficultés dans la planification ou la résolution de problèmes, comme dans le fait de se concentrer pour pouvoir terminer un projet. La personne rencontre aussi des problèmes de désorientation dans le temps et dans l'espace, et confond fréquemment les dates et la chronologie correcte des événements.

b. Symptômes non-mnésiques

On trouve également des présentations non-mnésiques de la MA qui incluent des dysfonctionnements visuo-spatiaux, linguistiques, et exécutifs (27). Les difficultés visuo-spatiales englobent des difficultés de lecture, et des difficultés à reconnaître des objets familiers. On peut également retrouver une aphasia non fluente avec des pauses importantes pour trouver les mots et les utiliser, des difficultés à nommer des objets, à participer ou à suivre une conversation. Enfin, la présentation dysexécutive de la MA est de plus en plus fréquemment reconnue, en particulier chez les jeunes patients (28). Ces personnes ont des difficultés à exécuter des mouvements, à réaliser des tâches multiples, et à prendre des décisions.

c. Symptômes neuropsychiatriques

Pour finir on retrouve également chez les patients atteints de MA des symptômes neuropsychiatriques et des changements comportementaux. La dépression, l'anxiété et le retrait social peuvent être les plus évidents dans les cas de démence légère, tandis que les délires, les hallucinations, le manque de contrôle émotionnel ou les comportements physiquement agressifs peuvent être observés à des stades plus avancés (29).

On retrouve ainsi une grande hétérogénéité des symptômes associés à la MA impactant différents aspects de la vie du malade. Ces symptômes évoluent également au cours du développement de la maladie, et de l'avancée du patient dans les différents stades cliniques de la MA.

IV) Histoire naturelle de la MA

a. Phase pré-clinique ou asymptomatique à risque de MA

On sait désormais que la MA s'installe pendant des années avant l'apparition des symptômes (30). On parle de phase préclinique ou de phase asymptomatique à risque de MA, où le patient ne présente aucun déficit cognitif, mais où certaines perturbations biologiques sont déjà visibles au niveau cérébral. La grande majorité des cas n'est malheureusement pas identifiée pendant ces phases, et la plupart des patients qui reçoivent un diagnostic spécifique de MA ont déjà évolué vers les stades modérés ou sévères de la maladie.

b. Phase de déficience cognitive légère

La déficience cognitive légère due à la MA (aussi appelée phase prodromale) marque le début du stade symptomatique de la maladie (31). Les manifestations cognitives sont progressives, de sorte qu'il est impossible de définir précisément le début de l'état clinique. Le diagnostic de déficience cognitive légère due à la MA est une question de jugement clinique effectué par un clinicien compétent

concernant la présence d'une déficience cognitive sans interférence significative dans les activités quotidiennes habituelles. Lorsque les patients commencent à présenter des signes de déficience cognitive légère due à la MA, la mémoire et les fonctions exécutives sont souvent les principaux domaines cognitifs touchés. Entre 35 % et 85 % des patients atteints présentent également au moins un symptôme neuropsychiatrique tels que la dépression, l'irritabilité, l'apathie ou l'anxiété (32). Parmi ces patients atteints de déficience cognitive légère, un tiers évoluera vers le stade de démence sur une période de 5 à 10 ans (33).

c. Phase de démence

L'entrée dans le stade de démence est caractérisée par des symptômes cognitifs ou comportementaux d'une ampleur suffisante pour interférer avec les fonctions quotidiennes. La poursuite de la détérioration de la mémoire et des fonctions exécutives, ainsi que l'apparition de troubles dans d'autres domaines cognitifs (par exemple les capacités visuo-spatiales et le langage), empêchent les personnes concernées d'accomplir les activités quotidiennes de base. Les symptômes neuropsychiatriques sont également fréquents, en particulier aux stades sévères de la maladie (34). L'ensemble des symptômes observés au stade de démence est généralement associé à une perte d'autonomie, conduisant la plupart du temps à une institutionnalisation.

La symptomatologie clinique fait partie intégrante du diagnostic. L'examen des fonctions cognitives et mnésiques permettra de suggérer la présence d'une MA chez le patient, et d'apprécier le stade de gravité. Les progrès des techniques d'imagerie et des biomarqueurs réalisés ces dernières années permettent également au clinicien d'étayer leurs diagnostics à l'aide de tests paracliniques.

PARTIE 2 : DIAGNOSTIC DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Le processus de diagnostic commence par la détermination de la présence et de la gravité des troubles cognitifs, à travers les informations fournies par une personne connaissant bien la vie quotidienne du patient et la réalisation d'un examen clinique.

I) Les tests d'orientation clinique

Des outils d'évaluation clinique rapides, faciles à utiliser et validés par la communauté scientifique peuvent être utilisés pour identifier les troubles cognitifs, fonctionnels et psycho-comportementaux (35). Le *Mini-Mental State Examination* (MMSE), et le *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA) permettent d'évaluer les fonctions cognitives d'un individu. D'autres tests tels que l'*Instrumental Activities of Daily Living* (IADL) ou le *Functional Activities Questionnaire* (FAQ) permettent d'évaluer les capacités fonctionnelles dans les activités du quotidien. Enfin, le *Neuropsychiatric Inventory Questionnaire* (NPI-Q) permet quant à lui de repérer d'éventuels troubles psycho-comportementaux chez une personne. Toutefois, ces outils sont influencés par de nombreux facteurs linguistiques, culturels, éducatifs et démographiques, ce qui peut compliquer leur utilisation et fausser leurs résultats (36).

II) Développement des techniques d'imageries et des biomarqueurs spécifiques à la MA

a. Le développement des techniques d'imageries et des biomarqueurs remet en cause la définition de la MA

Pendant des années, le diagnostic de la MA reposait uniquement sur l'impression du clinicien de la présence d'un trouble neurodégénératif progressif (37). Cependant, le progrès des technologies d'imagerie et le développement de différents biomarqueurs spécifiques de la MA permettent désormais un diagnostic plus objectif. Deux principaux groupes ont ainsi créé des lignes directrices pour le diagnostic de MA : le *National Institute on Aging–Alzheimer's Association* (NIA-AA) et l'*International Working Group* (IWG) (38,39). Le groupe NIA-AA définit la MA ainsi que les différents stades de la maladie en se basant uniquement sur la biologie, c'est-à-dire sur la présence d'une pathologie amyloïde et/ou Tau mise en évidence par imagerie cérébrale ou par la positivité de biomarqueurs. Cette définition a été initialement formulée à des fins de recherche, et a entraîné de nombreuses difficultés quant à son utilisation dans la pratique clinique. Par exemple, des personnes ne souffrant pas de troubles cognitifs peuvent présenter des biomarqueurs de pathologie amyloïde et Tau, et ne jamais développer de manifestations cliniques au cours de leur vie. Le groupe IWG estime donc quant à lui qu'une personne n'est pas atteinte de la MA tant qu'elle ne présente pas de symptômes cliniques associés à la présence de biomarqueurs anormaux. Ce groupe de travail

considère les personnes sans troubles cognitifs présentant des biomarqueurs positifs comme « à risque d'évolution vers la MA » et non comme des « malades en phase pré-clinique ».

Le développement des techniques d'imagerie et des biomarqueurs spécifiques à la MA représentent une innovation majeure dans le parcours de soins cliniques des patients, en favorisant le dépistage, le diagnostic et la stadification de la maladie.

b. Les différentes techniques d'imagerie

i. IRM et TEP-FDG

L'IRM et le TEP-FDG (Tomographie par Emission de Positron au Fluorodésoxyglucose) ont été les premières technologies d'imagerie utilisées pour évaluer les patients atteints de troubles cognitifs. L'IRM structurelle est largement utilisée dans le diagnostic initial de la MA. Elle permet d'exclure d'autres causes de troubles cognitifs mais également d'évaluer l'atrophie cérébrale engendrée par la pathologie, une perte de volume plus importante étant corrélée avec l'avancée des troubles cognitifs (40) (**Figure 4**).

La TEP-FDG permet de mettre en évidence l'hypométabolisme temporo-pariétal et hippocampique qui précède la perte de volume et qui est très caractéristique de la MA (41) (**Figure 4**). Le degré et l'étendue régionale de l'hypométabolisme mesuré par la TEP-FDG sont également en corrélation avec la gravité globale de la déficience cognitive.

ii. TEP SCAN

Depuis quelques années, des ligands TEP spécifiques des protéinopathies qui définissent la MA ont été mis au point, et il est désormais possible d'identifier la présence des pathologies amyloïdes et Tau chez les personnes vivantes (**Figure 4**).

La première démonstration réussie chez l'homme d'un ligand TEP marquant spécifiquement les plaques β -amyloïde ($A\beta$ -TEP) a eu lieu en 2004 et utilisait le composé B de Pittsburgh (42). Depuis, trois traceurs, le 18 F-florbetapir, le 18 F-flutemetamol et le 18 F-florbetaben, ont reçu l'approbation des autorités de santé et sont disponibles sur le marché (43). L'imagerie $A\beta$ -TEP quantitative permet de fournir des preuves de l'étendue et de la localisation des dépôts amyloïdes. Chez les personnes atteintes de déficience cognitive légère, celles qui présentent un taux élevé d' $A\beta$ par TEP ont un risque 2,6 fois plus élevé de progression vers la démence (44). Cependant les études $A\beta$ -TEP longitudinales montrent qu'il existe un délai de 10 à 20 ans entre le début de l'accumulation d' $A\beta$ dans le cerveau et l'apparition de troubles cognitifs symptomatiques (45). Environ 20 % des personnes âgées de 65 ans et près de 60 % des personnes âgées de 85 ans présentent un taux élevé d' $A\beta$ dans le cerveau mais ne

présentent pas d'atteintes sur le plan cognitif (46). Ni le moment de l'apparition d'une TEP-amyloïde anormale ni sa distribution topographique ne sont étroitement liés aux symptômes.

Environ dix ans plus tard, le premier ligand TEP de la protéine Tau chez l'homme, le Flortaucipir F18, a été mis au point (47). Le Flortaucipir F18 a été récemment approuvé aux États-Unis pour l'imagerie de la pathologie Tau chez les personnes atteintes de troubles cognitifs qui font l'objet d'une évaluation de la MA. Des traceurs de deuxième génération présentant un meilleur rapport signal-bruit ainsi qu'une liaison non spécifique moins importante sont également disponibles à des fins de recherche (48). Ces traceurs permettent de mettre en évidence la propagation spatiale de la pathologie Tau *in vivo*, qui est en étroite corrélation avec les résultats cognitifs et fonctionnels à tous les stades cliniques de la MA (35). Les anomalies de la TEP-Tau sont hautement prédictives d'un déclin cognitif ultérieur chez les individus asymptomatiques et symptomatiques.

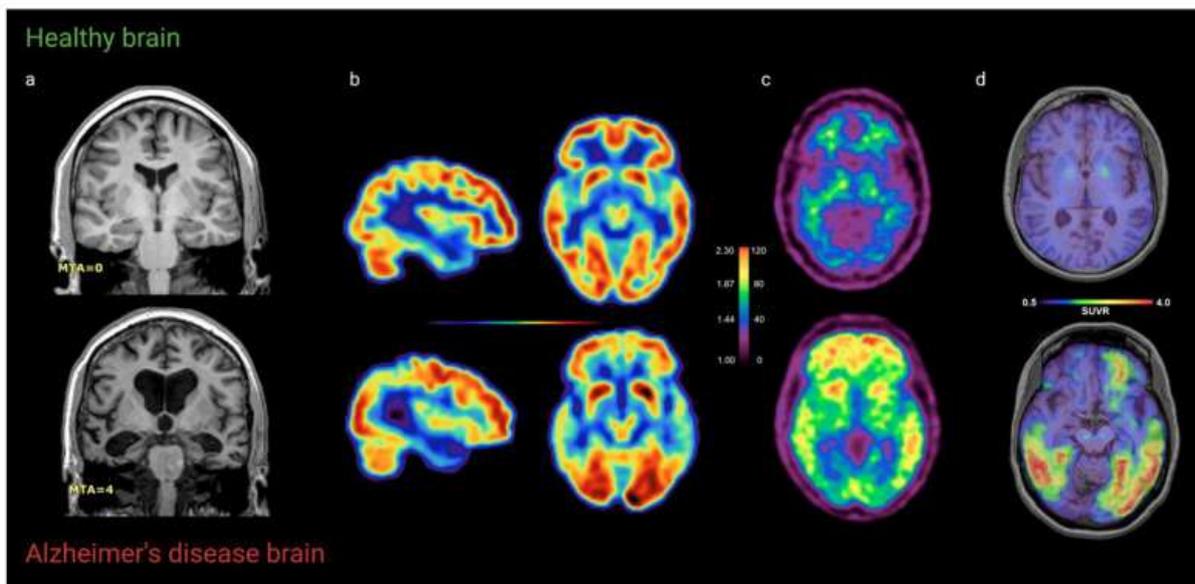


Figure 4 : Imageries cérébrales comparative entre un patient sain et un patient atteint de maladie d'Alzheimer. Le diagnostic de la MA repose sur différentes techniques d'imagerie telles que (a) l'IRM structurelle, (b) la TEP-FDG, (c) la TEP-amyloïde, et (d) la TEP-Tau (49).

Des TEP reflétant d'autres composantes de la physiopathologie liée à la MA, telles que le dysfonctionnement synaptique (TEP de la glycoprotéine 2A des vésicules synaptiques (SV2A)) et l'inflammation (TEP de la protéine translocatrice (TSPO) et TEP de la monoamine oxydase B (MAO-B)) font leur apparition, mais ne sont pas encore prêts pour une mise en œuvre clinique.

Malheureusement, la disponibilité limitée des scanners TEP, des centres de fabrication de radioligands et des équipes de médecine nucléaire, ainsi que le coût élevé de ces technologies, sont autant de facteurs qui limitent son utilisation globale dans la pratique clinique de routine (50).

c. Les biomarqueurs du LCR

Au début du XXI^e siècle, certains biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien (LCR) ont été reconnus comme étant spécifiques de la MA. Le dosage de l'amyloïde β -42 ($A\beta_{1-42}$), de la protéine Tau totale, et de la protéine Tau phosphorylée dans le LCR des patients sont désormais des techniques reconnues pour le diagnostic de la MA (51). Pour autant, leurs utilisations ne sont pas encore systématiques dans la pratique. Actuellement le dosage dans le LCR de ces biomarqueurs est surtout réalisé en cas de doute diagnostique, en particulier chez les patients jeunes.

Les biomarqueurs de l' $A\beta$ semblent devenir anormaux peu de temps avant que la TEP amyloïde ne le devienne (**Figure 5**). La séquestration de l' $A\beta$ dans le parenchyme cérébral entraîne une diminution de son taux dans le LCR des personnes atteintes de MA symptomatique, quel que soit le stade de la maladie. Cependant, il existe une variabilité interindividuelle des taux d' $A\beta_{1-42}$ dans le LCR et la normalisation à l'aide des taux de Tau phosphorylée dans le LCR a montré une meilleure performance diagnostique par rapport à l' $A\beta_{1-42}$ seul (52).

La détection de protéine Tau phosphorylée sur le résidu Thréonine en position 181 (p-Tau181) dans le LCR est considéré comme un biomarqueur spécifique de la pathologie Tau, tandis que celle de Tau total (t-Tau) est considéré comme un marqueur général de la neurodégénérescence (43). La p-Tau181 et la t-Tau sont toutes deux typiquement augmentées au stade de déficience cognitive légère et de démence (53). De plus, l'élévation de la protéine Tau phosphorylée dans le LCR peut refléter des stades plus précoces de la tauopathie que la TEP au 18F-flortaucipir. Enfin, la p-Tau181 augmente de façon marquée dans la MA, mais pas dans la plupart des autres maladies neurodégénératives. La protéine Tau phosphorylée sur le résidu Thréonine en position 217 (p-Tau217) a également récemment été proposée comme une alternative plus sensible à la p-Tau181, mais n'est pas encore disponible en clinique (54).

D'autres nouveaux biomarqueurs du LCR ont également été proposés dans un cadre diagnostique de la MA. Le dosage dans le LCR de la chaîne légère des neurofilaments, un composant majeur du cytosquelette des axones relargué lors de dommages neuronaux, représente notamment un biomarqueur de neurodégénérescence dans diverses pathologies (55). La présence dans le LCR de la neurogranine, de la protéine 25 associée au synaptosome (SNAP25) et de la synaptotagmine 1 (SYT1) sont quant à elles des marqueurs de dysfonctionnement synaptique (56).

La ponction lombaire nécessaire au prélèvement de LCR chez les patients reste cependant un geste invasif, et soumis à plusieurs contre-indications, ce qui complique l'obtention d'échantillons dans la pratique.

d. Les biomarqueurs plasmatiques

Étant donné le coût et le manque de disponibilité des TEP, et le côté invasif du prélèvement céphalo-rachidien, de nombreux travaux cherchent à développer des biomarqueurs sanguins de la MA.

Les mesures de l' $A\beta_{1-40/1-42}$ dans le plasma sont très bien corrélées avec l' $A\beta_{1-40/1-42}$ dans le LCR et avec la TEP amyloïde (57). Un test plasmatique $A\beta_{1-40/1-42}$ basé sur la spectrométrie de masse a par exemple atteint une précision de 0,81 pour prédire la charge amyloïde dans le cerveau et a récemment reçu la certification *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (58).

Outre l' $A\beta$, les protéines Tau phosphorylées p-Tau181, p-Tau217 et p-Tau231 plasmatiques apparaissent comme des biomarqueurs précis, spécifiques et accessibles pour diagnostiquer la MA (59). Les concentrations plasmatiques de Tau phosphorylées permettent de différencier les patients atteints de MA de ceux atteints d'autres maladies neurodégénératives. Elles sont en corrélation avec la TEP Tau, et permettent également de prédire la progression clinique.

À l'avenir, des biomarqueurs sanguins pourraient également être développés dans d'autres contextes d'utilisation tels que la prédiction du risque de maladie, le suivi de la progression de la maladie et la surveillance de la réponse au traitement.

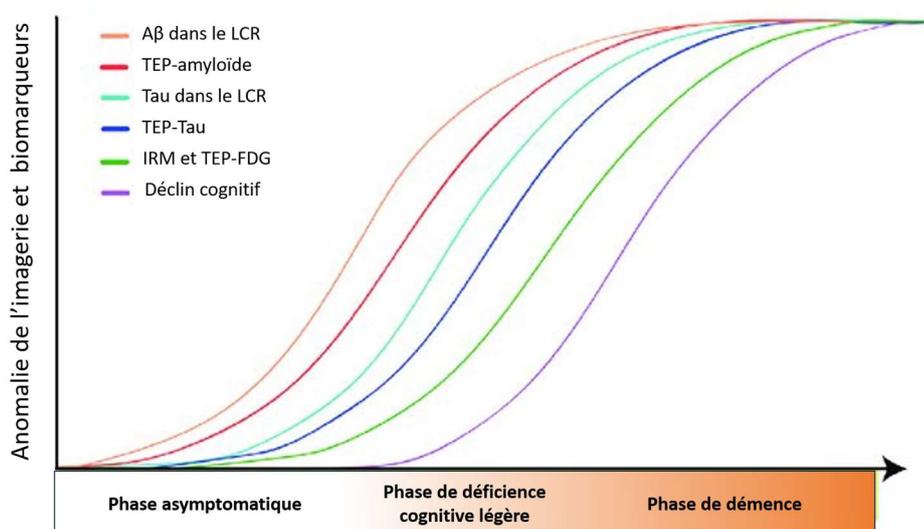


Figure 5 : Evolution de l'imagerie et des biomarqueurs dans la progression de la maladie d'Alzheimer. La pathologie amyloïde est la première à pouvoir être détectée par le dosage de l' $A\beta$ dans le LCR puis par la visualisation des plaques amyloïdes par TEP-amyloïde. Avec l'avancée dans la maladie, on note l'apparition de marqueurs anormaux de Tau dans le LCR puis l'observation d'une accumulation de Tau dans le cerveau par TEP-Tau. Les imageries par IRM et TEP-FDG sont les derniers marqueurs à devenir positifs (60).

L'imagerie par TEP-scan et le dosage dans le LCR ou dans le sang de biomarqueurs permet ainsi d'étayer le diagnostic clinique de MA. L'utilisation de telles méthodes a notamment été rendue possible par une meilleure compréhension et une meilleure connaissance de la pathologie amyloïde et de la pathologie Tau, qui représentent les principales caractéristiques neuropathologiques de la MA.

PARTIE 3 : LA PATHOLOGIE AMYLOÏDE

Les agrégats d'A β issus du catabolisme de la protéine APP (*Amyloid Protein Precursor*) sont les principaux constituants des plaques amyloïdes caractéristiques de la MA. Les études anatomopathologiques *post-mortem*, confirmées *in vivo* par les études plus récentes de neuro-imagerie, indiquent une évolution spatio-temporelle de l'accumulation de peptides A β dans le cerveau qui se produit d'abord dans le néocortex, se propage à l'allocortex et au tronc cérébral, pour atteindre finalement le cervelet (61) (**Figure 6**).

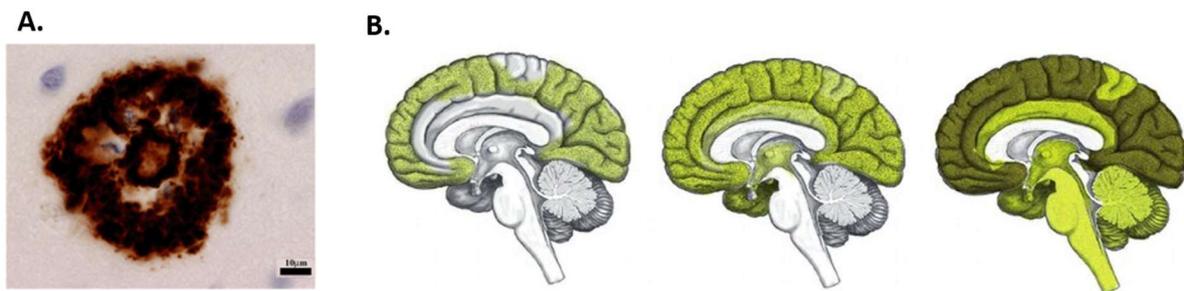


Figure 6 : La pathologie amyloïde. A. Microphotographie d'un cerveau atteint de MA montrant une plaque amyloïde (62). B. Progression spatiale de la pathologie amyloïde au cours du développement de la MA (63).

I) Le métabolisme de l'APP

L'APP est une protéine transmembranaire à demi-vie courte subissant un métabolisme endoprotéolytique dont les trois principaux types de protéases impliqués sont, les α -sécrétases, les β -sécrétases, et les γ -sécrétases. Le trafic intra-cellulaire de l'APP est également un facteur essentiel de son métabolisme puisqu'il va conditionner la rencontre entre l'APP et les sécrétases (α , β ou γ) qui présentent des localisations subcellulaires différentes. L'APP est d'abord maturé dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, puis transloqué à la surface de la cellule. L'APP peut également entrer dans la voie lysosomale et subir une dégradation protéolytique (64).

a. Voie non-amyloïdogène

L'APP peut être métabolisé selon deux voies (**Figure 7**). Dans la voie non-amyloïdogène (ou voie α), l'APP est d'abord clivé par l' α -sécrétase entre les résidus 687 et 688, libérant ainsi un fragment soluble N-terminal sAPP α , et un fragment C-terminal CTF α qui reste ancré à la membrane. Un second clivage est ensuite réalisé par une γ -sécrétase en C-terminal. Le clivage par l' α -sécrétase ayant lieu dans la séquence β -amyloïde, cette voie ne conduit pas à la formation de peptides A β , mais à la formation d'un fragment p3 non-amyloïdogène.

b. Voie amyloïdogène

Dans la voie amyloïdogène (ou voie β), l'APP est d'abord clivée par une β -sécrétase entre les résidus 671 et 672, libérant un fragment soluble N-terminal sAPP β , et un fragment C-terminal CTF β encore ancré dans la membrane. Un second clivage est ensuite réalisé par une γ -sécrétase composée des Préséniles 1 et 2. Cette voie conduit à la libération de peptides A β , et d'un fragment AICD dans le cytoplasme. L'action de la γ -sécrétase peut générer principalement des peptides A β de 40 acides aminés appelés A β ₁₋₄₀ ainsi que des peptides de 42 acides aminés appelés A β ₁₋₄₂. Les A β ₁₋₄₂ présenteraient une neurotoxicité par leur capacité à s'agréger sous formes d'oligomères et à favoriser la formation des plaques amyloïdes.

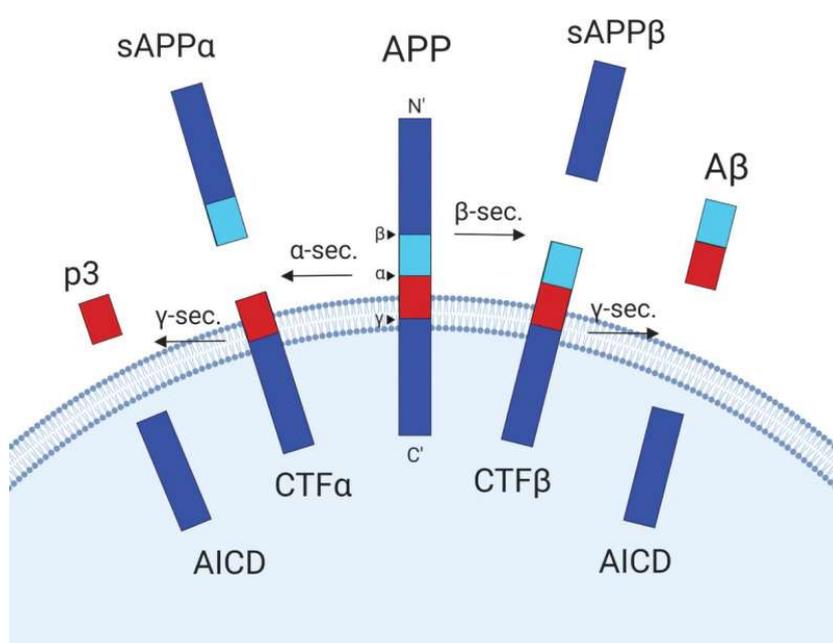


Figure 7 : Métabolisme endoprotéolytique de l'APP. Dans la voie non-amyloïdogène (sur la gauche), l' α -sécrétase (α -sec) clive l'APP en un fragment soluble sAPP α et un fragment membranaire CTF α , qui lui-même sera clivé par la γ -sécrétase (γ -sec) en un fragment AICD et un fragment p3 non-amyloïdogène. Dans la voie amyloïdogène (sur la droite), la β -sécrétase (β -sec) clive l'APP en un fragment soluble sAPP β et un fragment membranaire CTF β , dont le second clivage par la γ -sécrétase est à l'origine de la production de peptides amyloïdes A β (65).

II) Rôles physiologiques de l'APP et de ses métabolites

L'APP est principalement exprimé dans les neurones, et en particulier au niveau synaptique. Il joue un rôle dans plusieurs processus cellulaires tels que l'adhésion, le remodelage des épines dendritiques, et la neurotransmission (66).

L'APP fait partie de la famille des molécules d'adhésion cellulaire qui assurent l'adhésion des cellules entre elles et à la matrice extracellulaire, et participe ainsi à la régulation de la croissance neuronale (67). Au cours du développement, l'APP est enrichi dans les cônes de croissance des axones et agit en tant que co-récepteur pour les signaux de guidance axonale. Après différenciation, l'APP agit comme une molécule d'adhésion synaptique nécessaire à la structuration des synapses. Les cultures primaires hippocampiques issues de souris *App*^{-/-} montrent une diminution significative de la densité des épines dendritiques par rapport aux neurones témoins de la même lignée (68).

Plusieurs sous-produits issus du catabolisme de l'APP sont impliqués dans la physiologie neuronale. Les peptides sAPP α et sAPP β peuvent par exemple moduler la transmission synaptique basale et la plasticité synaptique (69). Des expériences menées sur des tranches de cerveaux de souris *App*^{-/-} montrent que l'exposition aux peptides sAPP α est suffisante pour restaurer les défauts de densité des épines dendritiques et de potentialisation à long terme (LTP) (70).

Les peptides A β sont des neuropeptides hautement conservés chez les vertébrés, ce qui suggère leur implication dans d'importantes fonctions physiologiques (71). Les monomères d'A β permettent notamment le maintien de la signalisation intracellulaire essentielle à la neurotransmission et au trafic des vésicules synaptiques. Les monomères d'A β peuvent également initier des voies médiées par la transcription du BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), connu pour être impliqué dans la neurogenèse hippocampique et la plasticité synaptique (72).

III) Les mutations des gènes *APP* et *PSEN* sont responsables de forme précoces de MA

Les mutations du gène *APP*, et des Présénilines (*PSEN1* et *PSEN2*), sont à l'origine du développement des formes monogéniques précoces de la MA. Ces formes représentent environ 1 % des cas de MA, et sont exclusivement causées par des mutations de ces trois gènes, transmises selon un mode autosomique dominant (73). Les personnes porteuses voient apparaître des troubles cognitifs à un âge très précoce : l'âge typique d'apparition de la démence est de 35 à 55 ans pour les mutations de *PSEN1*, de 45 à 65 ans pour les mutations de *PSEN2* et de 45 à 60 ans pour les mutations du gène *APP* (74). La durée des symptômes avant le décès est d'environ 10 ans pour l'ensemble de ces mutations.

a. Les mutations du gène *APP*

Le gène *APP* se situe sur le chromosome 21, et les personnes atteintes de trisomie 21 développent des signes neuropathologiques et cliniques de la MA de manière précoce, en raison de la copie supplémentaire de l'*APP* qui entraîne une surproduction d'A β tout au long de la vie (75). Dans

de rares cas de duplications partielles du chromosome 21, les personnes ne développent la MA que si la région transloquée contient le gène *APP* (76).

La plupart des mutations du gène *APP* à l'origine des formes monogéniques de MA se concentre autour des sites protéolytiques des β - et γ -sécrétases, et conduisent à une augmentation de la sécrétion d'A β ou des changements dans le ratio A $\beta_{1-40}/1-42$.

Les mutations pathogènes au niveau du site de clivage de la β -sécrétase de l'*APP* vont faciliter le clivage de celui-ci. Par exemple, la mutation *Swedish* (K595N/M596L), localisée dans l'exon 16 du gène, conduit à une surproduction d'A β d'environ 3 fois (77). À l'inverse, la mutation *Icelandic* (A673T) du gène *APP* diminue le risque de développer la MA, en conférant une plus faible affinité de la β -sécrétase pour l'*APP* et en réduisant la production de peptides A β d'environ 40 % *in vitro* (78).

D'autres mutations de l'*APP*, comme la mutation *Indiana* (V717F), sont situées au niveau du site de clivage de la γ -sécrétase, et favorisent la production d'espèces A β_{1-42} par rapport aux A β_{1-40} (79).

b. Les mutations des gènes *PSEN1* et *PSEN2*

Les gènes *PSEN1* et *PSEN2* codent les sous-unités catalytiques du complexe γ -sécrétase. La plupart des mutations à l'origine des formes monogéniques précoces de la MA sont causées par des mutations du gène *PSEN1*, et plus de 200 mutations ont pu être répertoriées (80). Les mutations de *PSEN2* sont plus rares, avec moins de 40 mutations actuellement identifiées. Ces mutations perturbent l'activité protéolytique de la γ -sécrétase, et vont favoriser la production d'A β_{1-42} , augmentant ainsi les niveaux relatifs des espèces plus longues et plus toxiques de peptides amyloïdes (81).

L'identification des mutations des gènes *APP*, *PSEN1*, et *PSEN2* à l'origine des formes monogéniques précoces de MA a conduit à la conceptualisation de l'hypothèse de la cascade amyloïde, selon laquelle les dépôts extracellulaires d'A β seraient à l'origine de l'agrégation intracellulaire de Tau, qui elle-même conduit au dysfonctionnement synaptique et à l'apparition des troubles cognitifs (82).

IV) Implication du métabolisme de l'*APP* dans les formes communes de MA

Pour autant, les formes monogéniques précoces ne représentent qu'une très faible minorité des cas de MA. Dans environ 99% des cas, les patients sont atteints par la forme multifactorielle tardive, dont l'origine complexe résulte d'un ensemble de facteurs de risques environnementaux et génétiques.

a. Le facteur de risque génétique APOE4

L'allèle $\epsilon 4$ de l'apolipoprotéine E (APOE) représente le plus important facteur de risque génétiques des formes communes de MA, et les porteurs de l'allèle *APOE* $\epsilon 4$ présentent des dépôts d'A β à un âge plus précoce que les non-porteurs (83). Bien que les causes moléculaires expliquant l'effet des isoformes de l'APOE sur les voies amyloïdogènes ne soient pas encore complètement élucidées, des études indiquent que l'APOE jouerait un rôle dans la clairance des peptides A β en facilitant son transport et son élimination à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) (84). D'autres études suggèrent que l'APOE $\epsilon 4$ pourrait faciliter la formation de fibrilles toxiques en accélérant la nucléation des peptides A β ou en influençant directement l'activité de la γ -sécrétase (85).

b. Les autres facteurs de risques génétiques modulant le métabolisme de l'APP

Les études d'association pangénomiques ont permis d'identifier plusieurs autres facteurs de risques génétiques des formes communes de MA, et un certain nombre de ces gènes est également impliqué dans la régulation de la production des peptides A β (86). Les mutations des gènes *ADAM10* et *ADAM17* qui codent les différentes α -sécrétases impliquées dans métabolisme de l'APP sont associées à un risque augmenté de développer une forme tardive de MA. D'autres gènes à risque tels que *CLU* et *SORL1* régulent le trafic intra-cellulaire de l'APP, tandis que *PICALM* et *BIN1* seraient impliquées dans la dégradation de ce dernier (87).

V) Mécanismes de toxicité des peptides amyloïdes issus du métabolisme de l'APP

a. Accumulation de formes neurotoxiques des peptides A β

Les formes communes de MA seraient ainsi causées par une accumulation extraneuronale de peptides A β , elle-même due à un déséquilibre entre la production neuronale et la clairance extracellulaire de ces peptides (88).

i. Clairance des peptides A β

En raison de la synthèse continue de l'APP et donc de la sécrétion continue d'A β , de faibles réductions de la clairance suffisent à provoquer leur accumulation (89). La clairance de l'A β dépend en partie de l'écoulement du LCR à travers la BHE, et du système glia-lymphatique (glymphatique) (90). Les A β solubles peuvent être transportés à travers les cellules endothéliales cérébrales de la BHE et éliminés dans la circulation sanguine systémique. Le système glymphatique a également été proposé comme système d'échange entre le LCR et les fluides interstitiels en l'absence d'accès lymphatique direct au cerveau. Ce système facilite l'évacuation des fluides cérébraux et des déchets pendant le sommeil grâce à des canaux périvasculaires soutenus par la glie.

ii. Accumulation et agrégation des peptides A β

Les peptides A β peuvent adopter un grand nombre de conformations (91). Après avoir été générés sous forme de monomères solubles, les peptides A β peuvent se retrouver dans plusieurs états d'agrégation intermédiaires différents, sous formes de dimères et de trimères, puis d'oligomères solubles et de protofibrilles, jusqu'à ce qu'ils forment des fibrilles qui s'accumulent en plaques amyloïdes caractéristiques de la MA (**Figure 8**). Ces espèces existent dans un état où une forme peut se convertir en une autre de manière bidirectionnelle. Elles sont caractérisées par la taille des agrégats, leurs états de conformation et leurs solubilités.

Les monomères A β_{1-40} et A β_{1-42} restent principalement dans une conformation en hélice α . L'A β_{1-42} étant moins soluble que l'A β_{1-40} , il est plus susceptible de former des agrégats. Les modifications post-traductionnelles comme des phénomènes de glycation des peptides A β accélèrent également leur agrégation et leur insolubilité (92).

Les oligomères A β sont hétérogènes en taille et en structure, et sont les plus toxiques parmi les différentes structures (93). Les peptides A β peuvent initialement s'arranger en trimères et s'assembler ensuite pour former des hexamères puis des dodécamères. Des études suggèrent que ces oligomères peuvent perturber la structure de la membrane cellulaire et se lier à différents récepteurs à la surface cellulaire. Ils peuvent également inhiber les mécanismes de la plasticité synaptique tels que la LTP et la dépression à long terme (LTD), et entraîner une diminution de la densité des épines dendritiques (94).

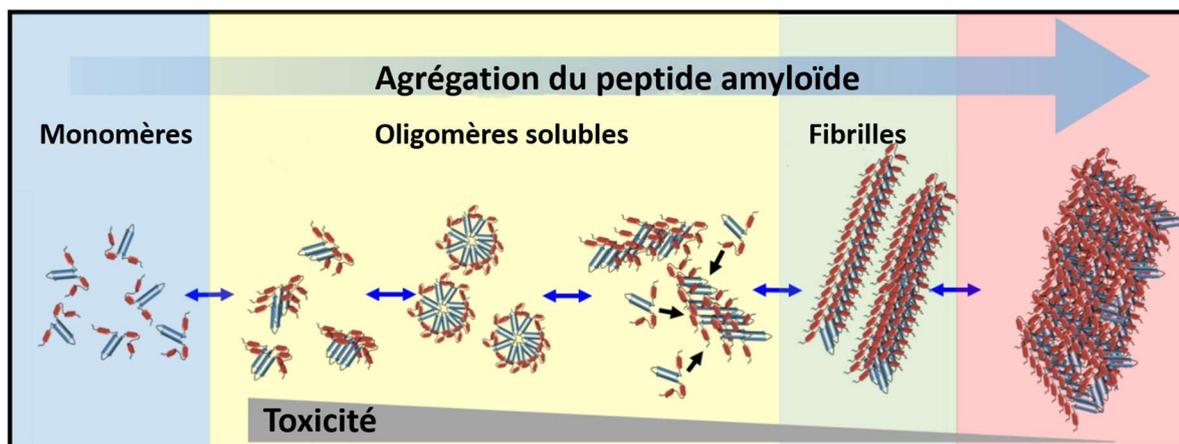


Figure 8 : Représentation schématique de l'agrégation des peptides amyloïde. Les monomères d'A β s'assemblent entre eux sous forme d'oligomères solubles (dimères, trimères, dodécamères, et protofibrilles), puis sous forme de fibrilles insolubles et de plaques amyloïdes. Les oligomères solubles de petites tailles représenteraient les espèces les plus neurotoxiques (95).

Les fibrilles sont des structures insolubles dans lesquelles les peptides A β s'assemblent en feuillets β avec des brins orientés perpendiculairement à l'axe long de la fibrille et stabilisés par des liaisons hydrogène (96). L'élongation de ces fibrilles a lieu par l'inclusion de monomères à l'extrémité de celles-ci (97). On sait que les dépôts fibrillaires insolubles dans le système vasculaire provoquent des perturbations physiques qui entravent la circulation sanguine et peuvent entraîner des hémorragies, mais les rôles complexes des dépôts parenchymateux (*i.e.* les plaques amyloïdes) sont moins bien définis (98). Les dépôts d'A β fibrillaires sont observés dans les régions où la densité des épines dendritiques est réduite, et dans les zones de perte neuronale, et pourraient servir de réservoirs insolubles aux oligomères toxiques (99).

b. Régulation de la pathologie amyloïde par les cellules microgliales et astrocytaires

Dans les cerveaux des personnes atteintes de MA, les plaques amyloïdes sont entourées par des cellules microgliales et astrocytaires, créant ainsi une barrière physique qui pourrait empêcher leur propagation et limiter leur toxicité (100).

Les cellules microgliales contribuent à l'élimination des peptides A β par un mécanisme de phagocytose médiée par les récepteurs de surface (101). Les peptides amyloïdes peuvent également interagir avec les récepteurs des cellules microgliales, et stimuler la libération de cytokines pro-inflammatoires favorisant ainsi la neuroinflammation. Les études d'association pangénomiques ont identifié un certain nombre de gènes à risque pour la MA principalement exprimés dans la microglie (86). Par exemple, les variants de *TREM2* réduisent les capacités de phagocytose des peptides A β par les cellules microgliales et augmentent le risque d'apparition de la MA (102).

Parallèlement à l'activation de la microglie, des astrocytes réactifs hypertrophiques peuvent entourer les plaques amyloïdes (103). Dans la MA, les astrocytes libèrent diverses molécules pro-inflammatoires après avoir été exposés aux peptides A β et finissent donc par amplifier la réponse neuroinflammatoire. Des études anatomopathologiques menées sur des cerveaux atteints de MA signalent la présence d'inclusions cytoplasmiques d'A β non fibrillaires dans les astrocytes, traduisant une phagocytose des dépôts extracellulaires d'A β (104).

VI) Les thérapeutiques anti-amyloïdes

Ces différents éléments soutenant l'hypothèse de la cascade amyloïde ont ainsi orienté le développement d'agents thérapeutiques capables de diminuer la production d'A β (inhibiteurs de sécrétases) ou d'en augmenter la clairance (immunothérapies).

a. Inhibiteurs de la γ -sécrétase et de la β -sécrétase

Plusieurs inhibiteurs de la γ -sécrétase et de la β -sécrétase ont été développés (105). Les études ont montré que ces molécules étaient capables d'inhiber la production de monomères A β *in vitro*, et qu'ils diminuent de manière dose-dépendante les concentrations d'A β dans le plasma et le LCR, tant chez l'animal que chez l'homme. Le sémagacestat, un inhibiteur de la γ -sécrétase, et le verubecestat, un inhibiteur de β -sécrétase, ont été testés chez l'homme. Les essais ont cependant été interrompus prématurément en raison d'une altération des fonctions cognitives observée au cours des trois premiers mois de traitement, suggérant une importante interaction entre ces molécules et d'autres substrats importants des sécrétases (106).

b. Anticorps monoclonaux anti-A β

Les immunothérapies par anticorps monoclonaux anti-A β restent les stratégies les plus prometteuses testées à ce jour chez les patients atteints de la MA. Parmi ces anticorps, l'aducanumab a été le premier à recevoir l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA), suivi par le lecanemab (107,108).

Deux essais cliniques jumelés de phase III, ENGAGE et EMERGE, ont été conçus pour évaluer l'efficacité et l'innocuité de l'aducanumab chez des patients atteints de déficience cognitive légère (109). Dans l'essai ENGAGE, l'aducanumab n'a montré aucune différence avec le placebo en ce qui concerne les paramètres cognitifs (110). Pour autant, l'essai EMERGE a montré que les patients traités par une dose élevée d'aducanumab pendant 78 semaines, présentaient une réduction du déclin cognitif de 22% par rapport à ceux traités par un placebo.

L'approbation accélérée de l'aducanumab par la FDA a eu lieu dans le contexte de la publication de données d'essais sur deux autres anticorps anti-A β , le lecanemab et le donanemab. Le lecanemab a fait l'objet d'un essai de phase III CLARITY AD, qui, à 18 mois, a montré une différence favorable par rapport au placebo, avec une diminution de 27 % du déclin cognitif (108). De même, l'étude de phase 3 TRAILBLAZER-ALZ 2 a fait état d'un ralentissement du déclin cognitif et fonctionnel chez les participants atteints de MA traités par le donanemab (111). Même si l'ampleur de l'effet reste limité, il doit être gardé à l'esprit qu'il a été obtenu dans une population cliniquement symptomatique dans laquelle les individus avaient probablement été exposés à l'A β pendant une période prolongée (112). Des essais cliniques avec des médicaments similaires sont en cours chez des personnes asymptomatiques à risque de développer la MA, mais les résultats ne seront pas disponibles avant quelques années.

Il est cependant important de noter que ces thérapeutiques anti-amyloïdes suscitent d'importantes inquiétudes en matière de sécurité. Les principaux effets indésirables observés lors des

essais cliniques des différents agents anti-amyloïdes étaient l'inflammation vasculaire et l'affaiblissement des vaisseaux sanguins cérébraux, entraînant la formation d'œdèmes et d'hémorragie intra-cérébrale. Trois décès dus au développement d'hémorragies ont notamment été signalés chez des patients traités par lecanemab. La FDA recommande par conséquent une surveillance étroite et la réalisation régulière d'IRM chez les patients recevant ces traitements.

Les anticorps monoclonaux anti-amyloïde représentent une avancée importante dans le traitement de la MA, mais le risque d'apparitions de graves effets secondaires, ainsi que l'efficacité limitée des traitements actuels, montrent la nécessité de continuer à explorer d'autres pistes thérapeutiques. La pathologie Tau représente l'autre caractéristique neuropathologique majeure de la MA, et une meilleure compréhension des mécanismes impliquant l'apparition des dégénérescences neurofibrillaires pourraient permettre de proposer d'autres cibles thérapeutiques.

PARTIE 4 : LA PATHOLOGIE TAU

L'un des principaux arguments justifiant l'importance de l'implication de protéine Tau dans les mécanismes étiologiques de la MA provient des analyses neuropathologiques de cerveaux *post-mortem*, où le nombre et la distribution spatiale des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) étaient assez bien corrélés avec la gravité de la maladie sur le plan clinique (**Figure 9**).

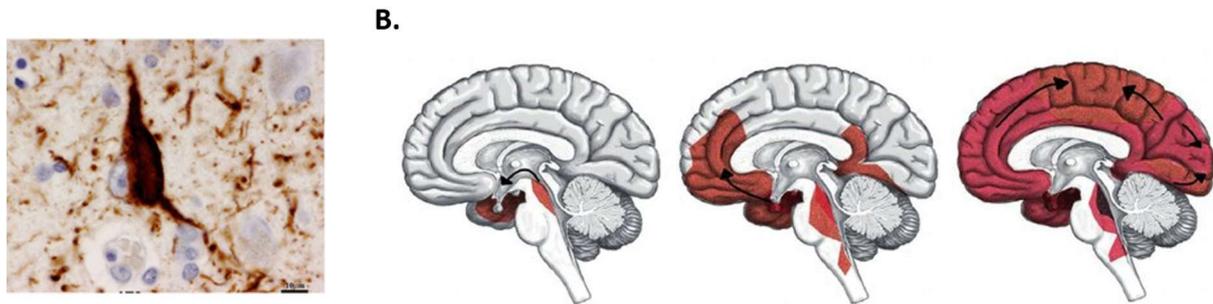


Figure 9 : La pathologie Tau. A. Microphotographie d'un cerveau atteint de MA montrant des dégénérescences neurofibrillaires (62). B. Progression spatiale de la pathologie Tau au cours du développement de la MA (63).

I) Epissage alternatif et mutations du gène *MAPT*

La protéine Tau est composée de quatre domaines fonctionnels, à savoir le domaine de projection N-terminal, les régions riches en proline (*prolin rich domain* ou PRD), le domaine de liaison aux microtubules (*microtubule-binding of Tau region* ou MTBR) et le domaine C-terminal (113). La protéine Tau humaine est codée par le gène *MAPT* situé sur le chromosome 17, qui comprend 16 exons. En raison de l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10, six isoformes de Tau variant de 352 à 441 résidus, contenant deux (2N), un (1N) ou zéro (0N) inserts N-terminaux et quatre (4R) ou trois (3R) domaines MTBR sont exprimées dans le cerveau humain adulte (**Figure 10**). Dans le cerveau humain adulte normal, les isoformes Tau 3R et 4R sont maintenues dans un rapport 1:1. La protéine Tau 4R a une plus grande affinité de liaison avec les microtubules et son expression est accrue dans les régions du cerveau présentant des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) (114).

Les mutations du gène *MAPT* provoquent des tauopathies telles que des démences frontotemporales, mais pas de forme monogénique de la MA (115). Les récentes études d'association pangénomiques ont tout de même identifié des variants de *MAPT* associés à un risque augmenté de développer les formes communes de MA (86).

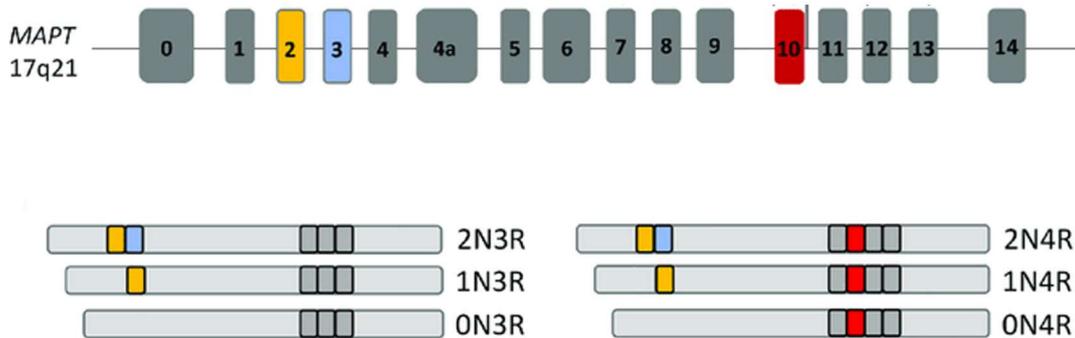


Figure 10 : Épissage alternatif du gène MAPT et différentes isoformes de Tau. Les exons 2,3, et 10 du gène *MAPT* subissent un épissage alternatif qui peut conduire à la production de six isoformes de la protéine Tau. Ces isoformes sont porteuses de deux (2N), un (1N) ou zéro (0N) inserts N-terminaux et quatre (4R) ou trois (3R) domaines de liaison aux microtubules (116).

II) Rôles physiologiques de Tau

La fonction première de Tau est de favoriser la polymérisation et la stabilisation des microtubules dans les parties distales des axones (117). Le réseau de microtubules est responsable du maintien de l'architecture neuronale, et des systèmes de transport axonal qui assurent l'acheminement des constituants cellulaires tels que les organites et les molécules de signalisation vers les synapses. La suppression du gène codant Tau n'induit cependant pas de problème majeur dans le transport axonal, ce qui suggère que d'autres protéines associées à la liaison ou à la régulation des microtubules, telles que MAP1 et MAP2, pourrait compenser le rôle de la protéine Tau (118).

Des études récentes montrent que la protéine Tau est également présente dans les dendrites et les compartiments postsynaptiques, où elle jouerait un rôle dans la régulation de la plasticité synaptique (119). La suppression de la protéine Tau dans divers modèles de souris montre en effet des déficits dans la LTP ou la LTD (120).

D'autres rôles physiologiques supplémentaires de la protéine Tau sont actuellement à l'étude, notamment ses rôles dans la modulation de la signalisation de l'insuline, la régulation de la myélinisation, et la protection de l'ADN contre les dommages induits par la peroxydation (121).

III) Modifications post-traductionnelles de Tau et implication dans la MA

Les différentes fonctions de la protéine Tau sont régulées par des modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination, la glycosylation et le clivage protéolytique.

a. Phosphorylation de Tau

La phosphorylation de la protéine Tau est un processus physiologique qui permet le maintien de l'intégrité des microtubules, et est nécessaire à la régulation du transport axonal (122). Cette phosphorylation physiologique se produit également dans le contexte d'autres processus biologiques tels que le développement neuronal ou l'hibernation (123). Cependant, au cours de l'évolution de la MA, la phosphorylation normale de Tau augmente, et s'étend à d'autres sites. L'hyperphosphorylation conduit à une auto-agrégation de la protéine Tau sous formes de filaments hélicoïdaux appariés (*paired helical filaments* ou PHF), qui constituent une des principales caractéristiques de la MA. Par rapport aux individus sains, les cerveaux des patients atteints de la MA possèdent une quantité multipliée par 4 de protéines Tau hyperphosphorylées (124).

La protéine Tau peut être modifiée par phosphorylation au niveau de multiples résidus de thréonine (Thr, T), de sérine (Ser, S) et de tyrosine (Tyr, Y). L'isoforme la plus longue de Tau comprend quatre-vingt-cinq sites possibles de phosphorylation potentiels (45 Ser, 35 Thr et 5 Tyr) (125). L'ajout d'un groupe phosphate confère une charge négative à la protéine, et le regroupement des sites de phosphorylation induit d'importants effets de charges qui peuvent modifier les interactions moléculaires et la conformation de la protéine Tau (126).

La phosphorylation de la protéine Tau reste néanmoins un phénomène complexe impliquant de multiples sites possibles de phosphorylation. Des études récentes ont par exemple montré qu'un grand nombre des sites de phosphorylation des agrégats de protéine Tau provenant de cerveaux de personnes atteintes de la MA sont également présents au niveau de la protéine Tau soluble fonctionnelle (127). La phosphorylation de Tau sur certains résidus retrouvés comme augmentée dans la MA, peut également avoir des fonctions physiologiques. Par exemple, la phosphorylation de la T18 favorise le trafic axonal normal (128).

Les principaux épitopes phosphorylés spécifiquement associées à la MA sont : pThr231 et pSer202/Thr205, suivis de pSer396/pSer404, pThr181, et pThr217 (**Figure 11**). Ils peuvent respectivement être mis en évidence par les anticorps RZ3, AT8, PHF1, AT270, et phosphoT217 (129).

L'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans les cerveaux atteints de la MA peut résulter d'une augmentation de la phosphorylation par les kinases et/ou d'une diminution de la

déphosphorylation par les phosphatases (130). La phosphorylation de la protéine Tau est régulée par plusieurs types de protéines kinases : des Ser/Thr kinases (telles que CDK5, GSK3 β , MAPK, PKA, PKC, ou AKT) et des tyrosines kinases (telles que FYN et SRC). La protéine Tau est déphosphorylée par la protéine phosphatase 1 (PP1), PP2A, PP2B et PP5, la PP2A étant responsable d'environ 70 % de toutes les activités de déphosphorylation de la protéine Tau dans le cerveau humain (131).

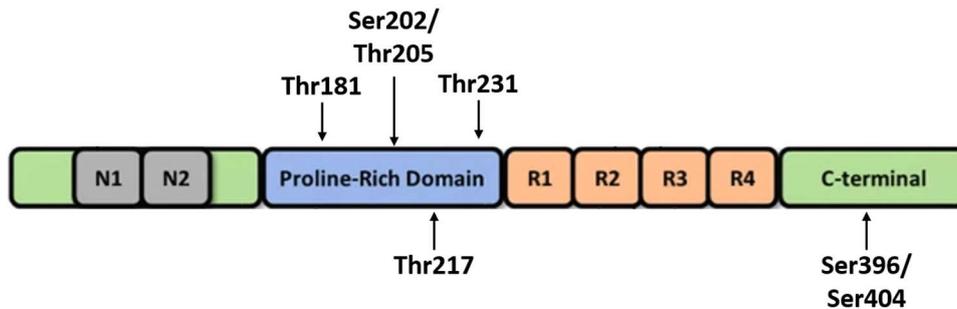


Figure 11 : Principaux épitopes de phosphorylation de Tau spécifiques de la MA. Les sites de phosphorylation Thr181, Ser202/Thr205, Thr217, et Thr231 se situent dans le domaine riche en proline (*Proline Rich Domain*) de la protéine Tau. Le site de phosphorylation Ser396/Ser404 se situe quant à lui dans le domaine C-terminal de la protéine. Tous ces sites de phosphorylation sont spécifiquement associés à la MA (132).

b. Modifications post-traductionnelle des résidus lysines de Tau : acétylation et ubiquitination

Au cours du développement de la MA, des sites d'acétylation et d'ubiquitination deviennent également apparents au niveau des résidus Lysine (Lys) (133) (**Figure 12**). Quarante-quatre résidus Lys peuvent être potentiellement modifiés par acétylation ou ubiquitination dans l'isoforme 2N4R de la protéine Tau. La protéine Tau peut être acétylée par les histones acétyltransférases et désacétylée par SIRT1. Des niveaux accrus de Tau acétylée ont été observés dans le cerveau de patients atteints de la MA à différents stades de la maladie (134). L'acétylation de la protéine Tau bloque sa dégradation, empêche sa liaison aux microtubules et favorise son agrégation (135).

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle très polyvalente qui régule la dégradation des protéines dans le cadre du système ubiquitine-protéasome. Une accumulation de protéines Tau conjuguées à l'ubiquitine a été identifiée au sein des PHF des cerveaux des patients atteints de MA (136). De plus, l'altération de l'activité des protéasomes induite par la liaison des PHF à ces derniers renforce l'accumulation de Tau ubiquitinée dans le cerveau (137).

c. Glycosylation de Tau

Des phénomènes de N- et O- glycosylation ont également été identifiés dans la protéine Tau (**Figure 12**). La N-glycosylation a été détectée dans les PHF de cerveaux de personnes atteintes de la

MA, mais pas dans des cerveaux sains (138). Plusieurs études suggèrent que la protéine Tau N-glycosylée est sujette à la phosphorylation, mais présente une agrégation réduite (139). La O-glycosylation se produit sur les résidus Ser ou Thr et peut entrer en compétition avec la phosphorylation (140). Une diminution des niveaux de Tau O-glcNAcylée a été observée dans le cerveau des personnes atteintes de MA et est inversement corrélée à la phosphorylation de la protéine Tau sur plusieurs sites (141).

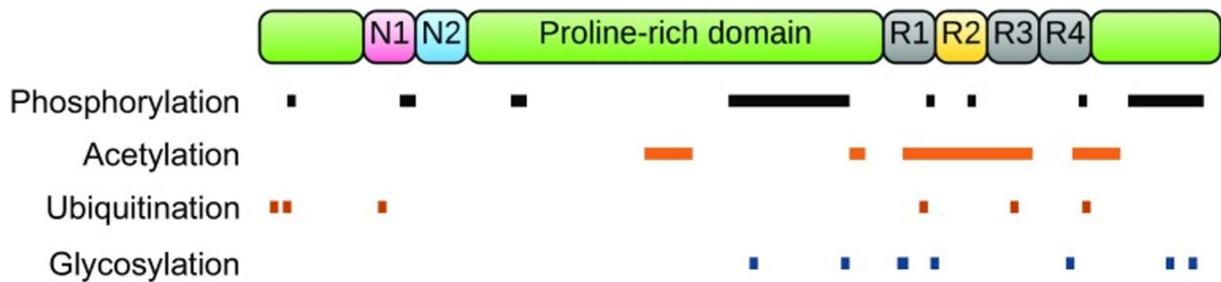


Figure 12 : Illustration des principales modifications post-traductionnelles de la protéine Tau. Les barres de couleur indiquent les sites approximatifs des principales modifications post-traductionnelles de la plus longue isoforme de Tau (2N4R) (142).

d. Clivage protéolytique de Tau

Le clivage protéolytique de la protéine Tau peut conduire à plusieurs espèces de Tau tronquées. Les protéases impliquées comprennent les caspases, les calpaïnes et l'asparagine endopeptidase (AEP). Au moins trois sites spécifiques de clivage de la protéine Tau (N368, E391 et D421) ont été reconnus comme associés à la progression de la MA (143). La Tau tronquée se dissocie des microtubules et favorise son auto-agrégation (144).

Les caspases 2, 3 et 6 peuvent cliver la protéine Tau en Tau-314, Tau-421 et Tau-402. Une augmentation du niveau de ces espèces de Tau tronquée a été décrite dans les cerveaux atteints de MA, associée aux dégénérescences neurofibrillaires (145). Les calpaïnes 1 et 2 sont des protéases dépendantes du calcium qui sont abondamment exprimées dans le système nerveux central, et une activité accrue des calpaïnes a été identifiée dans des échantillons de cerveaux porteurs de MA (146). L'AEP, également connue sous le nom de δ -sécrétase, est une protéase à cystéine spécifique de l'asparagine. L'isoforme tronquée de la protéine Tau générée par le clivage de l'AEP présente une altération de l'assemblage des microtubules et une propension accrue à former des PHF *in vitro* (147).

IV) Mécanismes de pathogénicité de Tau

a. Agrégation de Tau

La pathologie Tau dans le cadre de la MA est provoquée par l'accumulation d'agrégats de Tau. La protéine Tau monomérique est très soluble et désordonnée sur le plan biochimique lorsqu'elle est dépourvue d'une structure secondaire bien définie (148). Dans certaines conditions, la protéine Tau monomérique peut s'agréger en oligomères, en fibrilles, en filaments et finalement en dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Les DNF sont des agrégats fibrillaires intraneuronaux contenant des PHF de protéines Tau hyperphosphorylées (149). Le nombre de DNF est positivement associé à la sévérité de la démence chez les patients atteints de MA.

L'agrégation de la protéine Tau peut être favorisée par les modifications post-traductionnelles aberrantes, et dans ce cadre, l'hyperphosphorylation est considérée comme le principal déclencheur de cette agrégation (150). L'épissage alternatif de l'exon 10 de la protéine Tau et le rapport 4R-Tau/3R-Tau sont également importants pour prévenir une fibrillation anormale (151). Étant donné que la protéine Tau se lie aux microtubules par l'intermédiaire de la région MTBR, les isoformes 4R de la protéine Tau ont une plus grande propension à favoriser l'assemblage des microtubules que les isoformes 3R de la protéine Tau (113). Le clivage protéolytique influence également l'agrégation de la protéine Tau, les formes tronquées s'agrégeant plus facilement entre-elles.

b. Propagation de Tau

Lors de l'apparition de la MA, les NFT apparaissent d'abord dans la couche II du cortex entorhinal, puis dans les régions anatomiques interconnectées du cerveau, notamment l'hippocampe et le néocortex (152). La distribution spatio-temporelle de la pathologie Tau est en étroite corrélation avec le déclin cognitif chez les patients atteints de la MA (**Figure 9b**).

La propagation de Tau au sein de ces différentes zones du cerveau peut s'expliquer par une transmission antérograde. Cette hypothèse est étayée par le fait que l'accumulation de Tau phosphorylée dans les neurones est d'abord limitée aux dendrites et au cytoplasme avant d'être visualisé dans la région axonale de ces mêmes neurones.

De nombreux chercheurs considèrent aujourd'hui que la diffusion des agrégats de Tau observés dans la MA résulte d'une propagation physique de type prion à travers le mouvement trans-synaptique de la protéine Tau agrégée. Ce mécanisme de propagation a été proposé pour la première fois en 2009 (153). Depuis lors, plusieurs études ont suggéré que les agrégats de Tau, lorsqu'ils sont administrés par voie extracellulaire, peuvent engendrer la formation de nouveaux agrégats, qui se propagent ensuite à d'autres cellules. Des fibrilles de Tau synthétiques ou encore des extraits de

cerveaux de patients atteints de tauopathie injectés dans le cerveau de souris se sont avérés suffisants pour induire une propagation pathologique de Tau à des sites éloignés du site d'injection (154).

Une telle propagation physique de la protéine Tau doit comporter au moins quatre étapes : 1) la libération de Tau cytoplasmique à partir d'un neurone donneur ; 2) l'agrégation de Tau avant ou après sa libération ; 3) l'absorption dans certains neurones receveurs et 4) l'induction de l'agrégation de Tau cytoplasmique à l'intérieur des neurones receveurs (106).

Dans des conditions normales, la plupart des protéines Tau sont sécrétées sous une forme libre et monomérique, et leur libération peut être médiée par des vésicules telles que les exosomes. Les niveaux de Tau associés aux exosomes sont cependant plus élevés dans le LCR et le sang des patients atteints de la MA que chez les témoins sains (155). La protéine Tau est présente dans les compartiments pré- et postsynaptiques et l'activité neuronale favoriserait la libération physiologique et pathologique de la protéine (156). Après avoir été libérée des cellules donneuses, la protéine Tau peut pénétrer dans les cellules receveuses par micropinocytose, endocytose ou phagocytose (157). Une fois internalisée, les agrégats de Tau exogènes interagissent avec la Tau endogène et induisent son agrégation.

c. Toxicité de Tau

De nombreuses espèces de protéine Tau, telles que la protéine Tau porteuse de modifications post-traductionnelles aberrantes, les oligomères solubles, et les fibrilles, se sont révélées neurotoxiques.

Les modes potentiels de toxicité étudiés à ce jour comprennent la perturbation du transport axonal et divers défauts synaptiques. L'hyperphosphorylation ou la troncation de Tau peut empêcher sa liaison à la tubuline et déstabiliser les microtubules, ce qui entraîne une altération de l'intégrité du cytosquelette et entrave le transport axonal. Ces modifications post-traductionnelles aberrantes peuvent notamment endommager le transport des mitochondries vers les synapses et nuire à la viabilité des neurones (158).

Il a été démontré que, dans les cerveaux atteints de MA, la protéine Tau se distribue dans les compartiments pré- et postsynaptiques, où elle entraîne une perte et un dysfonctionnement synaptique. On observe par exemple une réduction de la densité des épines dendritiques et une altération de la LTP chez les souris transgéniques Tau (159). La protéine Tau peut également interagir avec la protéine présynaptique synaptogyrine-3, qui joue un rôle dans le regroupement des vésicules synaptiques (160).

Enfin, les espèces pathogènes de Tau peuvent activer la microglie et les astrocytes indépendamment de la pathologie amyloïde. L'activation microgliale par Tau augmente la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α et favorise la neurodégénérescence (161). L'accumulation de Tau dans les astrocytes altère la fonction astrocytaire, entraîne la dégénérescence neuronale et favorise la mort cellulaire. Elle altère également le transport du glutamate médié par les astrocytes et entraîne une accumulation pathologique de glutamate dans le cerveau (162).

V) Les thérapeutiques anti-Tau

Une alternative thérapeutique à l'immunothérapie anti-amyloïde consisterait à interférer avec la synthèse, l'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine Tau. Plusieurs composés sont actuellement en cours de développement clinique.

a. Inhibition de l'expression de Tau par oligonucléotides antisens (ASO)

L'inhibition de l'expression de la protéine Tau pourrait constituer une approche prometteuse pour le traitement de la MA. En effet, chez la souris, la diminution des niveaux de Tau endogène a des effets protecteurs contre l'altération des fonctions cognitives induite par les peptides A β , et n'induit que peu d'effets secondaires (163). Les oligonucléotides antisens (*Anti-Sens Oligonucleotides* ou ASO), dont la sécurité et l'efficacité ont été démontrées lors d'essais cliniques dans d'autres indications thérapeutiques, sont des molécules synthétiques courtes, conçues pour cibler et dégrader l'ARNm. Les ASO ciblant l'expression du gène MAPT entraînent une diminution des niveaux de protéine Tau, de la perte neuronale et de la pathologie neurofibrillaire dans des modèles de souris transgéniques (118). En plus de limiter la formation de pathologie Tau supplémentaire, ils ont également éliminé les DNF préexistantes. Plus récemment, l'essai clinique de phase I de l'ASO anti-MAPT développé par Biogen montre une réduction dose-dépendante de la protéine Tau totale et phosphorylée dans le LCR des personnes traitées, ainsi qu'une diminution de la pathologie Tau cérébrale visualisée par TEP (164).

b. Inhibition de l'hyperphosphorylation de Tau par des molécules inhibitrices des kinases

Une autre approche thérapeutique consiste à inhiber l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. Plusieurs petites molécules inhibitrices des kinases de Tau ont ainsi été développées, ciblant notamment GSK3 β ou les Tyrosine kinases FYN et SRC.

L'administration chez la souris de Tideglusib, un inhibiteur de la GSK3 β , entraîne notamment une diminution du niveau de phosphorylation de la protéine Tau et du dépôt d'A β , et améliore les fonctions mnésiques (165). Cependant, malgré ces résultats encourageants dans des modèles animaux, le fait que GSK3 β soit exprimée de manière ubiquitaire et soit impliquée dans de nombreux autres

processus cellulaires soulève des inquiétudes en matière de toxicité. Les premiers essais cliniques de phase I des inhibiteurs de GSK3 β (l'AZD2558 et l'AZD1080) ont montré un nombre d'effets secondaires importants et ont dû être interrompus précocement (166). D'autres molécules sont actuellement à l'étude, comme le Lithium, déjà approuvé dans le traitement des troubles bipolaires, un inhibiteur non-spécifique de GSK3 β qui réduit tout de même son activité de 25% (167). Les études cliniques suggèrent que le traitement par lithium permettrait d'améliorer les performances cognitives chez les patients atteints de MA (168).

La première molécule inhibitrice des Tyrosine kinases FYN et SRC à avoir été testée pour le traitement de la MA est le saracatinib. Ce composé a été développé à l'origine par Astra Zeneca comme traitement de divers troubles oncologiques. Malgré des résultats prometteurs dans les études précliniques et un profil de sécurité favorable, les études cliniques ont été arrêtées en phase II en raison d'un manque d'efficacité (169). Néanmoins, une étude clinique de phase III a récemment montré qu'un autre inhibiteur des Tyrosine kinases, le masitinib, était efficace pour réduire les troubles cognitifs chez les personnes atteintes de MA (170).

c. Inhibition de l'agrégation de Tau

D'autres approches cherchent quant à elles à inhiber l'agrégation toxique de la protéine Tau. À ce jour, la plupart des composés anti-agrégation sont des dérivés du bleu de méthylène et ont été reconnus comme capables de perturber les enchevêtrements de Tau et de réduire les déficits cognitifs chez les souris transgéniques (171). Cependant, ces composés ont tous échoué dans les essais cliniques de phase III pour la MA. Ces petites molécules qui bloquent l'agrégation de la protéine Tau sont connues pour interagir avec une large gamme d'autres protéines et de voies biochimiques, ce qui complique grandement leur utilisation thérapeutique (172).

d. Anticorps monoclonaux anti-Tau : immunothérapie passive et active

À ce jour, la méthode la plus prometteuse pour cibler la protéine Tau reste l'immunothérapie passive ou active au moyen d'anticorps contre les peptides Tau ou Tau phosphorylés.

Les anticorps thérapeutiques visent à neutraliser ou à éliminer la protéine Tau extracellulaire afin de ralentir la progression du dysfonctionnement neuronal et de la neurodégénérescence. De multiples cibles sont à l'étude, allant des anticorps pan-Tau (ciblant les six isoformes) aux anticorps dirigés contre des conformations spécifiques ou des espèces uniques de Tau. Les anticorps anti-Tau diffèrent également en ce qui concerne leur site de liaison sur Tau (121). L'anticorps monoclonal le plus avancé pour le traitement de la MA est le semorinemab, mais l'essai clinique de phase II n'a pas permis de montrer une efficacité suffisante de ce dernier dans le traitement de la MA (173).

Les vaccins actifs contre la protéine Tau, tout comme les anticorps passifs anti-Tau, ciblent différentes régions de la protéine Tau. Dans les études précliniques, de nombreux vaccins anti-Tau ont démontré leur capacité à réduire la pathologie Tau, et certains d'entre eux entraînaient une amélioration de la cognition ou des capacités motrices chez l'animal (174). Seuls deux vaccins anti-Tau actifs ont commencé à faire l'objet d'essais cliniques : le vaccin AADvac1 (Axon Neuroscience SE), et le vaccin ACI-35 (AC Immune SA, Janssen). Les essais cliniques de phase II de l'AADvac1 se sont terminés en 2019 et ont évalué la sécurité, la tolérance et l'efficacité à long terme chez les patients atteints de MA. L'AADvac1 s'est avéré sûr et bien toléré, mais n'a pas permis d'améliorer les troubles cognitifs (175). L'ACI-35 ne suscitait quant à lui qu'une faible réponse immunitaire lors des premiers essais cliniques, mais une formulation améliorée du vaccin, l'ACI-35.030, a été conçue, et les essais cliniques de phase IB/IIA montrent des titres élevés et des anticorps spécifiques de la protéine Tau phosphorylée et de la protéine Tau agrégée. L'évaluation du bénéfice de ce vaccin sur le déclin cognitif est actuellement en cours d'évaluation (176).

VI) Interaction entre pathologie amyloïde et pathologie Tau

L'étude des formes monogéniques précoces de MA a conduit à l'élaboration de l'hypothèse de la cascade amyloïde. Le fait que les dépôts amyloïdes soient retrouvés dans les cerveaux des patients avant même l'apparition des symptômes cliniques renforce également l'idée que l'accumulation d'A β dans le cerveau serait en amont des autres altérations comme l'apparition des DNF et de la déficience cognitive (88).

Les modèles animaux soutiennent également l'hypothèse selon laquelle la MA constituerait une forme de tauopathie induite par l'A β . Le modèle de souris triple transgénique (3xTg-AD) présente une accumulation extracellulaire croissante d'A β dans le néocortex et l'hippocampe avant l'apparition des DNF liées à Tau, et l'immunothérapie anti-A β est capable de réduire l'accumulation de Tau dans ces modèles (177). De plus, les cellules exprimant les mutations des gènes *APP* et *PSEN1* présentent des niveaux élevés de Tau hyperphosphorylée à la fois dans le soma et dans les neurites (178). Enfin, le traitement par A β de neurones humains induit une dystrophie neuritique et une hyperphosphorylation de la protéine Tau au niveau d'épitopes pertinents pour la MA (179).

Plusieurs rapports suggèrent que l'A β pourrait potentiellement conduire à l'apparition de la pathologie Tau par l'activation de kinases spécifiques. Les peptides A β peuvent notamment induire une hyperphosphorylation de Tau par l'activation de GSK3 β (180). Le blocage de la kinase de Tau CDK5 a également montré des effets protecteurs contre la toxicité de l'A β sur les neurones de cultures primaires de rats (181).

Pour autant, les nombreux échecs et la faible efficacité des thérapeutiques anti-amyloïde a amené certains chercheurs à remettre en cause l'hypothèse amyloïde, du moins dans la manière dont elle est actuellement formulée (109). En effet, si la MA correspondait à un modèle linéaire de cascade amyloïde, le traitement au stade préclinique interromprait le processus de la maladie et préviendrait les manifestations cliniques, tandis que le traitement au stade symptomatique devrait au moins arrêter la détérioration clinique.

De plus, il existe des données expérimentales qui ne soutiennent pas cette hypothèse. Entre autres, les souris transgéniques *App* mutantes ne développent pas de pathologie Tau ou de DNF (182). En effet, chez les souris transgéniques, un minimum de pathologie Tau préexistante est nécessaire pour promouvoir une pathologie Tau accélérée par l'A β . De plus, chez l'homme, les peptides A β et Tau se déposent initialement dans des régions cérébrales différentes et ne se chevauchent que très peu (61).

Les différentes thérapeutiques ciblant la pathologie amyloïde ou la pathologie Tau représentent un espoir dans le traitement de la MA, mais, malgré les efforts de recherche, l'efficacité de ces traitements dans la diminution des troubles cognitifs chez les malades reste limitée. Ces échecs amènent à penser que les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires ne représenteraient finalement pas les cibles thérapeutiques idéales dans le traitement de la MA, et amènent les scientifiques à explorer d'autres caractéristiques pathologiques plus précoces de la maladie. La dysfonction synaptique, qui précède notamment l'apparition de la perte neuronale et des signes cliniques de la maladie (183), pourrait représenter un élément essentiel dans la pathogénie de la MA.

PARTIE 5 : LA PERTE SYNAPTIQUE ASSOCIEE A LA MALADIE D'ALZHEIMER

I) Physiologie synaptique

Les synapses sont des éléments dynamiques qui peuvent être modulés en nombre, structure, et fonctions, de manière à renforcer ou à diminuer les contacts synaptiques et la neurotransmission. Dans la MA, la perte de densité synaptique précède la dégénérescence neuronale, ce qui suggère que l'altération des mécanismes de plasticité synaptique pourrait jouer un rôle clé dans la pathogenèse de la maladie (184). Cette capacité plastique des neurones est un des éléments essentiels dans les processus de mémorisation et d'apprentissage comme la LTP (Potentialisation à long-terme ou *Long Term Potentialisation*) et LTD (Dépression à long-terme ou *Long Term Depression*). La grande majorité des synapses qui présentent une LTP et une LTD sont glutamatergiques, et les formes les plus étudiées de LTP et de LTD sont déclenchées par l'activation synaptique du récepteur NMDAR.

a. Induction de la LTP

La LTP est induite par une stimulation électrique à haute fréquence et est principalement médiée par l'activation des récepteurs NMDAR post-synaptiques des épines dendritiques (**Figure 13**) (185). L'induction de la LTP est induite par libération présynaptique de glutamate, qui se lie aux récepteurs ionotropiques NMDAR et AMPAR. En conditions basales, le canal du NMDAR est bloqué par la présence d'un ion Mg^{2+} , et la fixation du glutamate seule ne suffit pas à entraîner le passage des ions à travers ce canal. L'activation des récepteurs AMPAR par le glutamate permet une dépolarisation de la membrane qui supprime le blocage des ions Mg^{2+} et entraîne un influx post-synaptique de Ca^{2+} à travers les récepteurs NMDAR. L'entrée de Ca^{2+} entraîne l'activation de la Calmoduline (CaM), qui à son tour active la protéine kinase II Ca^{2+} /calmoduline-dépendant (CaMKII). Dans son état basal, la CaMKII est liée à l'actine filamenteuse, mais son activation par la LTP entraîne son détachement qui permet à d'autres protéines de liaison à l'actine, telles que la cofiline, de remodeler les filaments (186). Des études montrent que les tissus cérébraux de patients atteints de MA présentent des niveaux élevés de cofiline-1 inactive (187). La CaMKII phosphoryle également l'AMPAR et renforce son expression au niveau post-synaptique.

b. Maintien de la LTP

Le maintien de la LTP implique quant à lui une régulation dépendante de l'activité de la transcription de l'ARNm et de l'expression locale de certaines protéines synaptiques. L'activation de la CaMKIV et des protéines kinases ERK 1 et ERK2 sont notamment capable d'induire la phosphorylation de CREB, qui agit comme facteur de transcription. CREB module ainsi l'expression de protéines synaptiques, parmi lesquelles la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPAR et la protéine CaMKII, et

permet d'entretenir la LTP (188). L'activation de CREB stimule également la synthèse de BDNF qui induit l'activation de son récepteur TrkB, et stabilise la croissance et la maturation des épines dendritiques en régulant les GTPases de la famille Rho (189).

c. LTD

Contrairement à la LTP, la LTD est induite par une stimulation à basse fréquence et une plus faible entrée de Ca^{2+} (190). Son rôle dans l'apprentissage n'est toutefois pas encore aussi clairement élucidé que pour la LTP. Dans le cas de la LTD, l'activation des récepteurs NMDAR active la protéine phosphatase 1 (PP1) et 2B (PP2B ou calcineurine). La calcineurine déphosphoryle la sous-unité GluA1 des récepteurs AMPAR et favorise leur internalisation. Elle médie également l'activation de la caspase-3 qui contribue à diminuer l'expression des récepteurs AMPAR à la membrane post-synaptique et induit un rétrécissement des épines dendritiques (191). La PP1 entraîne quant à elle la déphosphorylation et donc l'activation de la GSK3 β qui conduit à l'internalisation des récepteurs NMDAR (192).

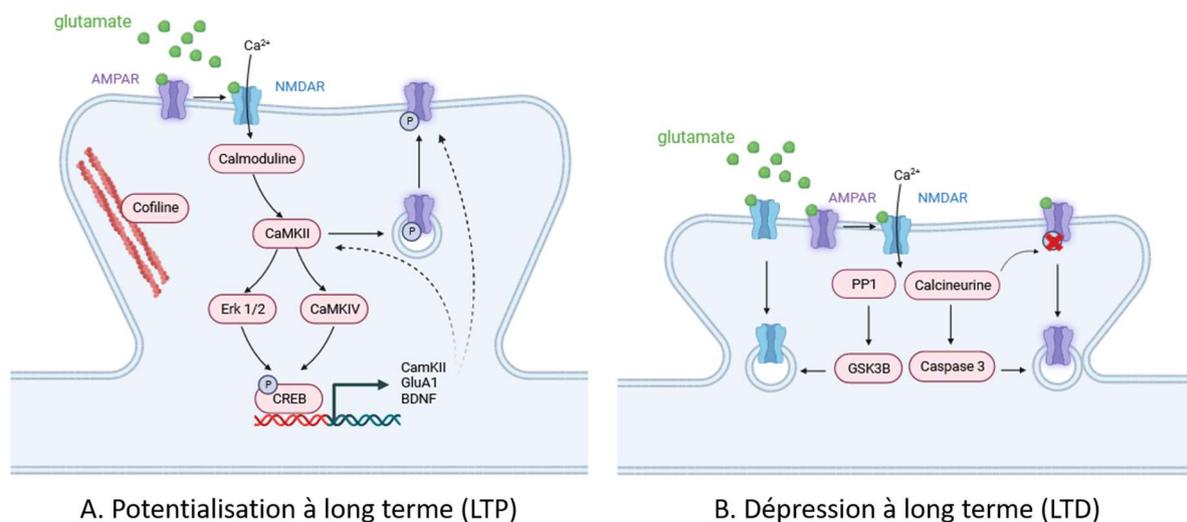


Figure 13 : A. Induction et maintien de la LTP. Le glutamate libéré dans la fente synaptique se fixe aux récepteurs NMDAR et AMPAR. L'activation des AMPAR permet ainsi la levée du bloc Mg^{2+} et l'influx de calcium à travers les NMDAR, ce qui conduit à l'activation de la voie calmoduline et de la CaMKII. La CaMKII permet la phosphorylation et l'augmentation de l'expression des récepteurs AMPAR à la membrane. Le détachement de la CaMKII de l'actine filamenteuse permet l'accès à la cofiline qui entraîne le remodelage des filaments d'actine. La CaMKII active les protéines ERK1, ERK2, et CaMKIV qui phosphorylent CREB et permettent la transduction des gènes codants CaMKII, GluA1, et BDNF. **B. Induction de la LTD.** L'entrée de calcium par les récepteurs NMDAR entraîne l'activation de la PP1 et de la calcineurine. La PP1 est impliquée dans l'internalisation des récepteurs NMDAR via l'activation de la GSK3 β . La calcineurine est impliquée dans l'internalisation des récepteurs AMPAR via leur déphosphorylation et l'activation des caspases-3.

d. Corrélation entre LTP fonctionnelle et LTP structurelle

L'induction de la LTP entraîne une augmentation marquée de la densité des épines dendritiques ainsi que la formation de nouvelles synapses matures et probablement actives (193). La LTD entraîne quant à elle une nette réduction de la densité et de la taille des épines dans la zone CA1 de l'hippocampe (194). Le volume des épines est positivement corrélé avec la surface de la densité post-synaptique, avec le nombre de récepteurs à la surface (en particulier des récepteurs AMPAR) et avec le nombre de vésicules présynaptiques (195). Ainsi, la structure de l'épine dendritique est étroitement liée à sa fonction synaptique.

II) Perte synaptique associée à la MA

La synapse est considérée comme une cible critique dans la MA, et les anomalies synaptiques sont en corrélation avec la gravité de la neuropathologie et de la perte mnésique chez les personnes atteintes de la MA (196).

a. La perte synaptique est corrélée avec le déclin cognitif

Dès 1990, de premières études de biopsies du lobe frontal de patients atteints de MA légère à modérée ont révélé que le nombre de synapses était significativement réduit par rapport aux biopsies des cerveaux sains de même âge (197). Il existait également chez ces personnes une corrélation significative entre le nombre de synapses et les résultats du *Mini-Mental State Examination*, des scores plus faibles étant associés à une plus grande perte de synapses. D'autres études *post-mortem* ont ensuite confirmé qu'il existait une corrélation très forte entre les résultats aux tests psychométriques et la densité des synapses néocorticales, et que la perte synaptique était plus associée au déclin cognitif que peuvent l'être les pathologies Tau ou amyloïde (198–200). On retrouve également une importante corrélation entre les niveaux de la protéine pré-synaptique synaptophysine dans l'hippocampe et les symptômes cognitifs des patients (201).

b. La perte synaptique est un événement précoce de la MA

La perte synaptique est un événement précoce de la MA, et a lieu dès la phase pré-clinique durant laquelle les malades commencent à présenter des signes de déclin cognitifs (202). Des études morphométriques de biopsies de cortex frontaux réalisées entre 2 et 4 ans après l'apparition des symptômes de la MA montrent une diminution de 25 à 35% de la densité de synapses (203). L'immunomarquage de la synaptophysine est également diminué de 25% dans le cortex des patients atteints de formes légères ou très légères de MA, par rapport à des sujets du même âge avec des fonctions mnésiques intactes (204).

c. Altération de l'expression des protéines synaptiques dans la MA

Avant même la perte des synapses, plusieurs éléments suggèrent que celles-ci avaient déjà subi des altérations, et on retrouve des modifications d'expression de plusieurs protéines synaptiques dans le cerveau et le LCR des personnes atteintes de MA (205). Entre autres, l'analyse de cerveaux *post-mortem* montre une expression diminuée des transporteurs et des récepteurs glutamatergiques, en particulier des récepteurs NMDAR et AMPAR. On retrouve également des modifications des concentrations de plusieurs marqueurs pré-synaptiques comme SNAP25 et GAP43 ou post-synaptiques comme la neurogranine dans le LCR des patients atteints de MA (206). Enfin, une récente étude a montré que les concentrations dans le LCR de malades en phase préclinique d'un groupe de 6 protéines synaptiques (Calsyntenin-1, GluR4, Neurexin-2A, Neurexin-3A, Syntaxin-1B et Thy-1) étaient réduites de 20%, et que ces changements précédaient les symptômes cliniques et les marqueurs de neurodégénérescence (207).

d. Altération morphologique des synapses dans la MA

En plus des modifications de l'expression des protéines synaptiques, les études *post-mortem* de cerveaux de patients montrent des modifications morphologiques des synapses. La diminution du nombre de synapses est associée à un élargissement de celles-ci : les synapses restantes dans les zones de perte synaptique semblent de taille plus importante (208). Les synapses de l'hippocampe des cerveaux atteints sont également plus fréquemment impliquées dans des boutons multisynaptiques (209). Ces modifications de taille et/ou de connectivité des synapses dans les zones les plus atteintes du cerveau pourraient représenter des mécanismes compensatoires de la perte synaptique.

Pendant longtemps on a pensé que seules les synapses excitatrices étaient altérées dans le cas de la MA, mais des études montrent désormais que des modifications plus subtiles sont retrouvées dans les synapses inhibitrices (210). Des études ont notamment montré une diminution de l'expression des récepteurs GABAergiques dans le gyrus temporal de cerveaux atteints par la maladie (211).

Bien que les causes de la perte synaptique dans la MA ne soient pas encore complètement élucidées, de nombreuses données provenant du cerveau humain et de modèles animaux de la maladie indiquent un rôle synaptotoxique des oligomères A β et de la protéine Tau.

III) Synaptotoxicité de la pathologie amyloïde

a. Liens entre pathologie amyloïde et dysfonction synaptique

Dans les modèles de souris exprimant les mutations du gène *App* responsables des formes précoces de MA, les plaques amyloïdes sont associées à une perte des synapses (99,212), mais également à un défaut de plasticité synaptique, et à une perte de la mémoire (213,214). A proximité

des plaques amyloïdes, on observe différentes modifications structurales des synapses telles qu'une diminution d'éléments pré-synaptiques (215), ou une diminution du nombre d'épines dendritiques (216). Les modèles animaux transgéniques porteurs de mutations du gène *App* présentent également une hyperactivité et une hyperexcitabilité neuronale, ainsi qu'un déficit de la LTP (217,218). Dans certains modèles transgéniques *App*, les altérations synaptiques sont retrouvées à un jeune âge, avant même l'apparition des plaques amyloïdes (219).

De plus en plus de preuves suggèrent un rôle physiologique de l'APP qui agirait comme une molécule d'adhésion synaptique nécessaire à une morphologie et une plasticité synaptique normales (220). Les neurones corticaux ou hippocampiques porteurs d'une délétion homozygote du gène *App* présentent notamment des densités d'épines dendritiques plus faibles que les neurones contrôles (221). Dans ce contexte, une modification du clivage de l'APP, tel qu'observé dans le cadre de la MA, pourrait altérer sa fonction sur la plasticité synaptique.

La toxicité de la pathologie amyloïde serait tout de même principalement due aux espèces oligomériques neurotoxiques. L'exposition de culture de neurones hippocampiques aux oligomères d'A β induit des modifications de la forme et de la taille de synapses, ainsi qu'une rapide diminution de l'expression membranaire des récepteurs NMDAR (222). Ces oligomères d'A β ont pu être visualisés au sein du compartiment post-synaptique, à la fois chez l'humain et dans les modèles transgéniques, à travers l'utilisation d'imagerie haute-résolution (223).

b. Mécanismes moléculaires de la synaptotoxicité du peptides A β

Les oligomères A β sont capables d'interagir avec plusieurs récepteurs au niveau post-synaptique, notamment les récepteurs NMDAR (224,225) (**Figure 14**). L'activation par les oligomères A β de ces récepteurs entraîne un influx excessif d'ions calcium et déclenche l'internalisation des NMDAR et des AMPAR, facilitant ainsi la LTD et la perte des épines dendritiques (226,227). De plus, les oligomères A β contribuent à la déstabilisation de la protéine adaptatrice post-synaptique PSD95, qui joue un rôle important dans la stabilisation des AMPAR et NMDAR au niveau des synapses (228).

Les oligomères A β causent également des altérations de la morphologie synaptique en interférant avec les modulateurs de l'actine. Le traitement de neurones hippocampiques de rats par des fibrilles d'A β augmente de manière significative les concentrations de cofiline, entraînant ainsi une modification du cytosquelette d'actine, et une dégénérescence des synapses (229).

Ces mécanismes médiés par les oligomères d'A β pourraient expliquer pourquoi on observe une perturbation des fonctions neuronales avant même l'apparition des plaques amyloïdes dans les modèles de souris transgéniques pour l'*App*.

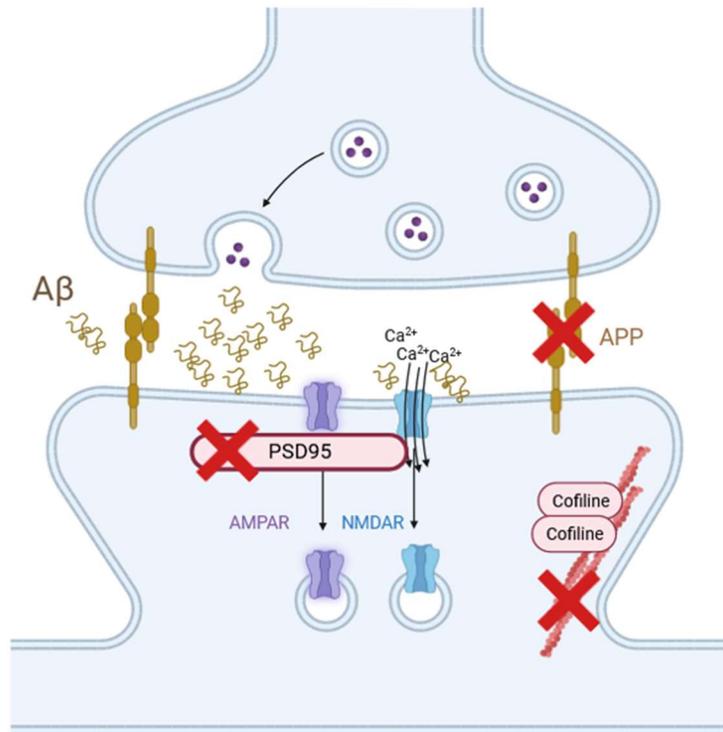


Figure 14 : Synaptotoxicité des oligomères Aβ. La modulation du métabolisme de l'APP altère son rôle physiologique dans le maintien de la structure des synapses. Au niveau post-synaptique, les oligomères Aβ stimulent les récepteurs NMDAR, entraînant un influx massif de calcium et une déstabilisation des PSD95, ce qui conduit à l'internalisation des AMPAR et des NMDAR. L'Aβ entraîne l'augmentation de l'expression de la cofiline qui va remodeler les filaments d'actine, et entraîner la perte des épines dendritiques.

IV) Synaptotoxicité de la pathologie Tau

L'autre lésion pathologique définissant la MA et jouant un rôle toxique à la synapse est l'agrégation de protéines Tau hyperphosphorylées sous forme de DNF.

a. Liens entre pathologie Tau et dysfonction synaptique

Les modèles de souris surexprimant la protéine Tau humaine présentent une diminution de l'expression des protéines synaptiques ainsi qu'une perte précoce des synapses (230). La pathologie Tau altère aussi la stabilité des synapses, et les modèles de souris transgéniques Tau présentent des aberrations de la morphologie des axones et des épines dendritiques (231). Ces modifications synaptiques entraînent une perturbation de la LTP et un déficit cognitif chez la souris transgénique Tau (159). Enfin, dans les cerveaux des patients atteints de MA, on retrouve une importante corrélation

entre la réduction de l'expression de protéines synaptiques et la présence de formes phosphorylées de la protéine Tau (232).

En condition physiologique, la protéine Tau est principalement localisée dans les axones, mais dans le cas de la MA, les agrégats de protéines Tau phosphorylées sont retrouvés dans les compartiments pré- et post synaptiques des neurones (233) (**Figure 15**). La protéine Tau est essentielle à la régulation du transport axonal, et la perte des fonctions physiologiques de Tau liées à son agrégation et sa relocalisation pourrait contribuer à la perte synaptique, notamment en empêchant le transport axonal des mitochondries aux synapses (234).

De la même manière que pour les oligomères d'A β , les oligomères de Tau sont considérés comme l'espèce la plus synaptotoxique. Le traitement par les oligomères de Tau, mais pas par les monomères, entraîne une diminution du nombre de synapses dans un modèle de neurones humains dérivés d'iPSCs, ainsi qu'une diminution de la LTP dans des coupes hippocampiques de souris (235,236).

b. Mécanismes moléculaires de la synaptotoxicité de Tau

Tau est notamment capable d'interagir avec la kinase FYN afin de faciliter son maintien à la membrane synaptique, où elle régule la fonction des récepteurs NMDAR par phosphorylation (237). L'interaction Tau-FYN est dépendante de la phosphorylation de Tau, et pourrait donc être altérée par la phosphorylation aberrante de Tau retrouvée dans la MA (238).

La phosphorylation anormale de la protéine Tau peut également affecter la localisation des récepteurs post-synaptiques. En effet, les neurones cultivés à partir de souris exprimant la protéine Tau P301L présentent une localisation aberrante des sous-unités des NMDAR (GluA1, GluA2/3, NR1) dans les épines dendritiques (239). On retrouve également un impact des différentes formes phosphorylées de la protéine Tau sur l'activité des récepteurs AMPAR (240).

Enfin, la présence de Tau à la pré-synapse entraîne une perturbation du relargage des neurotransmetteurs (241). En effet, Tau serait capable de se lier aux vésicules synaptiques, induisant ainsi une augmentation de la concentration en calcium cytosolique qui conduirait à une dysfonction de la transmission synaptique (242).

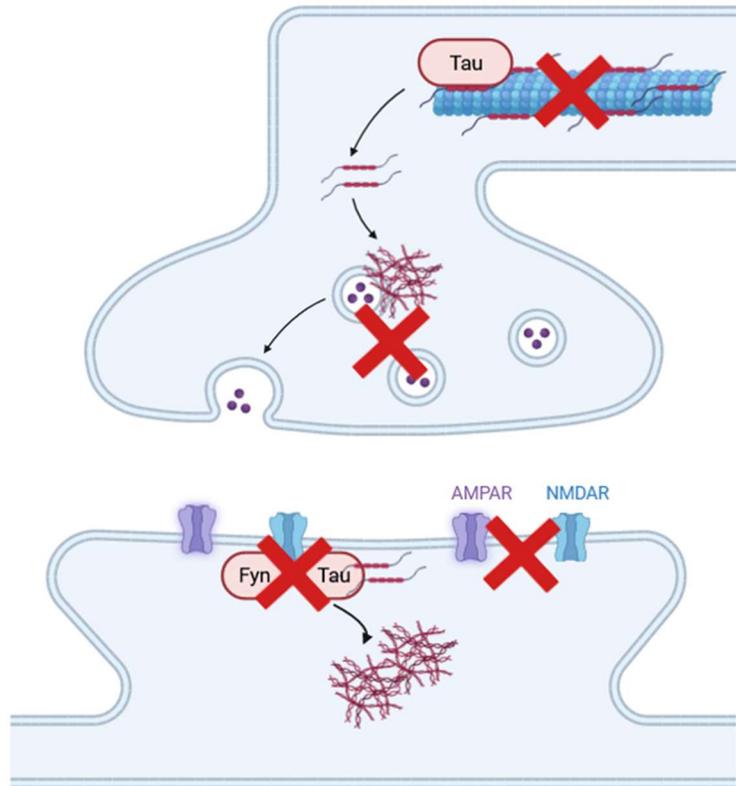


Figure 15 : Synaptotoxicité de Tau. La phosphorylation et l'agrégation de la protéine Tau perturbe son rôle physiologique dans la stabilité des microtubules et le transport axonal. Au niveau pré-synaptique, les agrégats de Tau hyperphosphorylés interagissent avec les vésicules et empêchent le relargage des neurotransmetteurs. Au niveau post-synaptique, l'agrégation de la protéine Tau abolit son interaction avec la protéine FYN régulatrice des NMDAR. La phosphorylation anormale de la protéine Tau affecte la localisation et l'activité des récepteurs AMPAR et NMDAR.

Ainsi, les deux principales caractéristiques pathologiques de la MA que sont les agrégats de peptides amyloïdes et de protéines Tau hyperphosphorylées ont un important rôle dans le dysfonctionnement et la perte de synapses associées à la MA. Pour autant, les mécanismes de leurs neurotoxicité sont complexes et restent encore mal compris. Compte tenu de la forte composante génétique de La MA (243), y compris dans les formes sporadiques d'apparition tardive, l'identification des déterminants génétiques associée au risque de maladie pourrait aider à l'élucidation des mécanismes moléculaires à l'origine de la pathologie.

PARTIE 6 : ETUDE DES DETERMINANTS GENETIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

I) Arguments en faveur d'un rôle important des facteurs génétiques dans l'étiologie de la MA

Sur le plan génétique, on distingue les formes monogéniques à transmission autosomique dominante causées par des variations rares des gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2* et les formes sporadiques résultant de l'interaction entre facteurs de susceptibilité génétiques et environnementaux, ces dernières représentant plus de 99% des cas. La part de la composante génétique dans le développement de ces formes multifactorielles est néanmoins importante. Plusieurs études ont visé à estimer la part de risque de forme sporadique MA attribuable aux facteurs de risque génétiques. Il a ainsi été montré que les apparentés du premier degré de patients atteints de la MA présenteraient un risque plus que doublé de développer la maladie par rapport aux individus partageant le même environnement, indiquant qu'une histoire familiale de MA constitue un facteur de risque (244). De plus, une grande étude de jumeaux a estimé l'héritabilité de la MA entre 58 et 79% (243). Dans ce contexte, de nombreuses études d'association, visant à comparer la fréquence de variations génétiques entre un échantillon de patients et un échantillon d'individus indemnes de la maladie, ont été réalisées dans le but d'identifier les déterminants génétiques de la MA, et *in fine*, les mécanismes physiopathologiques à l'origine de son développement.

II) Etudes d'association par approche gène-candidat

Le principe des études d'association par stratégie gène-candidat repose sur la sélection de variations dans un gène d'intérêt dit candidat, sur la base d'hypothèses physiopathologiques fortes le reliant à la pathologie. Si de nombreuses études d'association par approche gène-candidat ont été publiées jusqu'à l'avènement des approches pangénomiques en 2009, aucun consensus n'a pu être établi à l'exception du polymorphisme du gène codant l'apolipoprotéine E (APOE). Dès 1993, il a été rapporté que l'allèle $\epsilon 4$ du gène APOE est associé à une augmentation du risque de MA (245). Un an plus tard, l'allèle $\epsilon 2$ de ce même gène était associé à une diminution de du risque de MA (246). Depuis, les méta-analyses réalisées dans des études cas-témoins de grands effectifs ont pu estimer que le risque de développer la MA chez les individus porteurs du génotype homozygote APOE $\epsilon 4$ était augmenté de plus de 10 fois, faisant du gène APOE un facteur de risque majeur de MA.

III) Apports des études d'association pangénomiques dans l'identification des déterminants génétiques de la MA

a. Définition et intérêt des études GWAS

Au cours des 15 dernières années, les études d'association pangénomiques (*Genome Wide Association Studies* ou GWAS), dans lesquelles des centaines de milliers de variants génétiques répartis sur tout le génome sont testés dans des échantillons d'effectifs importants, ont révolutionné le domaine de la génétique des maladies multifactorielles (247).

Par leur approche sans *a priori*, ces études d'association pangénomiques ont permis d'identifier de nouveaux gènes de fonction inconnue dans la maladie, dont l'analyse pourrait conduire à la découverte de nouveaux mécanismes physiopathologiques et à l'identification de cibles thérapeutiques originales.

b. Identification des facteurs de risques génétiques de la MA par les études GWAS

Les résultats des deux premières études d'association pangénomiques ont été publiés en 2009, avec l'identification de trois nouveaux *loci* contenant les gènes *CLU*, *CR1* et *PICALM* (248,249). Depuis la fin des années 2010, les études d'association pangénomiques de la MA ont intégré des méthodologies de méta-analyse, et ont augmenté la taille des échantillons analysés, en intégrant notamment des cas "proxy" de MA, basés sur l'autodéclaration d'antécédents familiaux de démence liée à la MA, ce qui a considérablement augmenté la puissance statistique de ces études d'association pangénomiques (87,250–252). La combinaison de ces différentes avancées a finalement abouti à la publication par l'UK-Biobank de l'analyse GWAS de 1,126,563 participants (43,725 cas, 46,613 cas proxy et 1,036,225 témoins) (253). La même année, le consortium EADB (European Alzheimer's & Dementia BioBank), a publié la cartographie la plus complète des gènes dont la variabilité impacterait le risque de développer la MA, à partir d'un échantillon total de 788 989 participants (64 498 cas, 46 828 cas proxy et 677 643 témoins) (86). Ensemble, ils ont ainsi rapporté, en plus de l'APOE, l'association de 75 *loci* avec le risque de MA, dont 34 communs entre les deux études, et 42 nouvellement identifiés (Figure 16).

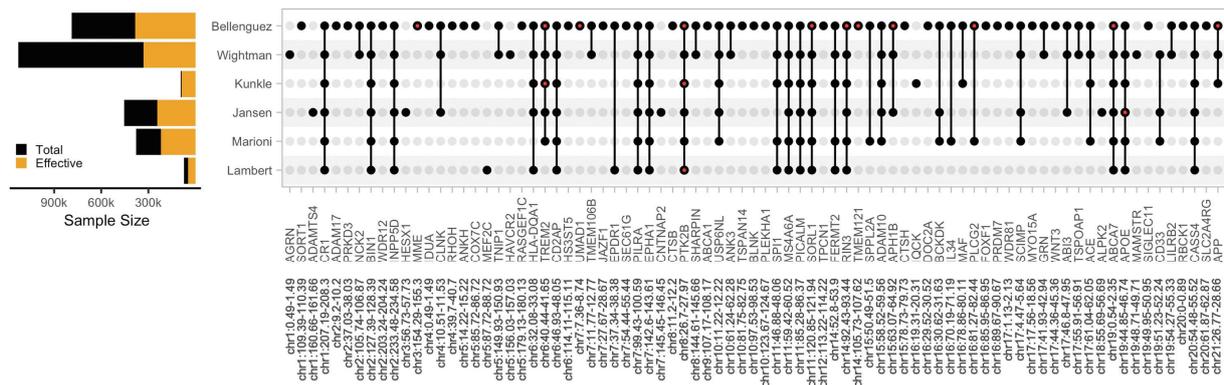


Figure 16. Les *loci* génétiques associés au risque de MA. Les études GWAS réalisées ces dix dernières années ont conduit à l'identification de nombreux *loci* associés au risque de développer la maladie. Les points noirs représentent les *loci* ayant atteint une p-valeur significative dans l'étude qui lui est associée. Les points rouges représentent les *loci* contenant plusieurs variants indépendants (254).

c. Limites des études GWAS

L'ère des études d'association pangénomiques a ainsi été couronnée de succès dans le sens où de nombreux *loci* ont pu être identifiés comme statistiquement associés au risque de développer la maladie. Cependant, plusieurs facteurs font qu'il est difficile de combler le fossé entre les associations statistiques liant *locus* et phénotype, et une compréhension fonctionnelle de la biologie sous-jacente au risque de maladie (255).

L'intérêt des GWAS est parfois controversée, car le risque attribuable à chacun de ces gènes est extrêmement faible. Il convient néanmoins de noter que la valeur des connaissances biologiques tirées des études d'association pangénomiques n'est pas proportionnelle à la force de l'association. Par exemple, de nombreux gènes qui représentent des cibles moléculaires de médicaments approuvés par la FDA abritent des variants communs d'effet modeste identifiés par études d'associations pangénomiques (256). Cette constatation constitue un argument fort en faveur de la poursuite de l'identification d'associations subtile dans des échantillons encore plus grands.

Il a également été suggéré que la majeure partie de l'héritabilité des maladies multifactorielles était associée à des variants rares et très rares (257). En effet, les variants qui ont des effets importants dans les maladies multifactorielles sont probablement soumis à une pression sélective importante et restent donc à fréquence faible dans la population. Cependant, les études d'association pangénomiques facilitent quant à elles l'analyse des variants fréquents dans la population générale (ceux dont la fréquence de l'allèle rare est >1%).

d. Identification des facteurs de risques génétiques de la MA par des approches de séquençage de génomes et d'exomes.

Les progrès du séquençage de nouvelle génération et la réduction des coûts ont néanmoins permis de faciliter l'identification de variants génétiques rares et très rares associés à la MA ces dernières années. Les techniques de *Whole Genome Sequencing* (WGS) se basent sur l'analyse de l'ensemble des variants du génome, contrairement aux études GWAS qui n'étudient « seulement » que plusieurs centaines de milliers de variants génétiques fréquents en utilisant les technologies de puces à polymorphismes. De cette façon, les études WGS facilitent l'identification de variants rares ou très rares, qui n'auraient pas pu être mis en évidence par les études GWAS. Cette technologie reste cependant coûteuse, et certains préféreront employer des approches de *Whole Exome Sequencing* (WES), dont la couverture se limite aux parties codantes du génome.

Grâce aux méthodes de WGS et WES, plusieurs variants rares associés à la MA ont pu être identifiés (258). De manière intéressante, un certain nombre de ces variants étaient situés dans les mêmes gènes que ceux identifiés par les études GWAS, ce qui confirme la fiabilité de ces techniques. Ces approches de séquençage ont notamment permis d'identifier de nouveaux variants génétiques rares au sein des gènes *PLCG2*, *AIB3*, *TREM2*, *SORL1* et *ABCA7* (259–263).

En 2018, l'Alzheimer's Disease Sequencing Project (ADSP) a procédé au séquençage de l'exome entier de 5 740 cas de MA et de 5 096 témoins indemnes de la maladie, et a permis d'identifier, en plus de variants génétiques rares de gènes précédemment associés à la MA, des associations dans deux nouveaux gènes (*IGHG3* et *ZNF655*), et dans un long ARN non codant (*AC099552.4*) (264). En 2022, le consortium Alzheimer Disease European Sequencing (ADES) a publié la plus vaste étude WES dans le cadre de la MA en comparant les données de séquençage de l'exome de 16 036 cas de MA et 16 522 témoins. Outre les variants de *TREM2*, *SORL1* et *ABCA7*, une association significative de variants rares dans les gènes *ATP8B4* et *ABCA1*, ainsi qu'un signal suggestif dans le gène *ADAM10* ont été ainsi mis en évidence (265).

e. Des études d'association pangénomiques à l'analyse des réseaux de gènes

Si l'essor des études d'association pangénomiques a permis de considérablement accroître notre connaissance de la composante génétique de la MA, celle-ci, comme toute maladie multifactorielle, est causée par des perturbations de réseaux biologiques plutôt que par des gènes ou des protéines isolées. Dans un contexte de recherche fondamentale visant à découvrir et caractériser les voies physiopathologiques sous-jacentes à la MA, les analyses de réseaux de gènes, qui se basent sur le postulat selon lequel une voie pertinente doit être enrichie en facteurs de risque génétiques pour la maladie en question, se sont avérées informatives.

Sur le plan méthodologique, l'analyse des réseaux de gènes se concentre sur l'identification par des approches *in silico*, des gènes et des protéines en interaction afin d'identifier, au niveau du système, les voies biologiques dans lesquelles les facteurs génétiques de la MA se trouvent surreprésentés.

En 2010, deux études portant sur des ensembles de données GWAS indépendantes ont ainsi mis en évidence pour la première fois l'implication du système immunitaire et de la microglie dans la MA (266,267). Les enrichissements dans les voies impliquées dans le métabolisme des lipides et l'endocytose ont également donné des résultats cohérents d'une GWAS à l'autre, tandis que les voies directement impliquées dans le métabolisme de l'APP et les protéines liées à la protéine Tau sont devenues les voies les plus fortement associées au risque de développer la maladie dans les dernières analyses GWAS (86,252). Toutefois, il convient de garder à l'esprit que les nouveaux facteurs de risque génétiques de la MA identifiés par les études d'association pangénomiques sont souvent évalués pour la première fois dans le contexte de voies physiopathologiques connues. Cette approche peut conduire à un raisonnement circulaire et donc à un enrichissement artificiel dans des processus biologiques spécifiques (268). L'analyse bibliographique de la fonction des gènes associés au risque de MA par les études d'association pangénomiques montre qu'une grande partie d'entre eux joueraient également un rôle important, non seulement dans le développement des pathologies amyloïde et Tau, mais également au niveau de la structure et la fonction synaptique (**Figure 17**).

i. Les facteurs de risques génétiques impliqués dans la pathologie amyloïde et leurs liens avec la synapse

Les études d'association pangénomiques ont renforcé l'importance du métabolisme de l'APP dans la physiopathologie de la MA en désignant deux de ses principaux acteurs comme facteurs de risque génétiques de la maladie : ADAM10, qui exercent l'activité α -sécrétase dans le cerveau, et APH1B, qui fait partie du complexe γ -sécrétase (269). Confortant l'implication de ces gènes dans l'étiologie de la MA, les souris ayant subi un knock-out conditionnel de l'*Adam10* neuronale présentent des déficits d'apprentissage et de mémorisation (270). Ces souris transgéniques présentent également une altération de la morphologie des synapses, accompagnée par une diminution de la densité des épines dendritiques. Plus de 40 protéines transmembranaires sont des substrats de l'ADAM10, et un certain nombre d'entre elle, dont l'APP, la N-cadhérine, la neurexine-1, et la neurologine-1, sont impliquées dans différents aspects de la formation et du maintien des synapses, ainsi que dans la plasticité synaptique (271). Les souris déficientes pour *Aph1B* présentent quant à elles une diminution des marqueurs synaptiques excitateurs, associé à un déficit de transmission et de plasticité synaptique (272).

D'autres facteurs de risque génétiques de la MA identifiés par les GWAS ont montré un rôle dans le métabolisme de l'APP et la fonction synaptique, notamment les gènes *SORL1* et *FERMT2*. La sous-expression de *Sorl1* chez la souris a en effet été associée à une augmentation de la production d'A β en bloquant l'acheminement de l'APP endocytosée vers le réseau trans-golgi, ce qui réduit le métabolisme de l'APP au sein des endosomes (273,274). Outre l'APP, *SORL1* régule également le trafic et la signalisation d'autres récepteurs membranaires, tels que TrkB et EphA4, dont on sait qu'ils jouent un rôle important dans la régulation de la formation des synapses et des fonctions synaptiques (275). De plus, la surexpression de *SORL1* chez des souris transgéniques préserve les synapses du gyrus denté lors de l'exposition à l'A β (276). Concernant *FERMT2*, il a été montré que la sous-expression de ce gène, telle qu'observée chez les individus porteurs de l'allèle à risque, favorisait le recyclage de l'APP mature des endosomes vers la membrane plasmique. Il en résulterait une production accrue d'A β neurotoxiques en augmentant le pool d'APP susceptible d'être clivé par les α -, β - et γ -sécrétases, plutôt que dégradé dans les lysosomes (277). Confirmant le lien précédemment évoqué entre la pathologie amyloïde et la dysfonction synaptique, la sous-expression de *FERMT2* montre également un impact sur la croissance axonale, la connectivité synaptique et la LTP d'une manière dépendante de l'APP (278).

ii. Les facteurs de risques génétiques impliqués dans la pathologie Tau et leurs liens avec la synapse

BIN1 a été le premier facteur de risque génétique de la MA identifié comme lié à la pathologie Tau (279). En outre, il a été démontré que la surexpression de *BIN1* humain dans un modèle murin augmentait l'interaction BIN1-Tau dans le réseau neuronal et permettait de remédier aux déficits de mémoire à long terme et aux inclusions de Tau induites par la surexpression de la protéine Tau humaine (280). De façon intéressante, *BIN1* joue un rôle dans l'endocytose, où elle interagit avec plusieurs protéines associées à l'adressage endosomal. La déplétion de *BIN1* a été associée à une augmentation de l'A β_{1-42} intracellulaire, potentiellement par accumulation dans les endosomes précoces (281). Les souris knock-out conditionnelles avec délétion de *Bin1* dans les neurones excitateurs présentent des défauts dans la consolidation de la mémoire spatiale due à un déficit dans la libération des neurotransmetteurs (282). *BIN1* régule également la taille des épines dendritiques ainsi que l'activité du réseau en régulant le trafic des canaux calciques de type L voltage-gated (LVGCC) vers les membranes (283,284).

Le phénotype de l'œil rugueux de la drosophile a été utilisé au laboratoire pour effectuer un criblage fonctionnel systématique de l'impact des déterminants génétiques de la MA identifiés par GWAS sur la toxicité de la protéine Tau (285). Outre *BIN1*, cette approche a permis d'identifier les orthologues respectifs des gènes *CASS4*, *PTK2B*, *EPHA1*, *MADD*, *CD2AP*, *FERMT2*, *CELF1* et *TLN2* (286) comme modulateurs de la pathologie Tau. De manière intéressante, une grande partie des gènes

identifiés par cette approche participent au complexe d'adhésion focale, principalement en aval des intégrines. Parmi les nombreuses fonctions biologiques potentiellement en aval, la voie des adhésions focales peut moduler la dynamique de l'actine filamenteuse en régulant plusieurs protéines de liaison à l'actine et contrôler de cette façon la forme des épines dendritiques (287). La voie de l'adhésion focale dépendante des intégrines a été impliquée dans la densité et l'activité synaptique en influençant la forme, la stabilité, et la signalisation neuronale (288)

Parmi les gènes potentiellement impliqués dans le complexe d'adhésion focale au niveau synaptique, on trouve *PTK2B*. *PTK2B* code pour la protéine PYK2, une tyrosine kinase dépendante du calcium et appartenant à la famille des *Focal Adhesion Kinases*. Cette famille de kinases a été impliquée dans les contacts cellule-matrice extracellulaire et dans la transduction de signaux extracellulaires contrôlant notamment la migration et la survie cellulaire. Dans les neurones, *PTK2B* semble avoir un rôle important dans la formation et la maintenance des neurites, la plasticité synaptique et la régulation de l'activité des récepteurs NMDAR (290). Concernant le(s) lien(s) potentiel(s) entre *PTK2B* et les mécanismes physiopathologiques de la MA, le criblage fonctionnel réalisé chez la Drosophile a mis en évidence une activité protectrice de *PTK2B* sur la neurotoxicité induite par l'hyperphosphorylation de Tau (286). Dans la même étude, une interaction entre PYK2 et Tau in vitro ainsi que leur co-localisation dans des cerveaux de patients et de souris ont été décrites. De façon cohérente avec ces observations, il a été également montré dans des cultures primaires de neurones hippocampiques de rat, que la surexpression de *PTK2B* protège de la perte synaptique induite par les peptides toxiques A β ₁₋₄₂ (291). Chez la souris, la délétion de *Ptk2b* jouerait un rôle dans la plasticité synaptique et les processus de mémorisation spatiale, en modifiant la LTP (290).

iii. Les facteurs de risques génétiques impliqués dans le système immunitaire et leurs liens avec la synapse

Le dysfonctionnement de la microglie est suspecté d'être impliqué dans la MA en modulant l'agrégation/dégradation des formes neurotoxiques de l'A β , et en favorisant la phagocytose des structures neuronales, en particulier des structures synaptiques (292). L'intégration des données GWAS avec les annotations fonctionnelles du génome selon les types cellulaires a permis d'identifier la microglie comme modulateur potentiel de la susceptibilité individuelle à la MA. De façon intéressante, plusieurs variants génétiques identifiés par GWAS sont ainsi localisés dans des régions contrôlant l'expression de gènes dans la microglie, dont les facteurs de risque génétiques *BIN1*, *RIN3*, *ZYX*, *CD2AP*, *SORT1*, *CASS4*, *CCD6*, *TSPAN14*, et *NCK2*. Les WES et WGS ont également identifié des variants rares dans des gènes particulièrement, voir exclusivement exprimés dans la microglie, en particulier *TREM2*, *ABCA7*, *PLCG2*, et *ABI3* (254).

TREM2 est presque uniquement exprimé dans les cellules microgliales et joue un rôle dans la compaction des plaques amyloïdes, ainsi que dans la régulation de l'élimination des synapses (102). La présence du variant rare R47H dans le gène *TREM2* augmente le risque de MA d'environ trois fois (261). L'inhibition de *Trem2* dans un modèle de souris 5xFAD réduit la réponse microgliale à la pathologie amyloïde : le nombre de cellules microgliales entourant les plaques amyloïdes est réduit, et l'activation de l'expression des gènes microgliaux est altérée. Ces données suggèrent que la microglie participerait à la compaction des plaques amyloïdes par un mécanisme dépendant de TREM2, formant ainsi une barrière protectrice qui atténue la toxicité pour les neurones voisins (293). TREM2 est également essentiel pour l'élagage synaptique (*pruning*) médié par la microglie. Les souris *Trem2*^{-/-} présentent une phagocytose synaptique microgliale anormale, une altération de la connectivité fonctionnelle des voies neuronales, ainsi que des comportements anormaux et des déficits sociaux (294).

Le gène *PLCG2* code pour l'enzyme transmembranaire PLC γ 2 qui hydrolyse le phospholipide membranaire PIP2 (1-phosphatidyl-1D-myo-inositol 4,5-bisphosphate) en ses messagers secondaires IP3 (myo-inositol 1,4,5-trisphosphate) et DAG (diacylglycerol), conduisant à une augmentation du calcium intra-cytoplasmique, et à l'activation de la voie du NF κ B et des MAPK. PLC γ 2 est exprimé de façon prédominante dans la moelle osseuse et les organes lymphoïdes, et les mutations du gène *PLCG2* sont à l'origine de troubles immunitaires graves comme le syndrome PLAID (*PLCG2-associated antibody deficiency and immune dysregulation*) ou APLAID (*Autoinflammatory PLCG2-associated antibody deficiency and immune dysregulation*). Dans le cerveau *PLCG2* est principalement exprimé par les cellules microgliales où il régule des voies de signalisation impliquées dans la phagocytose, la sécrétion de cytokines ainsi que dans la survie, la prolifération et la migration cellulaire (295). Le variant rare P522R du gène *PLCG2* est associé à un risque diminué de 32% de développer la MA (259), et est corrélé avec une augmentation de la concentration en protéine Tau totale dans le LCR des patients atteints de MA (296). Des analyses RNA-seq montre un niveau d'expression de *PLCG2* plus élevés dans les cerveaux des patients atteints de MA par rapport à ceux de personnes âgées cognitivement normales, positivement associés à la fois aux plaques amyloïdes et aux niveaux d'expression des gènes microgliaux (297). Une autre étude a également montré que les cellules microgliales issues d'un modèle de souris porteuses du variant protecteur P522R de *PLCG2* possédaient des capacités de phagocytose augmentées (298). L'expression de ce variant P522R dans un modèle de cellules microgliales dérivées d'iPSCs entraîne une augmentation des taux de calcium intra-cellulaire, ainsi qu'une plus grande clairance de l'A β (299). Les microglies hiPSCs P522R présentaient également une diminution de l'absorption des synaptosomes, favorisant ainsi la

préservation des synapses. Ce phénomène est associé à des altérations de la fonction mitochondriale et à une augmentation de la motilité cellulaire.

Plusieurs gènes ont été par ailleurs liés au système immunitaire inné, en particulier à la régulation de la voie de signalisation médiée par le facteur de nécrose tumorale (*Tumor Necrosis Factor* ou TNF) (86). Les études GWAS rapportent ainsi l'implication potentielle des variations génétiques du complexe d'assemblage de la chaîne d'ubiquitine linéaire (LUBAC), un régulateur majeur de la voie de signalisation des TNF, dans la physiopathologie de la MA (300). Deux des trois éléments du complexe LUBAC sont codés par *SHARPIN* et *RBCK1*, et la fonction de ce complexe est directement régulée par *OTULIN*. Des variants de ces 3 gènes ont été associés au risque de développer la MA dans les dernières GWAS (86). Si la voie de signalisation du TNF- α est connue pour être impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques et physiopathologiques du cerveau comme la perte de synapses (301), l'implication des gènes *SHARPIN*, *RBCK1* et *OTULIN* dans la dysfonction/perde synaptique observée dans les stades précoces de la maladie reste à démontrer par les études fonctionnelles post-GWAS.

iv. Les facteurs de risques génétiques impliqués dans le métabolisme des lipides et leurs liens avec la synapse

Le premier gène dont les variations génétiques ont été identifiées, d'abord par approche gène candidat puis par GWAS, pour influencer le développement des formes sporadiques de la MA est le gène *APOE*. Les lipoprotéines contenant l'*APOE* sont sécrétées par les astrocytes dans des conditions physiologiques, mais également par les neurones dans des conditions pathologiques (302). L'*APOE* se lie aux membres de la famille des récepteurs des lipoprotéines de basse densité (LDLR), aux récepteurs des lipoprotéines de très basse densité (VLDLR) et à la protéine 1 liée au LDLR (LRP1) (303). Outre son rôle de transporteur de lipides des astrocytes vers les neurones, l'*APOE* participe également à de multiples voies biologiques, notamment la morphogenèse neuronale, le trafic de protéines et l'homéostasie calcique, qui interviennent dans le développement, l'entretien et la réparation du système nerveux central (304). Les souris porteuses de l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE* présentent des taux de glutamine plus élevés dans le cerveau, en raison d'une perturbation du cycle glutamate-glutamine qui entraîne une excitotoxicité neuronale (305). Au niveau postsynaptique, l'*APOE4* atténue la LTP dépendante des NMDAR en séquestrant les NMDAR et les AMPAR dans les compartiments intracellulaires et en empêchant leur expression membranaire, entraînant ainsi une altération de la plasticité synaptique (306). Enfin, l'*APOE* $\epsilon 4$ limite la maturation et la fonction des synapses en modifiant l'expression des protéines neuronales et synaptiques au niveau transcriptionnel et traductionnel (307).

Parmi les autres déterminants génétiques de la MA impactant à la fois le métabolisme des lipides et les synapses, *CLU* est une protéine multifonctionnelle qui agit comme une chaperonne

extracellulaire, impliquée dans le métabolisme des lipides (308). Une étude récente a suggéré que la CLU sécrétée par les astrocytes joue également un rôle dans la fonction synaptique, où elle se lie aux sites présynaptiques excitateurs. Les souris *Clu*^{-/-} présentent une diminution de libération des neurotransmetteurs et de la densité des épines dendritiques (309)

Un autre exemple de facteur de risque génétique impliqué dans l'homéostasie lipidique et la fonction synaptique est le gène *DGKQ*. *DGKQ* code l'isoforme θ de la diacylglycérol kinase, une protéine régulatrice de la signalisation lipidique qui métabolise le diacylglycérol (DAG) en acide phosphatidique (310). L'ablation de l'orthologue de *DGKQ* chez *C. elegans*, empêche l'inhibition de la libération de neurotransmetteurs médiée par la sérotonine aux jonctions neuromusculaires, suggérant que cette protéine est impliquée dans la transmission synaptique (311). Confirmant cette hypothèse, l'inactivation du gène *Dgkq* chez la souris suggère un rôle essentiel de ce gène dans l'endocytose des vésicules synaptiques au niveau des synapses excitatrices (312).

v. Les facteurs de risques génétiques impliqués dans l'endocytose et leurs liens avec la synapse

CD2AP est un régulateur du trafic des endosomes, et il a été rapporté qu'il contrôle la production d'A β dans les neurones (313). CD2AP régule également le bourgeonnement des axones *via* la signalisation TrkA (314). Chez la drosophile, la suppression de l'expression de l'homologue de *CD2AP*, entraîne une altération de la maturation des synapses ainsi que des défauts de transmission synaptique dus à l'incapacité de maintenir la libération et le recyclage des vésicules synaptiques (315). En plus de son rôle dans les fonctions neuronales et synaptiques, CD2AP est également impliqué dans les mécanismes de neuro-toxicité induite par Tau, ainsi que dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (316).

Le facteur de risque génétique *PICALM* est une protéine adaptatrice impliquée dans l'endocytose médiée par la clathrine et l'autophagie, et affecterait ainsi l'internalisation de l'APP résultant en la production d'A β (317,318). La présence des variants de *PICALM* associée à un risque augmenté de MA est corrélée avec une diminution du taux d'A β dans le LCR des patients (319). Dans les neurones, *PICALM* est présent à la fois dans les compartiments présynaptiques et postsynaptiques, et joue un rôle essentiel dans la régulation du recyclage des vésicules synaptiques (320). *PICALM* régule entre autre la transmission synaptique en modulant les niveaux d'expression des transporteurs du glutamate VGLUT (321), ainsi que les niveaux de surface des récepteurs AMPAR (322). Il est ainsi impliqué dans la plasticité synaptique et l'apprentissage, en modulant à la fois la LTP et la LTD (323). En plus de ce rôle synaptique, *PICALM* possède également des fonctions essentielles dans la croissance des neurites. L'inhibition de *Picalm* dans des cultures primaires de neurones de rats entraîne une dystrophie neuronale, tandis que sa surexpression conduit à la génération de multiples axones (324).

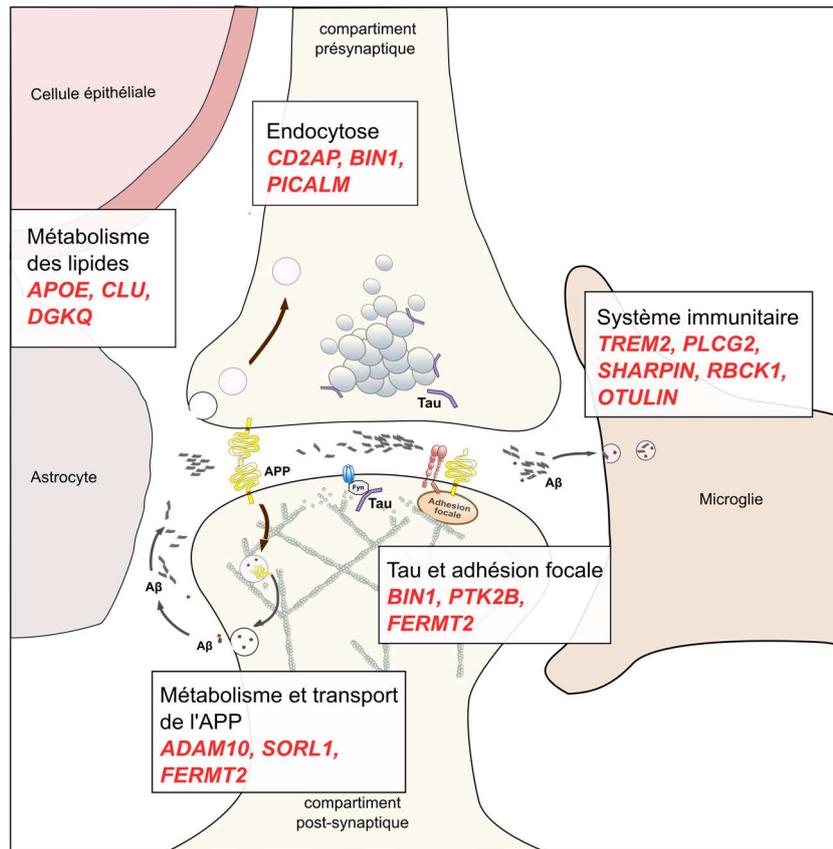


Figure 17 : Plusieurs déterminants génétiques de la maladie d'Alzheimer jouent un rôle à la synapse. L'analyse post-GWAS des réseaux de gènes a montré qu'un certain nombre de facteurs de risques génétiques jouaient un rôle à la synapse à travers leur implication dans (i) le métabolisme et le transport de l'APP, (ii) leurs interactions avec Tau et le complexe d'adhésion focale, (iii) le système immunitaire, (iv) le métabolisme des lipides, et (v) l'endocytose (269).

PARTIE 7 : LE CRIBLAGE A HAUT CONTENU (HCS) POUR LES ETUDES POST-GWAS

I) L'intérêt du criblage dans les études post-GWAS

Pendant des années, l'impact des gènes candidats sur les phénotypes associés à la MA a été évalué de façon individuelle. Avec le développement des études d'associations pangénomiques, le nombre de gènes candidats de la MA a grandement augmenté, et ces approches ne semblent désormais plus appropriées. La caractérisation des fonctions physiopathologiques des gènes définis par les études GWAS nécessite alors la mise en place de modèles animaux ou de modèles cellulaires adaptés à un criblage à grande échelle. L'approche par interférence ARN (ARNi), permettant d'inhiber de manière spécifique l'expression d'un gène en entraînant la dégradation de son ARN messenger, représente un outil pertinent pour interroger la fonction des gènes *in vitro* ou *in vivo*. De nombreuses contraintes évidentes sont cependant associées à l'utilisation d'animaux et il est impossible de cribler systématiquement des centaines de gènes dans un modèle murin. Cette approche est néanmoins possible dans de petits modèles invertébrés, tels que *Caenorhabditis Elegans*, et *Drosophila Melanogaster* (325).

II) Les modèles de criblages invertébrés

a. *Caenorhabditis Elegans*

Caenorhabditis elegans est un nématode transparent d'environ 1 mm de long, et représente l'un des organismes les plus simples doté d'un système nerveux. La découverte des mécanismes d'interférence ARN a révolutionné l'analyse fonctionnelle des gènes chez ce ver, en permettant d'inhiber de manière efficace et reproductible l'expression de gènes individuels. *C. Elegans* peut être facilement transféré dans des plaques multi-puits contenant différents clones de la bactérie produisant un ARN double-brin spécifique qui, une fois absorbé par les nématodes, induit l'inhibition du gène correspondant.

Il existe plusieurs modèles de *C. elegans* qui expriment soit une séquence codante pour le peptide amyloïde humain, soit la protéine Tau (326). Dans le premier cas, les vers transgéniques expriment le peptide amyloïde dans les muscles de la paroi corporelle, et l'accumulation progressive du peptide dans les cellules musculaires entraîne la paralysie du ver. Des chercheurs ont ainsi mis à profit ce modèle et ce phénotype facilement accessible pour étudier l'effet des gènes identifiés par les études d'association pangénomiques de la MA sur la sécrétion de peptides amyloïdes (327,328). Les modèles d'études de *C. Elegans* exprimant la protéine Tau présentent quant à eux une aggravation des mouvements non coordonnés lors de l'accumulation de la protéine sous forme phosphorylée et

insoluble. Ce modèle a notamment été utilisé pour réaliser le criblage de 16 757 gènes, dans le but d'identifier de nouvelles voies biologiques impliquées dans la pathologie Tau (329).

b. *Drosophila Melanogaster*

La Drosophile, autre modèle animal fréquemment utilisé dans la recherche sur les maladies neurologiques, a l'avantage de présenter une bonne conservation des gènes avec l'homme ainsi qu'une multitude de phénotypes externes (taille, couleur et forme de l'œil ou de l'aile) qui peuvent être facilement observés. Cette caractéristique est essentielle pour cribler rapidement l'effet de la modulation d'un gène

Dans ce contexte, la drosophile a été utilisée dans un criblage génétique cherchant à identifier les gènes modulant la toxicité du peptide A β ₄₂. L'accumulation de peptides amyloïdes dans le cerveau de la drosophile entraîne une déficience de la géotaxie, ce qui a permis d'évaluer l'impact de plus de 6300 gènes sur la modulation de la toxicité des peptides amyloïdes (330). Le modèle de Drosophile a également pu être mis à profit pour étudier la capacités des gènes à moduler la toxicité induite par Tau, facilement mise en évidence par un phénotype d'œil rugueux (285,331).

Les criblages réalisés chez ces petits invertébrés ont ainsi permis d'identifier plusieurs gènes modulant des phénotypes classiquement associé à la MA, mais leurs systèmes nerveux centraux peu développés, et leurs importantes différences génomiques avec l'homme, limite la capacité de ces modèles pour caractériser l'ensemble des gènes identifiés par les GWAS.

III) Les modèles de criblage cellulaire

Le criblage à haut-débit (High Throughput Screening ou HTS) est une méthode permettant de tester rapidement et en parallèle des milliers de composés dans un même essai biologique miniaturisé et automatisé. Initialement, ce type de criblage était utilisé par l'industrie pharmaceutique pour établir rapidement l'effet de milliers de candidats médicaments sur des modèles cellulaires. Toutefois, il est rapidement devenu évident que cette méthode pouvait constituer un nouveau moyen de réaliser des études fonctionnelles à grande échelle, de manière non biaisée, systématique et quantitative (332). Afin de pouvoir évaluer des processus cellulaires de plus en plus complexes, les technologies haut-débit ont évoluées et de nombreux criblages utilisent désormais l'imagerie pour mesurer la réponse biologique induite par les composés criblés. Ce type de criblage haut-débit basé sur la visualisation de phénotype cellulaire par microscopie à fluorescence automatisée est appelé criblage à haut-contenu (High Content Screening ou HCS), et permet d'évaluer des processus biologiques qui ne pourraient être étudiés par de simples essais biochimiques, tels que la localisation de protéines, ou encore la morphologie cellulaire (333) (**Figure 18**).

a. Le modèle cellulaire

Pour tout HCS, l'étape initiale et la plus critique est la mise en place du modèle de criblage. À ce stade, on cherche à choisir un modèle cellulaire qui reflète le plus fidèlement possible le processus pathologique tout en étant miniaturisable et compatible avec l'automatisation. Le criblage est généralement réalisé dans des plaques de cultures cellulaires 384-puits, avec une surface de 8 mm² par puits, et l'utilisation de robots pour la manipulation des liquides (cellules, milieu de culture, composés...) permet d'augmenter considérablement la rapidité et la reproductibilité du criblage. En raison de la logistique complexe associée aux criblages à grande échelle, y compris la nécessité de disposer d'un nombre relativement important de cellules, ces études se basent généralement sur des modèles de lignées de cellules cancéreuses. Ces lignées sont cependant instables sur le plan caryotypique et leur expansion sous forme de monocouches homogènes en 2D sur du plastique ne reflète pas les conditions physiologiques de croissance cellulaire (334). Ainsi, on leur préférera l'utilisation de cultures primaires issues de tissus de rats ou de souris, plus pertinentes d'un point de vue biologique. Le grand nombre de cellules nécessaires à un criblage HCS nécessitera le sacrifice de nombreux animaux, posant ainsi des questions de faisabilité et d'éthique animale. De plus, la transposition à l'humain de résultats obtenus à partir de modèles murins n'est pas toujours évidente, ce qui limite également l'utilisation de tels modèles cellulaires. Pour ces raisons, des efforts sont actuellement déployés pour s'éloigner de l'utilisation de lignées cellulaires et de cultures primaires afin de mieux imiter l'environnement physiologique et le contexte des maladies. Depuis quelques années, des systèmes de co-cultures de neurones, astrocytes et cellules microgliales dérivés d'iPSCs, ou encore des cultures 3D d'organoïdes adaptés au criblage HCS ont pu être développés, bien qu'encore minoritaires (335). En effet, la production et la différenciation des iPSCs reste une technologie relativement nouvelle et l'établissement de ces modèles cellulaires pour le criblage génétique présente de nombreuses difficultés. La différenciation et la maturation de neurones dérivés d'iPSCs sont relativement longues et coûteuses comparées à l'utilisation des cultures primaires de rongeurs. De plus, les cultures neuronales humaines ont également tendance à migrer et à se regrouper en amas, ce qui complique grandement l'acquisition et l'analyse des images.

b. La banque d'ARNs interférents

Un autre aspect essentiel à prendre en compte lors du choix d'un modèle cellulaire est de savoir si les cellules pourront être transfectées/transduites efficacement par la banque d'ARN interférents. Dans le cas où le type cellulaire est imposé par la question biologique à laquelle il faut répondre, une optimisation approfondie du protocole de transfection/transduction sera impérative.

Le criblage ARNi repose sur la disponibilité de bibliothèques de réactifs à l'échelle du génome, avec un ou plusieurs ARNi dirigés contre chaque gène cible. Dans les criblages de cellules

mammaliennes, les réactifs utilisés sont typiquement de petits ARN interférents (siARN), ou de petits ARN en épingle à cheveux (shARN). Deux paramètres déterminent principalement le choix de la molécule: le type de cellule et la durée souhaitée de l'effet d'inhibition (336). Par exemple, si l'on s'intéresse aux conséquences à court terme de l'extinction d'un gène particulier dans une lignée cellulaire facile à transfecter, l'approche la plus efficace consiste à utiliser des siARN synthétiques. Lorsque l'objectif est d'inhiber durablement un gène, il est plus approprié d'utiliser des shARNs exprimés à partir de plasmides ou, dans le cas de cellules difficiles à transfecter, à partir de vecteurs lentiviraux. Le *RNAi Consortium* (TRC) est une collaboration public-privé entre différents groupes de recherche, et a permis de construire une librairie de plus 135 000 shARNs ciblant 27 000 gènes chez l'homme et la souris (337).

c. L'imagerie cellulaire

Les protéines fluorescentes permettent de marquer pratiquement n'importe quelle protéine ou structure cellulaire et la microscopie à fluorescence est l'un des outils les plus puissants pour étudier les processus cellulaires complexes tels que la localisation de protéines, le trafic intracellulaire, ou la morphologie cellulaire. Les approches de criblage à haut contenu nécessitent l'utilisation de microscopes à fluorescence capables d'acquérir de manière rapide et automatisée un grand nombre d'images (338). Ce type de microscope est optimisé pour la lecture de plaques multi-puits et offre en général la possibilité de contrôler l'environnement (température, CO₂, humidité) si on souhaite acquérir des images à partir de cellules vivantes. Le temps d'imagerie est un important facteur et l'optimisation du temps d'exposition, du grossissement et du nombre d'images acquises par puits peut clairement influencer le temps de traitement des plaques et donc la durée de la campagne de criblage. Un délai trop important entre le processus de préparation des plaques et l'imagerie peut également entraîner une diminution de la qualité du criblage.

d. L'analyse d'images

Des progrès significatifs dans les approches HCS ont été également réalisés grâce à la mise en place de méthodes d'analyses d'images et d'approches d'apprentissage informatique pour la classification automatisée des phénotypes cellulaires et subcellulaires (339). Ces analyses d'images sont généralement basées sur la mesure de l'intensité de fluorescence de l'immunomarquage ou de rapporteurs fluorescents surexprimés, ou sur différentes caractéristiques morphologiques cellulaires. De nombreux logiciels sont disponibles pour quantifier les images issues du criblage HCS, et permettent de créer des pipelines d'analyses classiquement organisés en deux grands processus : (i) la segmentation des images, et (ii) l'extraction des informations (340). Les algorithmes de segmentation détectent et isolent les différentes cellules ou compartiments intra-cellulaires sur la base

de leurs propriétés comme leur fluorescence ou leur taille. Une fois l'image segmentée en différents objets, il est possible d'extraire les informations d'une cellule donnée qui sont généralement de quatre types : (i) la moyenne, médiane, ou le maximum de l'intensité de fluorescence de l'objet, (ii) les caractéristiques morphologiques de l'objet telles que sa taille, son aire, ou sa rondeur, (iii) la texture de l'objet, et (iv) la position de l'objet dans l'espace. Ce *pipeline* d'analyse permet d'obtenir un très grand nombre d'informations à partir des images, cependant, toutes ne sont pas utiles et pertinentes dans le cadre de l'expérience. La principale difficulté de l'analyse d'images en criblage à haut-débit réside à repérer et à extraire les données essentielles dans le cas de la question biologique posée.

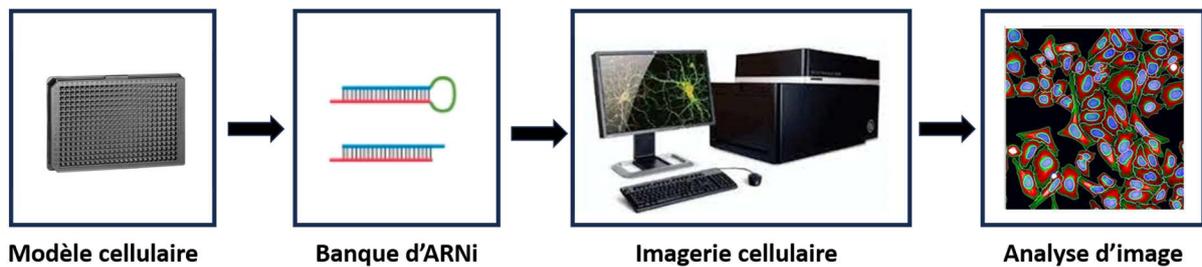


Figure 18 : Les différentes étapes du criblage HCS par interférence ARN. Le criblage HCS consiste à faire réagir un modèle cellulaire miniaturisé au format 384-puits avec une banque de si/shARN ciblant les gènes dont on souhaite étudier la fonction. Les cellules sont ensuite imagées par microscopie à fluorescence automatisée, et l'analyse des images est réalisée grâce à des logiciels dédiés à l'analyse haut-débit.

e. Les limites des criblages à haut-contenu par interférence ARN

L'une des principales problématiques des études HCS reste néanmoins le risque de faux négatifs et de faux positifs. Les criblages par interférence ARNs entraînent notamment des faux-positifs en raison des effets hors-cible (ou *off-target*) de l'ARNi (341). Il est en effet possible que le si/shARN se fixe à d'autres ARN messager que celui qui est ciblé, et entraîne une modification non-voulue de l'expression d'autres protéines. Les si/shARNs sont notamment susceptibles de se fixer à un certain nombre de sites normalement ciblés par les micro-ARN endogènes, en 3'UTR des ARN messager. Pour limiter ces effets hors-cibles, la plupart des algorithmes de conception d'ARNi évitent les régions dans les séquences cibles qui ont 19 paires de bases ou plus d'identité nucléotidique contiguë avec un autre transcrit mature (342). La conception des réactifs ARNi contribue également à l'obtention de résultats faussement négatifs, car certains réactifs n'entraînent pas l'inhibition complète du gène cible. Pour vérifier les résultats d'un criblage génétique, on recommande de confirmer l'effet obtenu avec un deuxième ARN interférent. Il est également possible de valider la spécificité de l'ARN interférent en

rétablissant le phénotype initial par la réexpression du gène dans les cellules exprimant le si/shARN candidat.

D'autres sources de faux-positifs sont inhérentes aux études à haut débit. Les problèmes tels que les erreurs d'instrument ou les conceptions d'essai défectueuses peuvent cependant être détectés et traités pendant le développement et l'optimisation des essais. Le bruit statistique retrouvé dans toute étude à grande échelle peut quant à lui être réduit en effectuant un nombre répétés de tests et en appliquant des analyses statistiques appropriées (343). L'optimisation d'un essai de criblage HCS nécessite également d'évaluer sa sensibilité et sa robustesse. Une mesure largement utilisée pour la performance d'une approche HCS est le bêta-score, qui définit le pouvoir discriminant d'un essai en évaluant la différence obtenue entre les contrôles négatifs et les contrôles négatifs (344).

Le criblage HCS, malgré ses limitations, reste une approche puissante pour comprendre les mécanismes biologiques fondamentaux, et pour déterminer les voies biologiques responsables d'une pathologie. La technologie HCS a été utilisée pour répondre à diverses questions biologiques, et a notamment pu être mis à profit dans l'identification des gènes impliqués dans les processus cellulaires et les phénotypes associés à la MA.

IV) L'HCS pour l'étude des phénotypes de la MA

a. L'HCS pour l'étude de la pathologie amyloïde

Plusieurs modèles cellulaires HEK293T ou HELA surexprimant l'*APP* ont été utilisés dans des criblages cherchant à identifier les gènes régulant la production de peptides amyloïdes (345,346). Les chercheurs ont ainsi évalué l'impact de la sous-expression de centaines de gènes sur la concentration en peptides sAPP α , sAPP β , A β ₁₋₄₀, A β ₁₋₄₂ dans le milieu de culture de ces cellules, et ont ainsi identifié plusieurs modulateurs du métabolisme de l'*APP*.

Certains chercheurs ont également utilisé des neurones humains dérivés d'iPSCs comme modèle cellulaire de criblage afin d'identifier de nouveaux candidats-médicaments ciblant la pathologie amyloïde dans la MA. Kondo et ses collègues ont par exemple utilisé des neurones dérivés de patients atteints de formes familiales de MA porteurs de mutation sur le gène *PSEN1* pour tester l'effet de plus de 1000 composés sur la production d'A β (347). Cette méthode leur a permis de trouver six composés montrant une réduction dose-dépendante de l'A β ₁₋₄₂. Une autre étude publiée la même année a mis au point un criblage de médicaments à l'aide de neurones humains corticaux dérivés d'iPSCs de personnes porteuses de trisomie 21, contenant une copie supplémentaire de l'*APP*. Ce

modèle a servi à cribler 1200 composés, et a permis d'identifier des molécules diminuant la sécrétion du peptide A β ₁₋₄₂ (348).

Cependant, les mécanismes contrôlant la maturation et le trafic de l'APP ne peuvent pas être caractérisés uniquement en étudiant la quantité d'A β présente dans les milieux de culture, et il est donc nécessaire de passer à l'analyse de phénotypes plus complexes. Ainsi, un modèle HCS permettant l'étude du métabolisme de l'APP dans des cellules HEK293 surexprimant de manière stable une construction mCherry-APP695WT-YFP a permis la détection de produits de l'APP spécifiques marqués de manière différentielle par la mCherry pour le fragment N-terminal, ou la YFP pour le fragment C-terminal (277). Au total, 832 gènes ont été sélectionnés comme étant susceptibles d'avoir un impact sur le métabolisme de l'APP, dont 8 étaient associés au risque de MA.

b. L'HCS pour l'étude de la pathologie Tau

D'autres études HCS se sont quant à elles attachées à identifier les gènes impliqués dans la pathologie Tau. Les chercheurs se sont basés sur différents modèles de lignées cellulaires comme des cellules issues de neuroblastome surexprimant l'isoforme de la protéine Tau humaine (349,350), et ont ainsi pu identifier plusieurs kinases impliquées dans l'hyperphosphorylation de Tau associée à la MA. Des modèles plus complexes sur-exprimant le domaine pro-agrégant de la protéine Tau ont également été développés dans le but d'identifier les facteurs responsables de l'agrégation intracellulaire de la protéine Tau (351). D'autres chercheurs ont quant à eux utilisé une construction génétique où les compartiments N- et C-terminaux non fluorescents de la protéine Venus sont fusionnés à la protéine Tau et co-exprimés dans une cellule. La fluorescence de Venus n'apparaît que lorsque la protéine Tau s'assemble, témoignant de l'agrégation de la protéine (339). Différents groupes ont développé des modèles cellulaires de neurones dérivés d'iPSCs pour le criblage de candidats-médicaments capables de contrecarrer la pathologie Tau. Une étude a notamment évalué l'impact de composés sur l'agrégation de Tau par des méthodes HCS combinée avec la technique d'Alpha-LISA (352). D'autres ont cherché à identifier des molécules capable de diminuer son expression dans des neurones humains induits (353), ou la phosphorylation de la protéine Tau (354,355). Kant et al ont notamment réalisé le criblage de plus de 1684 composés dans un modèle de neurones humains dérivés d'iPSCs de patients porteurs de formes familiales de MA, et identifié six composés susceptibles de réduire l'accumulation de Tau phosphorylée dans ce modèle (355).

c. L'HCS pour l'étude des synapses

La perte des synapses est perçue comme l'un des éléments centraux dans la physiopathologie de la MA et se trouve être le paramètre le plus fortement corrélé au déclin cognitif (197). Plusieurs études à haut-contenu ont ainsi cherché à identifier les facteurs déterminant la connectivité

synaptique, la formation et le maintien des synapses. Différents types de marqueurs peuvent être envisagés afin d'apprécier la connectivité neuronale, allant de la simple visualisation de la morphologie des neurites par un marquage du cytosquelette, aux analyses plus fines cherchant à distinguer les compartiments pré- et postsynaptiques (356) (**Figure 19**). L'ensemble de ces paramètres sont autant d'enjeux dans le développement de l'analyse de la densité synaptique par l'approche HCS.

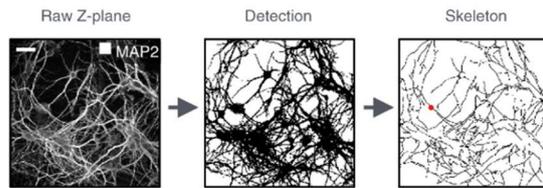
i. Etude des neurites

La morphologie des neurones est étroitement liée à leurs fonctions, c'est pourquoi l'étude du nombre et de la taille des neurites permet d'estimer la connectivité des neurones. Plusieurs types de modèles cellulaires ont ainsi pu être utilisés pour évaluer ce phénotype en HCS : des lignées SH-SY5Y différenciées (357–360), des cultures primaires de neurones de rats ou de souris (361,362), ou encore des neurones humains issus d'iPSCs (363–366). Les neurites, mises en évidence par l'immunomarquage de la protéine MAP2, peuvent être analysées au travers de leurs longueurs, de leurs nombre de points de ramification, ou de la densité du réseau neuronal (356).

ii. Etude de la densité synaptique

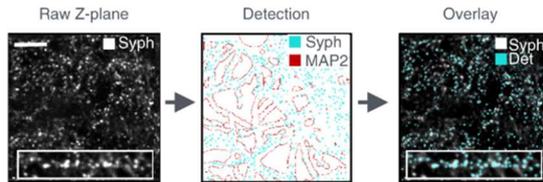
Les propriétés des synapses, telles que leurs nombres et leurs localisations, peuvent également affecter la fonction neuronale globale. Des chercheurs ont ainsi pu mettre en évidence le rôle de plusieurs gènes dans le développement des synapses, en étudiant la colocalisation des protéines Synapsine et PSD95 dans des neurites marqués par la GFP (367). Dans des cultures primaires de neurones, la mesure de multiples phénotypes tels que le nombre, l'aire, et la forme des synapses excitatrices et inhibitrices, mise en évidence respectivement par l'immunomarquage des protéines Synapsin-1 et Gephyrin, a également permis d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la régulation de la synaptogénèse (368). Les modèles développés dans ces deux études avaient cependant pour limite l'utilisation de cultures cellulaires d'un format classique (lamelle en verre ou plaque 96-puits, et non plaque 384-puits), ce qui diminue considérablement la rapidité d'analyse et la capacité de cribler de larges banques. Plus récemment, des modèles plus pertinents de neurones dérivés d'iPSCs ont également été adaptés à l'étude du phénotype synaptique par approches à haut-contenu (369). Cette étude a néanmoins pour défaut de n'étudier la densité synaptique qu'à travers le marquage unique d'une protéine présynaptique (la Synapsine), or ce type de marquage possède une sensibilité limitée due au risque de marquage de synapses immatures ou non-fonctionnelles.

A. Etude des neurites



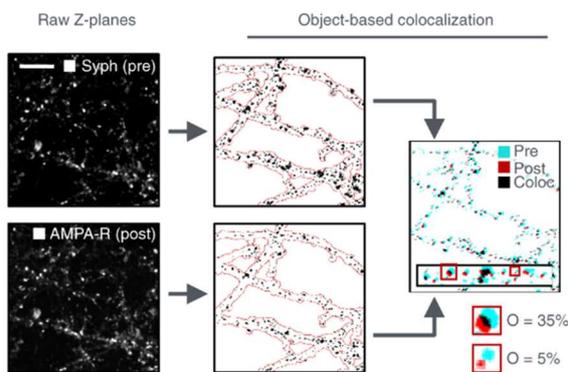
- Densité du réseau
- Longueur des neurites
- Nombre de points de ramification

B. Etude des synapses par marquage unique



- Densité de marqueurs pré-synaptiques ou post-synaptiques

C. Etude des synapses par co-localisation de marqueurs pré- et post-synaptiques



- Densité de synapses

Figure 19 : Imagerie HCS pour l'étude de la connectivité neuronale. Différents types de marquages et de mesures peuvent être envisagés afin d'apprécier la connectivité neuronale. **A. Mesure de la morphologie et de la complexité des neurites par marquage du cytosquelette.** **B. Mesure de la densité d'un marqueur unique pré- ou post-synaptique.** **C. Mesure de la densité de synapse par étude de la co-localisation entre un marqueur pré- et un marqueur post-synaptique.** Cette dernière méthode représente la technique de marquage et de quantification la plus précise. (356)

De nombreux modèles de criblages cellulaires permettent ainsi d'évaluer de manière rapide et automatisée, l'impact de multiples composés sur les phénotypes caractéristiques de la MA telles la pathologie amyloïde, la pathologie Tau, ou la perte synaptique. Ces différentes approches pourraient notamment être mises à profit pour identifier les gènes réellement responsables de l'association avec le risque de développer la MA au sein des *loci* identifiés par les GWAS, ainsi que pour évaluer la fonction de ces gènes dans différents processus physiopathologiques de la MA.

PARTIE 8 : RECHERCHE DES VARIANTS FONCTIONNELS DANS LES *LOCI* ASSOCIES AU RISQUE DE MALADIE D'ALZHEIMER

Si l'objectif initial des études d'association pangénomiques est d'identifier les gènes associés au risque de développer la pathologie, il s'agit ensuite de déterminer les variants fonctionnels responsables des associations observées, ainsi que les mécanismes biologiques par lesquels ils interviennent dans le développement de la maladie. En reliant les variants fonctionnels et les gènes cibles aux phénotypes moléculaires, cellulaires et pathophysiologiques de la maladie, la recherche génétique permet d'aider la médecine à élaborer des stratégies plus efficaces de prévention et de traitement des maladies. Les analyses post-GWAS visant à mieux comprendre l'implication des gènes dans l'étiologie de la MA permettent en effet l'identification de nouvelles potentielles cibles thérapeutiques et d'envisager la possibilité d'une prise en charge adaptée au patrimoine génétique de l'individu. Cependant, bien que des milliers de variants modulant le risque de MA aient été identifiés par les études d'association pangénomiques, les mécanismes moléculaires par lesquels ils agissent sont encore largement méconnus. Les analyses post-GWAS visent à identifier les variants génétiques causaux de la MA au sein de ces gènes, en se basant sur différentes approches en fonction de la localisation des variants associés au risque.

I) Analyse des variants codants

Les variants génétiques non-synonymes des régions codantes peuvent modifier la séquence d'acides aminés de la protéine. Parmi ceux-ci, les variants non-sens entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré sont généralement considérés comme à l'origine d'une perte de fonction. Ils peuvent en effet conduire à une élimination des transcrits aberrants par le *Non-sens mRNA Mediated Decay* (NMD) et/ou à la formation de protéines tronquées, très probablement dysfonctionnelles. Les effets des variants faux-sens, qui entraînent la substitution d'un acide aminé par un autre, sont quant à eux plus difficiles à évaluer. Ils peuvent affecter non seulement le repliement de la protéine et sa stabilité, mais aussi son expression, son adressage cellulaire, son activité, ou son affinité de liaison (370). L'impact de ces variants faux-sens peuvent aller de l'absence d'effet sur la fonction de la protéine à un dysfonctionnement significatif, mais peut également renforcer la fonction initiale de la protéine voire même conduire à l'acquisition d'une nouvelle fonction. Étant donné que la structure tridimensionnelle d'une protéine détermine sa fonction, une variété d'outils *in silico* permettent de prédire la pathogénicité des variants faux-sens, tels que Polyphen2 ou SIFT (371,372). Ces algorithmes de prédiction *in silico* sont parfois intégrés au sein d'un même outil de prédiction, comme VEP (Variant Effect Predictor), qui permet un gain de temps lorsque de nombreux variants sont identifiés dans le *locus* d'intérêt et permet de prioriser les variants pour lesquels les prédictions données par les différents algorithmes convergent. Si les logiciels de prédiction bioinformatiques suggèrent un effet

fonctionnel du ou des variant(s) en question, il convient ensuite de confirmer cette prédiction par la mise au point d'un essai biologique adapté à l'évaluation de la fonction de la protéine codée par le gène d'intérêt dans des cellules porteuses ou non du variant suspecté pour être fonctionnel. Dans le cadre de la MA, ce type d'approche a notamment été utilisée pour caractériser les conséquences fonctionnelles de variants non-synonymes R47H de *TREM2* et P522R de *PLCG2*.

Pour identifier l'impact de la mutation R47H associée à un risque augmenté de MA sur la fonction de la protéine *TREM2*, les chercheurs ont sur-exprimé le gène *TREM2* porteur ou non du variant dans une lignée cellulaire HEK293 et une lignée cellulaire de microglie murine (373). La présence du variant R47H était associée à une diminution de la sécrétion de *TREM2* soluble, suggérant que *TREM2* muté était retenu dans la cellule. Le mutant *TREM2* R47H a également montré une expression réduite dans la fraction membranaire des cellules microgliales, et a été associée à une altération de la phagocytose dans ces cellules.

Le variant génétique P522R du gène *PLCG2* a quant à lui été associé à une diminution du risque de MA (259). *PLCG2* catalyse l'hydrolyse du PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en DAG (diacyl-glycerol) et en IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate), ensuite dégradé en IP1 (inositol 1-phosphate), et conduit à une augmentation du calcium intra-cellulaire. Pour déterminer l'effet du variant sur la fonction enzymatique de la protéine, les chercheurs ont utilisé des cellules COS7 et HEK293 surexprimant la version sauvage ou mutée de *PLCG2* (374). En quantifiant la production d'IP3 par un essai radio-actif, la quantité d'IP1 par dosage ELISA, et les variations de calcium intra-cellulaire visualisés par le FURA-2-AM, ils ont ainsi pu montrer un effet hypermorphique de la mutation P522R sur la fonction de l'enzyme *PLCG2*.

II) Analyse des variants non-codants

De par son effet fonctionnel probable, l'identification d'un variant non-synonyme associé au risque de développer la MA encourage son étude approfondie par des analyses *in silico* et *in vitro*. Cependant, la majorité des variants identifiés par les GWAS sont localisés en dehors des régions codantes pour les protéines, ce qui indique que le mécanisme sous-jacent est très probablement une régulation d'expression génique. Les variants régulateurs peuvent avoir des effets modestes qui pourraient modifier la fonction des gènes de manière plus subtile par de multiples mécanismes impliquant notamment l'épissage de l'ARN, la liaison de facteurs de transcription, la méthylation de l'ADN et le recrutement de micro-ARNs.

Une autre difficulté, inhérente à la caractérisation des variants fonctionnels, est que la plupart des associations identifiées font partie d'une large région de variants corrélés entre eux. En effet, les variants proches les uns des autres peuvent être en fort déséquilibre de liaison (DL), c'est-à-dire qu'ils

sont génétiquement liés et systématiquement co-transmis de génération en génération. Le variant causal peut ainsi se trouver n'importe où dans le bloc de DL qui peut s'étendre sur plus de 100 kb et contenir plus de 1 000 variants (375). Toutefois, des projets de séquençage à grande échelle tels que les projets International HapMap, 1000 Genomes, ou TOPMed ont largement caractérisé le génome de nombreuses populations, ce qui a permis une meilleure définition de ces blocs et l'amélioration de la résolution des signaux GWAS (255,376–378).

Afin de prioriser les variants potentiellement fonctionnels au sein des *loci* associés à la MA dans les études d'association pangénomiques, plusieurs méthodes ont été développées. Elles intègrent (i) des analyses statistiques permettant une cartographie fine des variants potentiellement fonctionnels, (ii) des méthodes permettant de mettre en évidence un enrichissement en éléments fonctionnels dans les séquences génomiques encadrant les variants génétiques associés, et (iii) des analyses de co-localisation qui se basent sur l'hypothèse qu'un signal GWAS qui colocalise avec un trait moléculaire quantitatif (QTL) est probablement fonctionnel (**Figure 20**). La hiérarchisation des variants localisés dans les régions associées au risque de MA est essentielle pour permettre la conversion des associations statistiques en gènes cibles, et fournir des hypothèses reliant les signaux GWAS à la physiopathologie de la maladie.

a. Priorisation des variants par analyses statistiques

Classiquement, les résultats d'une GWAS sont présentés sous forme d'un Manhattan Plot qui permet de représenter les associations observées pour tous les variants génétiques testés (représentés par des points) selon leur position le long des 23 chromosomes (représentés par les chiffres sur l'axe des abscisses). Les niveaux d'association sont exprimés sur l'axe des ordonnées en indiquant les p-valeurs exprimées en logarithmique négative. Le plus souvent, une association est jugée significative au seuil de 5×10^{-8} (soit $-\log P > 8$), c'est-à-dire le seuil retenu après correction pour tests multiples (*i.e.*, $p = 0,05 / \text{nombre de variants génotypés}$). Puis chaque région du génome présentant une association significative est visualisée en détails par un Locus Zoom afin d'identifier les gènes de la région, et analyser la structure du DL local estimée par le r^2 . Comme les variants en fort DL font présenter une même significativité pour ces tests d'association avec le risque de développer la maladie, des méthodes supplémentaires sont nécessaires pour distinguer parmi eux, les variants probablement fonctionnels. Un certain nombre de méthodes ont été mises au point pour prioriser ces variants.

Afin de limiter le nombre de variant candidats potentiellement fonctionnels, une première approche consiste à considérer tous les variants dépassant un certain seuil de déséquilibre de liaison avec le variant le plus significativement associé au risque de maladie, appelé variant sentinelle, comme potentiellement causaux. D'autres analyses statistiques, les analyses conditionnelles Bayésiennes,

permettent d'évaluer le nombre de signaux indépendants au sein d'un *locus* associé à la maladie. Ces analyses consistent à tester une nouvelle fois l'association de chaque variant du *locus* avec la maladie par régression logistique après ajustement sur le variant sentinelle. Si l'association persiste, le variant en question peut être considéré comme un signal indépendant et donc d'intérêt potentiel pour les analyses fonctionnelles.

A l'aide de ces méthodes, les régions identifiées par les études GWAS peuvent être affinées à un nombre réduit de variants.

b. Priorisation des variants localisés dans des régions annotées comme fonctionnelles

La deuxième étape consiste à prioriser les variants associés de façon indépendante au risque de MA sur la base des annotations fonctionnelles du génome obtenues grâce au développement des techniques de séquençage. Les projets axés sur la compréhension de la fonction du génome non-codant ont débuté principalement avec le projet ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements), qui agrège des informations sur la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones, sur la liaison des facteurs de transcription, ou encore sur les sites d'hypersensibilité à la DNase (DHS ou *DNase I-hypersensitive site*), fournies par des analyses de ChiP-seq, DNase-seq, et ATAC-seq dans de nombreux types cellulaires (379). Deux consortiums ultérieurs, le FANTOM5 et le NIH Roadmap Epigenomics Consortium, ont également participé à cette initiative. FANTOM5 a permis de dresser des cartes des transcrits, des facteurs de transcription, des promoteurs et des enhanceurs dans différents types de cellules (380). Le NIH Road-map Epigenomics Consortium s'est quant à lui concentré sur la cartographie de la méthylation de l'ADN, des modifications des histones et de l'accessibilité de la chromatine (381).

Ces différentes informations permettent de mettre en évidence les régions transcriptionnellement actives du génome, et on peut s'attendre à ce que les variants génétiques situés dans ces éléments fonctionnels soient plus susceptibles de perturber l'expression de ces gènes. De nombreux outils permettent d'annoter facilement les variants génétiques en fonction de leur localisation génomique et de leurs conséquences fonctionnelles potentielles. Ces approches complètent les techniques statistiques décrites ci-dessus, car elles apportent des sources d'information indépendantes sur ce que chaque variant est susceptible de provoquer sur le plan biologique, plutôt que sur la solidité des preuves génétiques. Les outils Variant Effect Predictor (VEP) d'Ensembl et ANNOVAR peuvent tous deux être facilement intégrés dans des pipelines d'analyse et présentent l'avantage d'agrèger les annotations fonctionnelles provenant de différentes bases de données (382,383).

Il est également possible de combiner ces annotations fonctionnelles avec d'autres données basées notamment sur la conservation évolutive du génome. En effet, les régions génomiques les plus conservées au cours de l'évolution sont celles qui sont probablement le plus soumises à des contraintes fonctionnelles. L'inclusion des données de conservation permet donc de classer les variants sur la base de la contrainte évolutive. Les outils *in silico* d'annotation des variants ou de prédiction fonctionnelle qui incluent ce type d'analyses sont par exemple ANNOVAR et HaploReg (383,384). De puissants modèles d'apprentissage informatique tels que genome-wide annotation of variants (GWAVA) (385), combined annotation-dependent depletion (CADD) (386), et DeepSEA (387) intègrent à la fois des données fonctionnelles et des données de conservation pour constituer des algorithmes de prédiction de la fonctionnalité des variants non-codants. Certains de ces outils ont été utilisés afin de hiérarchiser les variants pathogènes associés à la MA par l'attribution d'un score et ainsi de sélectionner les variants potentiellement fonctionnels pour des analyses *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles adaptés (388).

c. Priorisation des variants par analyses de co-localisation des traits moléculaires quantitatifs (QTL)

Les approches de profilage -omiques peuvent être utilisées pour étudier les bases génétiques de la variation de phénotypes ou traits moléculaires. Dans ces analyses, le *locus* génomique sous-jacent à la variation du trait mesuré est appelé *locus* de trait quantitatif ou QTL. Ces études menées chez l'homme à des niveaux moléculaires ont considérablement accru nos connaissances sur les conséquences fonctionnelles des variants génétiques. L'essor des analyses génomiques, transcriptomiques et protéomiques a donné lieu à des dizaines d'études de cartographie des profils d'expression des gènes (eQTL), des protéines (pQTL), des métabolites (mQTL), de la méthylation de l'ADN (mQTL), ou encore de l'épissage des exons (sQTL) au sein de multiples types cellulaires (389).

L'analyse de colocalisation consiste à identifier si deux jeux de données d'association partagent un ou plusieurs variants génétiques causaux. Ici, on cherche à identifier les variants génétiques associés au risque de MA qui sont colocalisés avec les variants considérés comme QTL, c'est-à-dire dont le génotype est associé à un trait moléculaire, qu'il s'agisse d'un transcrit, d'une protéine, d'un métabolite ou d'une modification épigénétique. Pour chaque variant, il est ainsi possible de calculer une probabilité postérieure de causalité (PIP pour Posterior Inclusion Probability) qui, lorsqu'elle est significative, indique que le variant considéré est un variant causal commun aux deux jeux de données d'association (i.e. GWAS et QTL).

i. eQTL

Les *loci* génomiques qui sous-tendent la variation de l'expression des gènes, aussi appelés *loci* de traits quantitatifs d'expression (eQTL), peuvent fournir des informations fonctionnelles cruciales.

Sur la base de la distance physique entre l'eQTL et le gène affecté, l'eQTL peut être classé comme cis-eQTL ou trans-eQTL. Un cis-eQTL se rapporte à un variant influençant l'expression d'un gène qui se trouve à proximité, tandis que les trans-eQTL sont des paires variant-gène qui sont plus éloignés l'un de l'autre, pouvant parfois même se trouver sur des chromosomes différents. Les trans-eQTL peuvent affecter des gènes qui n'avaient pas été identifiés auparavant par les GWAS et leurs études revêt un intérêt important pour déterminer les voies moléculaires reliant un variant génétique à l'expression d'un gène, et potentiellement à la physiopathologie d'une maladie.

ii. pQTL et mQTL

Les études eQTL se sont révélées très utiles en génomique fonctionnelle, mais pour obtenir une image complète des processus cellulaires impliqués, il faut utiliser d'autres approches -omiques, et évaluer l'impact potentiel des variants au niveau des protéines et des métabolites. En effet, il existe plusieurs autres mécanismes par lesquels un variant fonctionnel pourrait influencer le risque de maladie notamment par le biais d'effets sur la traduction ou la stabilité de la protéine, sans effet sur l'ARNm. Jusqu'à 1/3 des variants qui sont associés à des modulations aux niveaux de protéines (pQTL), n'influence pas les niveaux d'ARNm de ces mêmes gènes (390). Avec le développement des technologies à haut débit, comme la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse, un nombre croissant de protéines et de métabolites peuvent être quantifiés. L'étude de l'effet de variants génétiques à de multiples niveaux moléculaires permet de fournir une vue d'ensemble des effets des variants génétiques associés à la maladie.

iii. Une régulation tissu-spécifique

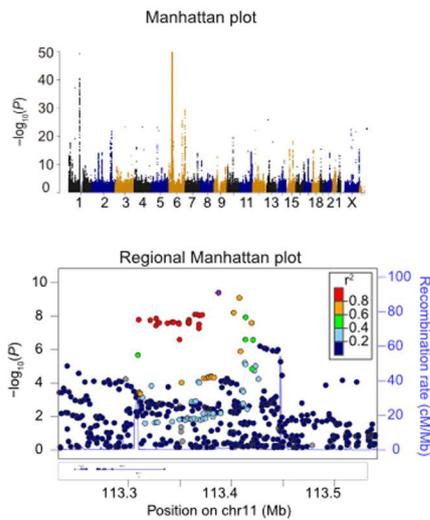
Les variants génétiques peuvent réguler l'expression des gènes de manière différente en fonction du type de cellule, du tissu, et de l'environnement. Bien que la plupart des cis-eQTLs montrent une association concordante entre différents échantillons, une certaine proportions de variants exerce un effet spécifique en fonction du type cellulaire (391). Le programme *Genotype-Tissue Expression* (GTEx) du *Broad Institute* vise à créer un atlas public complet de l'expression et de la régulation des gènes dans de multiples tissus humains (392). Il est également possible de consulter plus spécifiquement les banques d'expression d'ARNm dans les cerveaux des patients atteints de MA disponibles sur le portail *AMP-AD knowledge* pour savoir si un gène localisé à proximité ou à distance d'un variant associé au risque présente une expression différente entre cerveaux sains et cerveaux atteints de MA (393). Ces études sont néanmoins limitées par le fait que certains types de tissus, comme le tissu cérébral, sont difficiles à obtenir, ce qui complique l'obtention d'un nombre représentatif d'échantillons porteurs des variants génétiques d'intérêt.

iv. Les études TWAS

Un autre moyen d'obtenir des informations sur les traits quantitatifs complexes consiste à tester directement l'association entre un variant et l'expression des gènes, c'est-à-dire à identifier les gènes qui sont exprimés à un niveau significativement différent chez les cas par rapport aux témoins dans les types de cellules liés à la maladie. Néanmoins, la réalisation de telles études est en pratique limitée par la nécessité de disposer du profil d'expression génique de tissus ou cellules provenant de centaines de milliers d'individus atteints ou non de la MA. Il est néanmoins possible de prédire les profils d'expression génique spécifiques à un type de cellule sur la base des génotypes (389). Les études d'association à l'échelle du transcriptome (TWAS) exploitent les informations des catalogues GWAS et eQTL pour prédire le transcriptome des cas et des témoins, ce qui permet d'associer directement les variants génétiques et l'expression des gènes.

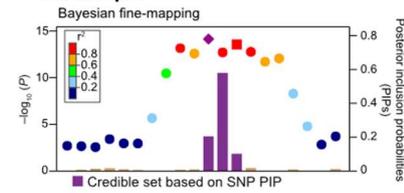
Les TWAS utilisent des cartes eQTL spécifiques aux tissus comme ensembles de données de référence pour constituer des modèles prédictifs qui utilisent le génotype d'un individu comme donnée d'entrée et estiment le niveau d'expression des gènes pour chaque génotype comme données de sortie. Comme les TWAS associent directement les variants à l'expression des gènes, elles ont l'avantage de mettre en évidence la direction des effets, et permettent de déterminer si le variant est responsable d'une diminution d'expression d'un gène, ou de son augmentation.

A. Liste de variants associés à la maladie

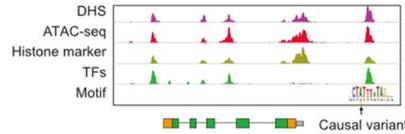


B. Priorisation des variants par analyse :

• Statistique



• Des annotations fonctionnelles du génome



• De la co-localisation des traits moléculaires quantitatifs (QTL)

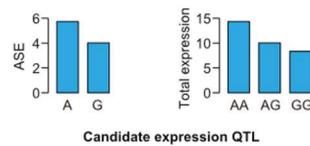


Figure 20 : L'étude des variants non-codants. A. Représentation des variants identifiés comme associés au risque de maladie par les études GWAS sous forme de Manhattan plot. B. Méthodes de priorisation des variants non-codants. Ces méthodes intègrent (i) des analyses statistiques permettant une cartographie fine des variants potentiellement fonctionnels, notamment par les méthodes Bayésiennes (ii) des méthodes permettant de mettre évidence un enrichissement en annotations fonctionnelles dans les séquences génomiques des variants et (iii) des analyses de co-localisation qui se basent sur l'hypothèse qu'un signal GWAS qui colocalise avec un trait moléculaire quantitatif (QTL) est probablement fonctionnel (394).

Ces analyses eQTL et TWAS permettent d'identifier les variants génétiques modulant l'expression d'un gène. Cependant, elles ne suffisent pas à comprendre la chaîne complète d'événements.

d. Comment le variant génétique influence-t-il l'expression génique ?

Un variant peut conduire à influencer l'expression génique par de multiples mécanismes, par exemple en modifiant la méthylation de l'ADN, l'épissage d'un transcrit, la fixation d'un facteur de transcription, ou la fixation de micro-ARNs.

Les analyses mQTL permettent d'étudier la corrélation entre un variant génétique et la méthylation de l'ADN. L'épissage de l'ARNm peut également être régulé par des variants présents dans les sites donneurs, accepteurs ou régulateurs d'épissage, introniques ou exoniques, et les études sQTL peuvent permettre d'identifier les variants responsables d'un épissage alternatif influençant en aval, la diversité qualitative des protéines produites dans un type cellulaire donné. Lorsqu'un variant génétique associé à la MA est ainsi suspecté d'influencer l'épissage d'un transcrit, cette hypothèse peut être explorée expérimentalement par des expériences *in vitro* de minigènes rapporteurs.

Les études ChIP-Seq (*Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*), qui permettent l'étude des interactions ADN/protéine à l'échelle du génome, ont quant à elle permis de dresser une carte des régions transcriptionnellement actives caractérisée par la présence de modifications post-traductionnelles des histones, ainsi que de définir les différents sites de liaison de l'ADN pour les facteurs de transcription. En consultant les bases de données ChIP-Seq fournies dans ENCODE, Roadmap ou FANTOM, il est ainsi possible de déterminer si le variant génétique se situe dans une région régulatrice de l'expression des gènes. De plus, certains outils de prédiction bioinformatiques permettent d'évaluer, *in silico*, le potentiel des variants génétiques à modifier la fixation de facteurs de transcription via l'analyse de motifs. Ce type d'analyse se base sur des modèles de motifs de fixation des facteurs de transcription observés de façon expérimentale, et permet ainsi d'évaluer la capacité d'un variant à fixer un facteur de transcription de façon différentielle selon les allèles.

Plus récemment, la mise à disposition de données de capture de la conformation de la chromatine à l'échelle du génome (HiC) permet également d'analyser si la séquence génomique encadrant le variant d'intérêt interagit physiquement avec une autre région génomique localisée à distance. Ces données ont notamment été intégrées à l'algorithme de prédiction fonctionnelle nommé GWAS3D.

Pour finir, les variants peuvent moduler la fixation des micro-ARNs. Plusieurs études ont montré que les micro-ARNs exprimés dans le système nerveux central jouaient un rôle important dans la différenciation neuronale et la plasticité synaptique (395). De plus, on sait qu'il existe une dérégulation des micro-ARNs dans les cerveaux des patients atteints de MA, et que cette dérégulation est fortement corrélée à la densité des plaques amyloïdes des tissus adjacents (396). Les micro-ARNs ciblent les ARNm en reconnaissant leurs séquences complémentaires dans les 3'UTR. Les variants peuvent affecter les fonctions répressives des micro-ARNs en modifiant la séquence complémentaire des ARNm cibles. L'influence des variants sur la liaison des micro-ARNs peut être prédite à l'aide de différents outils bioinformatiques tels que miRNASNP (397) et mrSNP (398). Dans ce contexte, une étude *in silico* systématique de la régulation par les micro-ARNs des gènes identifiés par GWAS a été menée au laboratoire. Plus particulièrement, cette analyse a cherché à identifier dans les 3'UTR de ces gènes, des variants associés au risque de développer la MA capables de modifier la fixation de micro-ARNs (399). Les analyses réalisées ont ainsi permis de mettre en évidence l'impact potentiel du variant génétique rs7143400 situé dans la région 3'UTR du gène *FERMT2*. Ce variant, qui consiste en la substitution d'une guanine (G) par une thymine (T), est associé à un risque augmenté de développer la MA (OR=1.09 [1.04-1.15]), et crée un site de liaison parfait pour le micro-ARN 4504 (miR-4504).

III) Validation expérimentale de la fonctionnalité des variants

Les analyse *in silico* des variants associés à la maladie décrites précédemment permettent de faire des hypothèses quant à la fonctionnalité de ces variants. Néanmoins, la validation expérimentale *in vitro/vivo* reste nécessaire pour démontrer la réalité de ces mécanismes et établir une relation de cause à effet entre les variants et la maladie (400).

a. Etudes de l'interaction gène-facteur de transcription, et gène-gène

Comme mentionné ci-dessus, la grande majorité des variants GWAS non codants sont situés dans les éléments fonctionnels qui sont souvent occupés par des facteurs de transcriptions, et peuvent réguler des gènes à grande distance par l'intermédiaire de boucles chromatinienne. Des techniques classiques de biologie moléculaire telles que retards sur gels (*Electrophoretic Mobility Shift Assays* ou EMSA) ou l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) sont ainsi largement utilisées pour évaluer les effets des variants génétiques sur la fixation de facteurs de transcription. Les techniques de capture de la conformation de la chromatine permettant d'étudier l'interaction physique entre 2 séquences génomiques (3C) permettent quant à elles d'étudier l'effet potentiel d'un variant sur l'expression d'un gène situé à distance. Ainsi, la mise en évidence par 3C d'un contact physique entre un élément régulateur distal porteur d'un variant génétique et un promoteur, peut être considérée comme un argument en faveur d'une fonction régulatrice de la séquence contenant le variant d'intérêt, cette fonction régulatrice étant susceptible de varier selon les allèles.

b. Analyses de gènes rapporteurs luciférase

Les analyses de gènes rapporteurs offrent quant à elles la possibilité de mesurer directement l'effet fonctionnel d'un variant sur le niveau d'expression génique. Elles consistent à cloner la séquence régulatrice contenant le variant d'intérêt en amont d'un promoteur et d'un gène rapporteur luciférase dans des plasmides qui seront ensuite transfectés dans des cellules eucaryotes, et à comparer l'expression du gène rapporteur dans les cellules exprimant la version mutée du plasmide par rapport à celles exprimant la version sauvage correspondante. Étant donné que certains éléments régulateurs sont spécifiques à un type cellulaire, il convient de prêter attention aux choix du modèle dans lequel les variants d'intérêt sont testés. Les prédictions *in silico* détaillées précédemment peuvent suggérer le type de cellule dans lequel un variant peut exercer un effet régulateur, et aider au choix du modèle cellulaire approprié.

Plutôt que de tester l'effet de chaque variant associé à la MA un à un par des analyses de gènes rapporteurs individuelles, plusieurs groupes ont mis au point des essais MPRA (*Massively Parallel Reporter Assays*), dans lesquels des milliers de variants peuvent être testés en une seule expérience (401). Brièvement, les MPRA consistent à cloner en masse des dizaines voire des centaines de milliers

de séquences régulatrices candidates porteuses de variants d'expression associés au risque de maladie. Les MPRA utilisent le séquençage de nouvelle génération, pour mesurer simultanément l'expression de ces milliers de constructions de gènes rapporteurs dans le même échantillon. L'élément régulateur porteur du variant d'intérêt est incorporé dans la région non traduite d'un gène rapporteur porteur d'un code barre oligonucléotidique, et l'expression du gène rapporteur avec son code barre est ensuite mesurée par RNAseq. L'ADN du vecteur est également séquencé et l'activité de chaque variant est alors exprimée sous la forme du rapport ARN/ADN. Des études MPRA ont notamment permis d'évaluer l'effet de 5706 variants sur l'expression des gènes, et d'identifier 320 variants fonctionnels au sein de 27 gènes associés à la MA (402). La plupart des études MPRA sont réalisées dans des cultures de lignées cellulaires, mais certains chercheurs sont parvenus à le transposer à des modèles murins. Par exemple, une librairie de MPRA a été intégrée avec succès dans un vecteur AAV9 capable d'une transduction neuronale efficace, et les activités d'environ 3500 éléments cis-régulateurs ont été évaluées dans le cortex cérébral de souris (403).

L'analyse de l'expression d'un gène rapporteur luciférase est une méthode relativement simple et rapide à mettre en place, mais cette construction synthétique exogène ne rend pas compte de la complexité des mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation de l'expression génique. Ainsi, il reste essentiel de pouvoir confirmer l'impact des variant sur l'expression endogène du gène.

c. Etude de l'impact de la régulation du gène par le variant sur les phénotypes associés à la MA

Plusieurs études ont cherché à établir un lien fonctionnel entre les niveaux d'expression du gène causal et les phénotypes liés à la maladie, mais bon nombre de ces études reposent sur des approches de surexpression, ou d'inactivation complète d'un gène. Les techniques d'éditions du génome par CRISPR/Cas9 permettent quant à elle d'introduire directement le variant d'intérêt au sein du génome de la cellule, et d'entraîner des modifications d'expression du gène plus subtiles et plus physiologiques. Elle est ainsi devenue l'approche la mieux appropriée pour déterminer les effets phénotypiques des modifications de l'expression de gènes spécifiques d'un allèle.

i. La technologie CRISPR-Cas9

Le système CRISPR/Cas9 se compose de deux éléments : (i) la nucléase Cas9, et (ii) l'ARN guide (**Figure 21**). Ce dernier est lui-même constitué d'un crRNA (*crispr RNA*) constitué de 20 bases complémentaires à la cible génomique à éditer, reliées par une boucle à un tracrRNA (*trans-activating crRNA*) dont la structure tertiaire en double brin permet la liaison à la Cas9. La technologie CRISPR/Cas9 est une méthode d'ingénierie génétique qui permet de modifier et d'éditer le génome avec une grande précision (404). L'endonucléase Cas9 est amenée par l'ARN guide jusqu'à sa cible, et reconnaît tout

d'abord une séquence spécifique de 3 nucléotides NGG (nucléotide-guanine-guanine) appelée *protospacer adjacent motif* (PAM), puis se lie à l'ADN par l'intermédiaire de l'ARN guide. L'exigence d'une séquence PAM limite largement les régions génomiques pouvant être ciblées par les systèmes CRISPR/Cas9. Afin d'élargir le champ des régions génomiques ciblées, les chercheurs ont conçu de nouvelles protéines Cas de manière à ce qu'elles puissent reconnaître un panel de PAM plus large. La protéine Cas9 induit ensuite une cassure double brin trois bases en amont du PAM. En présence d'une séquence d'ADN donneur, cette séquence pourra être réparée par recombinaison homologue (*homology directed repair* ou HDR). La recombinaison homologue est un mécanisme de réparation endogène fidèle, permettant l'échange de fragments d'ADN entre des doubles brins possédant des séquences identiques. L'apport d'un ADN donneur porteur, soit de l'allèle fréquent, soit de l'allèle à risque, permettra d'obtenir des cellules éditées isogéniques ne différant que pour les génotypes d'un variant d'intérêt.

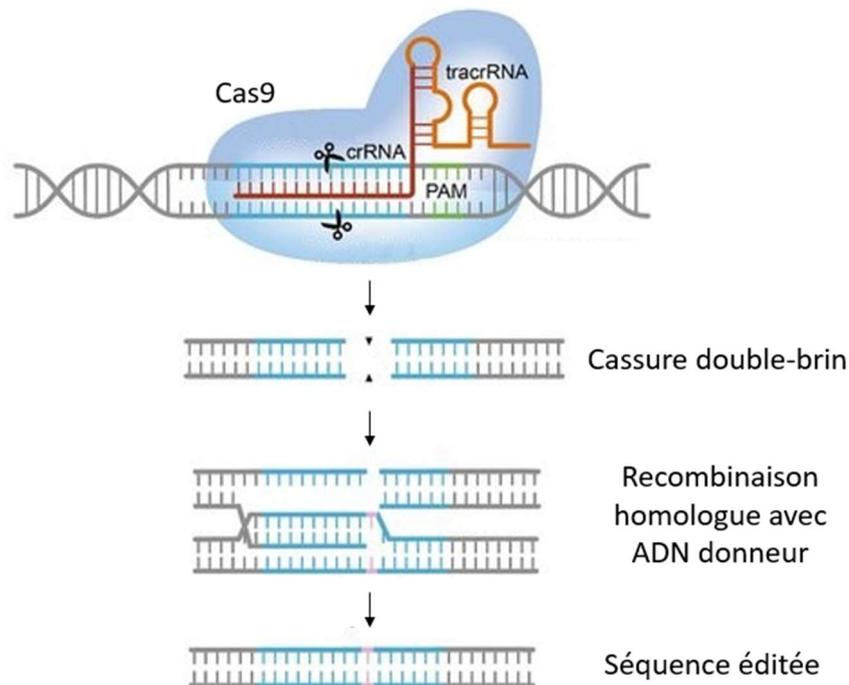


Figure 21 : Edition du génome par CRISPR/Cas9. L'ARN guide composé d'un crRNA et d'un tracrRNA s'associe avec la nucléase Cas9 et entraîne une cassure double-brin de la séquence génomique complémentaire à l'ARN guide. En présence d'un ADN donneur, cette cassure peut être réparée par recombinaison homologue et conduire à l'édition précise du génome (405).

Malgré de nombreuses applications potentielles en génétique fonctionnelle, les outils d'édition du génome CRISPR/Cas ont encore leurs limites (394). Tout d'abord, l'efficacité de l'édition du génome dépend fortement d'une multitude de facteurs, dont le type cellulaire et la méthode de transfection/transduction des éléments du système CRISPR/Cas. De plus, lorsque le système CRISPR reconnaît des séquences homologues à la séquence cible, des mutations hors-cible peuvent se produire.

La production par technologie CRISPR Cas9 de lignées cellulaires isogéniques ne différant que pour les allèles d'un variant d'intérêt permet d'étudier de manière directe l'impact de variants sur l'expression endogène du gène associé, et sur différents phénotypes associés à la MA. Cette approche peut s'appliquer facilement aux lignées cellulaires cancéreuses ou immortalisées, mais ce modèle ne s'avère pas très représentatif de la physiopathologie humaine. Les cultures primaires de cellules sont plus pertinentes mais leur difficulté de transduction, et leur impossibilité à s'expandre constituent des limites importantes. Les iPSCs, qui peuvent être différenciées en divers types cellulaires, constituent ainsi un modèle de choix pour étudier les conséquences moléculaires des variants génétiques et évaluer leurs impacts sur des phénotypes cellulaires en lien avec la MA. De nombreuses études ont intégré les technologies d'édition du génome aux études basées sur les iPSCs afin d'étudier les fonctions des variants et des gènes dans la MA (406).

ii. L'édition par CRISPR/Cas9 de cellules iPSCs pour l'étude des variants génétiques associés à la MA

Les premières études mettant à profit les technologies d'édition du génome par CRISPR/Cas9 et les modèles cellulaires dérivés d'iPSCs ont cherché à caractériser l'impact des mutations responsables de formes familiales de la MA. En 2016, Paquet et al. ont introduit des mutations de l'*APP* et de *PSEN1* dans des iPSCs humaines par la technique CRISPR/Cas9 et montré des niveaux plus élevés d'A β dans les neurones induits mutants par rapport aux contrôles isogéniques (407). En étudiant un large panel de plus de 15 mutations familiales de la MA dans les même deux gènes, Kwart et al. ont mis en évidence un mécanisme commun d'accumulation du fragment β -CTF par l'intermédiaire de dysfonctions lysosomales (408). Ortiz-Virumbrales et al. ont quant à eux rapporté que les lignées cellulaires porteuses de la mutation N141I de *PSEN2* présentaient une augmentation de l'A $\beta_{1-40/1-42}$ et une perturbation de l'activité électrique dans des neurones cholinergiques dérivés d'iPSCs, normalisée après la correction par CRISPR/Cas9 de la mutation (409).

L'utilisation de modèle iPSCs a également pour avantage de permettre l'étude de l'effet des variants génétiques dans différents types cellulaires. Oksanen et al. ont par exemple étudié l'effet des mutations du gène *PSEN1* dans un modèle d'astrocytes dérivés d'iPSCs (410). Les astrocytes porteurs de la mutation présentaient une production plus importante d'A β , une sécrétion altérée des cytokines,

et une dyshoméostasie calcique. En utilisant le même modèle d'iPSCs, Oikari et al. ont quant à eux étudié l'impact de ces mutations sur la formation de la barrière hémato-encéphalique dans des cellules endothéliales cérébrales induites (411). Les cellules endothéliales mutantes montraient une expression anormale des protéines des jonctions serrées et des jonctions adhérentes.

La même stratégie d'édition du génome de cellules iPSCs a pu être mise à profit pour étudier l'effet des variants génétiques des formes sporadiques de MA. Plusieurs chercheurs ont notamment cherché à caractériser l'effet de l'allèle $\epsilon 4$ de l'APOE, qui représente le premier facteur de risque génétique des formes communes de MA. Wadhvani et al. ont étudié l'effet de l'allèle $\epsilon 4$ dans des iPSCs provenant de deux patients atteints de la MA, par rapport à l'allèle $\epsilon 3$ insérée par CRISPR/Cas9 dans les mêmes cellules (412). Les cellules $\epsilon 4$ présentaient une augmentation de la phosphorylation de Tau par rapport aux cellules $\epsilon 3$, ce qui contribuait à la dysrégulation du calcium et à la mort cellulaire. Lin *et al.* ont quant à eux évalué l'impact de l'allèle $\epsilon 4$ dans un modèle plus complexe d'organoïdes 3D, et ont montré que l'allèle $\epsilon 4$ conférait un risque plus important de développer la MA en perturbant la clairance de l'A β par les astrocytes et les cellules microgliales (413).

L'effet de certains autres variants génétiques identifiés par les études GWAS comme facteurs de risque génétiques de la MA ont également été évalués dans ces mêmes modèles cellulaires. A titre d'exemples, une étude basée sur un modèle d'astrocytes induits à partir d'iPSCs a notamment montré que l'allèle à risque du variant rs11136000 du gène *CLU* fixait préférentiellement la protéine TDP-43, augmentant ainsi l'expression de *CLU* et favorisant l'inflammation (414). Dans des modèles de cellules microgliales induites à partir d'iPSCs, Cosker et al. ont montré que la présence du variant R47H du gène *TREM2* empêchait la réponse normale de la microglie aux dommages cellulaires, et contribuait à la progression de la MA (415). Enfin, une étude montre que les cellules microgliales porteuses du variant protecteur P522R du gène *PLCG2* générées par CRISPR/Cas9 possèdent une plus grande capacité de clairance de l'A β (299).

iii. Les avantages de l'utilisation de modèles cellulaires iPSCs pour modéliser la MA

Les modèles cellulaires issus d'iPSCs offrent l'opportunité unique d'étudier *in vitro* les cellules issues de patients atteints de MA, et récapitulent bien les différents aspects de la pathologie. Une étude a notamment examiné la corrélation de la pathologie de la MA dans des neurones corticaux d'iPSCs, par rapport aux données cérébrales des mêmes patients (416). Les corrélations étaient très convaincantes entre les niveaux d'A β provenant du lysat cellulaire des neurones iPSCs et le nombre de plaques neuritiques observées dans les cerveaux des patients. Il existait également une bonne corrélation entre les niveaux de protéine Tau phosphorylée produits par les neurones corticaux dérivés d'iPSCs détectés par l'anticorps AT8 et les niveaux de protéine Tau phosphorylée trouvés dans les

cerveaux des patients correspondants. En plus des pathologies amyloïde et Tau, les modèles d'iPSCs récapitulent bien les déficits synaptiques et neuronaux retrouvés dans les cerveaux des patients atteints de MA. Plusieurs études ont fait état d'une diminution de la longueur des neurites et de la ramification dendritique dans les neurones dérivés d'iPSCs issus de malades (417). Les neurones issus d'iPSCs modélisant la MA présentent également une réduction des synapses, et une altération de l'excitabilité (418,419).

La plupart des études réalisées jusqu'à présent se sont concentrées sur l'étude des neurones corticaux dans des cultures en 2D. Cependant, au cours des dernières années, des progrès ont été réalisés dans la création de systèmes plus complexes pour recréer la MA en utilisant des cultures cellulaires multiples, soit en 2D (co-cultures ou cultures triples), soit en utilisant des organoïdes cérébraux cultivés en suspension en 3D (420,421). L'émergence de cultures triples en 2D contenant des neurones, des astrocytes et de la microglie permet d'obtenir des phénotypes de neurones plus matures et permet d'étudier les événements liés au système immunitaire. Néanmoins, il manque encore des éléments dans ces cultures, notamment le système vasculaire. Les organoïdes présentent quant à eux plusieurs types cellulaires et peuvent s'auto-organiser à partir des progéniteurs résidant en leur sein. Ces cultures 3D permettent ainsi de mimer la complexité du parenchyme cérébral.

Certaines limites subsistent tout de même dans le domaine des cultures iPSCs, notamment les conditions expérimentales longues pour créer des neurones matures et les coûts élevés des milieux qui limitent leur utilisation systématique (417). Malgré cela, les iPSCs restent un excellent modèle cellulaire pour appréhender les mécanismes complexes de la MA, et représentent une approche de choix pour étudier l'impact des variants génétiques associé au risque de développer la maladie.

OBJECTIFS DE LA THESE

La majorité des formes de MA sont dites sporadiques et résultent de l'interaction entre facteurs environnementaux et facteurs génétiques. Bien que le principal facteur de risque soit l'âge, la part de risque attribuable aux facteurs génétiques (60%-80%) se montre particulièrement importante pour une maladie multifactorielle (243). Le développement des études d'association pangénomiques, menées notamment au laboratoire, ont d'ores et déjà permis l'identification de nombreux *loci* associés au risque de MA (86). La perte synaptique étant l'aspect neuropathologique précoce de la MA le mieux corrélé au déclin cognitif, l'hypothèse que nous nous proposons de tester est que la diminution de densité synaptique observée au cours du développement de la MA pourrait dépendre, au moins en partie, de facteurs génétiques.

Pour évaluer au mieux l'impact des déterminants génétiques de la MA sur la perte synaptique, il est nécessaire de réaliser l'analyse de tous les gènes identifiés dans les études GWAS. Or, la validation fonctionnelle d'un si grand nombre de gènes par des approches classiques de biologie cellulaire s'avère longue et fastidieuse. Le criblage à haut-contenu (HCS), qui permet l'analyse systématique de données multiparamétriques au niveau cellulaire en combinant les techniques de microscopie à fluorescence automatisée et d'imagerie quantitative, semble être une approche adaptée pour répondre à cette problématique. De plus, même après avoir élucidé la fonction des gènes associés au risque de MA, il reste encore à identifier les variants fonctionnels de ces gènes, et les mécanismes moléculaires reliant ceux-ci au développement de la pathologie.

Dans ce contexte, l'objectif principal de mes travaux de thèse a été de mettre en évidence l'implication potentielle des gènes et des variants associés au risque de MA sur la densité synaptique. Mes travaux se sont articulés selon trois axes, résumés ci-après. Dans un premier temps, j'ai développé une méthodologie de criblage HCS afin d'évaluer l'effet de la sous-expression de gènes associés au risque de MA sur la densité synaptique, par transduction lentivirale d'une banque de shARNs dans des cultures primaires de neurones hippocampiques de rats. Ces travaux ont donné lieu à une publication, intitulée "High-content screening of synaptic density modulators in primary neuronal cultures", dans la revue *Current Protocols in Neuroscience*, en tant que premier auteur.

Dans un deuxième temps, j'ai mis à profit ce modèle pour étudier l'impact sur la densité synaptique, d'une banque de 198 shARNs ciblant les gènes associés au risque de développer la MA par les études GWAS. De manière surprenante, l'un des gènes dont la sous-expression impactait le plus négativement la densité synaptique était le gène *PLCG2*, dont la fonction neuronale était jusqu'ici inconnue. Je me suis donc ensuite attachée à caractériser de manière plus précise l'impact de ce gène sur l'activité électrique neuronale, et sur des phénotypes classiquement associés à la MA comme le

métabolisme de l'APP ou la phosphorylation de Tau, dans un modèle de neurones humains issus d'iPSCs. Ces travaux ont donné lieu à la rédaction d'un article intitulé « Revealing the impact of the Alzheimer genetic risk factor *PLCG2* on synaptic functions and Alzheimer-related pathophysiological hallmarks », que je signe en co-premier auteur.

Pour finir, un autre criblage HCS évaluant l'impact de l'ensemble des gènes (n=18107) sur le métabolisme de l'APP, mis en place avant mon arrivée au laboratoire, avait permis d'identifier le gène *FERMT2* comme un modulateur potentiel de la pathologie amyloïde (277). Tout comme le gène *PLCG2*, la sous-expression de *FERMT2* par un shARN a montré un impact négatif sur la fonction synaptique et l'activité électrique neuronale. Or des résultats issus d'analyses bioinformatiques suggéraient que le variant rs7143400 localisé dans la région 3'UTR du gène pouvait être associé à une diminution du risque de développer la maladie par un effet potentiel sur la fixation de micro-ARNs (399). Dans le but de caractériser le rôle fonctionnel du variant rs7143400 de *FERMT2*, j'ai mis en place une approche d'édition du génome de cellules HEK293 par CRISPR/Cas9 et évalué l'impact de ce variant sur la régulation de l'expression du gène par le miR-4504, et sur le métabolisme de l'APP. Ces travaux ont donné lieu à la publication d'un article original intitulé "Alzheimer's genetic risk factor *FERMT2* (Kindlin-2) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner", dans la revue *Molecular Psychiatry*, en tant que deuxième auteur.

Dans leur globalité, mes travaux de thèse ont participé à (i) l'identification de plusieurs gènes impliqués dans la perte synaptique observée dans les stades précoces de la MA, et (ii) de mieux comprendre l'implication des variants des gènes *PLCG2* et *FERMT2* dans les mécanismes physiopathologiques à l'origine de cette maladie.

RESULTATS

Article 1 : HIGH-CONTENT SCREENING OF SYNAPTIC DENSITY MODULATORS IN PRIMARY NEURONAL CULTURES

Audrey Coulon¹, Dolores Siedlecki-Wullich¹, Chloé Najdek¹, Carla Gelle¹, Anne-Marie Ayrat¹, Florie Demiautte¹, Erwan Lambert¹, Alexandre Vandeputte², Priscille Brodin², Tiago Mendes¹, Jean-Charles Lambert¹, Devrim Kilinc¹, Julie Dumont¹, Julien Chapuis^{1,3}

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

²Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Lille, France.

³Corresponding author: julien.chapuis@pasteur-lille.fr

I) Contexte bibliographique et objectifs

La grande majorité des variants génétiques associés à la MA identifiés dans les études GWAS sont responsables d'une modulation des niveaux d'expression des gènes associés. En 2019, l'ensemble des études génétiques avait permis d'identifier 45 *loci* associés à un risque augmenté de développer la MA (269), et la finalisation récente du projet EADB a rendu possible l'identification de 31 *loci* supplémentaires (86). Au total, 76 *loci* regroupant plusieurs centaines de gènes ont ainsi été associés au risque de MA. La perte de synapses étant l'aspect neuropathologique le mieux corrélé au déclin cognitif, nous avons souhaité évaluer le potentiel rôle synaptique de ces nombreux gènes. Des travaux antérieurs du laboratoire décrivait une méthode permettant d'évaluer la densité synaptique de cultures primaires de neurones de rat par immunofluorescence d'un marqueur pré-synaptique et d'un marqueur post-synaptique (291). Cependant, étant donné le grand nombre de facteurs génétiques que nous souhaitions étudier, il était nécessaire de transposer ce modèle à une méthode de criblage à haut-contenu (HCS). Dans ce cadre, mon travail a donc consisté à adapter l'étude de la densité synaptique à la culture en plaques 384-puits, et à automatiser l'acquisition et l'analyse des images pour les rendre compatibles avec une approche HCS.

II) Résultats

J'ai mis au point un modèle HCS basé sur l'utilisation de cultures primaires de neurones hippocampiques de rats cultivés en plaque 384-puits, permettant d'induire la sous-expression des gènes par transduction de vecteurs lentiviraux exprimant des shARNs. Le criblage a été réalisé en deux temps, en utilisant deux banques de shARNs : la première ciblant les gènes identifiés jusqu'en 2019 (n=105), et la deuxième ciblant les gènes nouvellement identifiés dans le cadre du consortium EADB (n=93). Pour limiter le risque de faux-positifs, le criblage a été réalisé trois fois à partir de trois cultures indépendantes, avec chaque shARN présent en quadruplet, et à deux *multiplicity of infection* (MOI).

Les synapses sont visualisées par la co-localisation de la protéine pré-synaptique Synaptophysine et du marqueur post-synaptique Homer1. Le processus d'analyse d'images et de données a été entièrement automatisé, et les résultats du contrôle qualité démontrent la fiabilité de notre modèle.

III) Commentaires

L'intérêt de ce travail repose sur deux principaux facteurs :

- (i) L'automatisation et la miniaturisation de l'essai permettent l'étude simultanée d'un grand nombre de gènes

L'approche initialement développée par le laboratoire pour étudier la densité synaptique consistait en une analyse morphologique basée sur la réalisation d'immuno-marquages à partir de neurones primaires cultivés sur lames ou en systèmes microfluidiques (278,291). Mon travail a permis la mise au point des conditions de culture et l'automatisation des étapes d'immuno-marquages en format 384-puits tout en assurant le maintien de l'intégrité de la culture neuronale et des synapses, qui sont des structures particulièrement fragiles. Le grand avantage de cette approche miniaturisée et automatisée est bien entendu sa capacité à évaluer l'impact de plusieurs centaines de gènes en une seule plaque, là où l'analyse d'une dizaine de conditions différentes prenait plusieurs semaines avec les méthodes précédemment utilisées.

- (ii) L'analyse de la co-localisation de deux marqueurs pré- et post-synaptique permet d'estimer de manière fiable la densité synaptique de cultures neuronales

Bien que la résolution des microscopes HCS ait été fortement améliorée au cours de la dernière décennie, la visualisation de petites structures comme les synapses (<100 nm) nécessite de travailler avec le plus fort grossissement disponible et complique l'acquisition d'images. La détection des synapses matures est également fortement améliorée par l'analyse de la colocalisation d'un marqueur présynaptique et d'un marqueur postsynaptique (plutôt que d'un marqueur unique), mais rend l'analyse d'images fastidieuse. En optimisant le nombre et le positionnement des images acquises par microscopie automatisée, nous avons pu valider le fait que ces marquages, associés à la qualité des images, étaient suffisamment performants pour estimer le nombre de synapses dans les cultures primaires de neurones de rats. Les scripts d'analyse d'images que nous avons développés permettent une mesure robuste de la densité synaptique, de manière rapide et automatisée, et peuvent ainsi être utilisés dans le cadre de la recherche sur les maladies où une perte de synapses est observée. Outre le criblage de banques de shARN, la méthodologie HCS mise en place pourrait être également transposée au criblage d'agents d'intérêts thérapeutiques potentiels pour les maladies neuro-dégénératives.

High-Content Screening of Synaptic Density Modulators in Primary Neuronal Cultures

Audrey Coulon,¹ Dolores Siedlecki-Wullich,¹ Chloé Najdek,¹ Carla Gelle,¹ Anne-Marie Ayrat,¹ Florie Demiautte,¹ Erwan Lambert,¹ Alexandre Vandeputte,² Priscille Brodin,² Tiago Mendes,¹ Jean-Charles Lambert,¹ Devrim Kilinc,¹ Julie Dumont,¹ and Julien Chapuis^{1,3}

¹Université de Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, Lille, France

²Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Lille, France

³Corresponding author: julien.chapuis@pasteur-lille.fr

Published in the Neuroscience section

The synapse, which represents the structural and functional basis of neuronal communication, is one of the first elements affected in several neurodegenerative diseases. To better understand the potential role of gene expression in synapse loss, we developed an original high-content screening (HCS) model capable of quantitatively assessing the impact of gene silencing on synaptic density. Our approach is based on a model of primary neuronal cultures (PNCs) from the neonatal rat hippocampus, whose mature synapses are visualized by the relative localization of the presynaptic protein Synaptophysin with the post-synaptic protein Homer1. The heterogeneity of PNCs and the small sizes of the synaptic structures pose technical challenges associated with the level of automation necessary for HCS studies. We overcame these technical challenges, automated the processes of image analysis and data analysis, and carried out tests under real-world conditions to demonstrate the robustness of the model developed. In this article, we describe the screening of a custom library of 198 shRNAs in PNCs in the 384-well plate format. © 2023 The Authors. *Current Protocols* published by Wiley Periodicals LLC.

Basic Protocol 1: Culture of primary hippocampal rat neurons in 384-well plates

Basic Protocol 2: Lentiviral shRNA transduction of primary neuronal culture in 384-well plates

Basic Protocol 3: Immunostaining of the neuronal network and synaptic markers in 384-well plates

Basic Protocol 4: Image acquisition using a high-throughput reader

Basic Protocol 5: Image segmentation and analysis

Basic Protocol 6: Synaptic density analysis

Keywords: automated microscopy • high-content screening • neurons • shRNA • synapses



Current Protocols e904, Volume 3

Published in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

doi: 10.1002/epz1.904

© 2023 The Authors. *Current Protocols* published by Wiley Periodicals LLC. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

Coulon et al.

1 of 24

How to cite this article:

Coulon, A., Siedlecki-Wullich, D., Najdek, C., Gelle, C., Ayrat, A.-M., Demiautte, F., Lambert, E., Vandeputte, A., Brodin, P., Mendes, T., Lambert, J.-C., Kilinc, D., Dumont, J., & Chapuis, J. (2023). High-content screening of synaptic density modulators in primary neuronal cultures. *Current Protocols*, 3, e904. doi: 10.1002/cpz1.904

INTRODUCTION

Failure to correctly regulate the number and distribution of synapses is a neuropathological feature shared by a variety of neurological and psychiatric disorders, such as autism (Monteiro & Feng, 2017), epilepsy (Wong & Guo, 2013), schizophrenia (Gigg et al., 2020), amyotrophic lateral sclerosis (Fogarty, 2019), Parkinson's disease (Bellucci et al., 2016), and Alzheimer's disease (AD) (DeKosky & Scheff, 1990). Identifying chemical or biological modulators of synaptic density may contribute to the understanding of pathophysiological mechanisms and to the identification of new therapeutic targets. Thus, our objective was to develop a medium-throughput assay to assess the impact of each currently known AD genetic risk factor (Bellenguez et al., 2022) on the synaptic density of primary neuronal cultures (PNCs).

In this context, high-content screening (HCS) of a library of short-hairpin RNAs (shRNAs) that individually target each of these genetic risk factors provides a powerful approach to systematically analyze their impact on synaptic density. Compared to high-throughput screening (HTS), which evaluates the activity of thousands of compounds in parallel in miniaturized biochemical or conventional cellular assays, HCS provides more biologically complex information through the use of fluorescence microscopy, multiplexing, and sophisticated image analysis at the cellular or sub-cellular scale. HCS can therefore be useful for studying diseases where the disease-associated cellular phenotypes are known but the underlying molecular mechanisms are not fully characterized, such as AD. To understand the implications of a quantitative analysis of synaptic density using HCS, several critical points should be considered. First, although the resolution of HCS/HTS microscopes has been strongly improved over the last decade, visualization of small structures such as synapses (<100 nm) requires one to work with the highest magnification available. Another important consideration is that the detection of mature synapses has been strongly improved by analyzing the colocalization of a presynaptic marker and a postsynaptic marker (Nieland et al., 2014; Verschuuren et al., 2019), even though this makes the image acquisition and analysis cumbersome. Second, these automated approaches require a robust and reproducible assay to overcome additional limitations, such as the complexity of the neuronal network and the heterogeneity in synaptic density in primary cultures. Third, the choice of synaptic markers used is also a critical point because antibodies may show non-uniform labeling (Verstraelen et al., 2020). Last, the majority of HCS methodologies aiming to visualize synapses are usually developed in the 96-well plate format, which limits screening capacity and/or increases the associated costs.

We recently developed an image analysis workflow that permits us to identify synapses by the proximity-based assignment of postsynaptic puncta to presynaptic puncta (Kilinc et al., 2020). The workflow is based on the detection of fluorescent puncta following immunolabeling of the endogenous synaptic proteins Synaptophysin and Homer1, and the automated analysis of their relative localization. Here, we adapted this workflow to

the 384-well plate format and used it in the HCS of a lentiviral shRNA library targeting 198 AD-associated genes (Bellenguez et al., 2022). The screen was organized in two parts: (i) the 105 genes we reported in 2019 (Kunkle et al., 2019) and (ii) the 93 genes we reported in 2022 (Bellenguez et al., 2022). The assay is reproducible and robust and therefore constitutes a promising medium-throughput screening tool to identify new compounds of potential therapeutic interest in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases.

In this article, we describe (i) the culture of primary hippocampal neurons in 384-well plates (Basic Protocol 1), (ii) their transduction with lentiviral shRNAs (Basic Protocol 2), (iii) the immunolabeling of synaptic and structural markers (Basic Protocol 3), (iv) image acquisition using a high-throughput reader (Basic Protocol 4), (v) the automated image analysis process (Basic Protocol 5), and (vi) synapse density quantification (Basic Protocol 6).

CULTURE OF PRIMARY HIPPOCAMPAL RAT NEURONS IN 384-WELL PLATES

This protocol is adapted from a classical protocol of primary hippocampal neuron culture (Kaech & Banker, 2006; see Current Protocols article: Mendes et al., 2020). The aim of HCS is to study the effect of a large number of compounds or genes in a limited time. To increase experimental efficiency, the cell culture needs to be miniaturized. Cells are grown in 384-well plates with a surface area of 8 mm² per well. To enable individual cells to be imaged and analyzed, cell density must be relatively low, cell culture must be homogeneous throughout the well, and cells must not form aggregates. A frequent problem with HCS is the edge effect, i.e., a phenotypic difference between cells seeded in the center of the plate and those seeded at the edge, which can lead to high inter-well variability. To avoid this problem, we chose not to seed cells in the wells at the edge of the plate, but to fill these wells with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS). These cultures are maintained for up to 21 days *in vitro* to ensure sufficient maturation for the formation of a dense neuronal network and functional synapses. The screening of up to 107 lentiviral shRNAs, at two different multiplicity of infection (MOI) values, with each shRNA present in technical quadruplicate, requires the preparation of four 384-well plates with primary hippocampal neurons plated in 308 wells (Fig. 1).

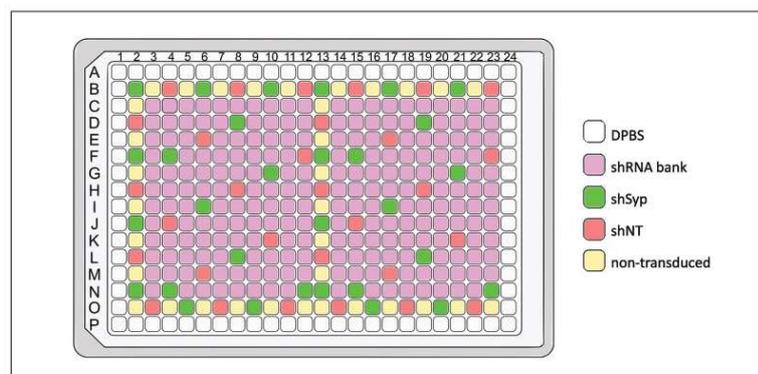


Figure 1 High-content screening (HCS) plate map. Non-transduced wells (NT), non-targeting shRNA (shNT), and shRNA targeting Synaptophysin (shSyp) are used as technical controls for transduction. The plate map is designed to semi-randomly distribute the control wells in the 384-well plate.

BASIC PROTOCOL 1

Coulon et al.

3 of 24

carefully lift the brain with another pair of forceps to transfer it into a second Petri dish filled with ice-cold dissection buffer.

5. Repeat with each of the heads, dispatching the brains into different dishes.
6. Put one of the dishes under an inverted binocular microscope at 10× magnification and separate the two hemispheres of the brain. Lay each hemisphere with its ventral side up and pinch the olfactory bulb backward to pull out the meninges. Flip the hemisphere with its ventral side down and carefully peel the meninges off.
7. Dissect the hippocampus from each cortex and transfer to a 15-ml tube fully filled with ice-cold dissection buffer.
8. Repeat steps 6 and 7 for each brain before proceeding to the next step.

For optimal neuronal culture, dissection should be done in <30 min. We recommend dissecting no more than 15 brains in one preparation.

Dissociate and plate neurons

9. Wash the hippocampi three times with 10 ml ice-cold dissection buffer.
10. Remove all the dissection buffer and add 0.25 ml pre-warmed 2.5% trypsin per brain. Incubate for 10 min on an agitator or similar placed in the tissue culture incubator.
11. During the incubation, add 12.5 μl of 5 mg/ml DNase I in 10 ml pre-warmed dissociation medium per brain.
12. Remove as much trypsin as possible using a 1000-μl pipet tip and then add the 10 ml of dissociation medium with DNase. Invert each tube three times, letting the hippocampi sediment between inversions.
13. Wash the hippocampi three times with 10 ml pre-warmed dissociation medium.
14. Remove all the dissociation medium and add 2 ml pre-warmed culture medium. Mechanically dissociate the tissue using a 1000-μl pipet tip by gently pipetting up and down 30 times.

All pieces of tissue should be dissociated, and the suspension should be turbid but homogeneous. Try to avoid generating bubbles and do not dissociate the tissue more than 40 times to avoid damaging the cells.

15. Centrifuge 8 min at 200 × g at room temperature.
16. Remove the supernatant and resuspend the cells in 2 ml pre-warmed culture medium.
17. Dilute 10 μl cell suspension in 40 μl pre-warmed culture medium and 50 μl trypan blue.
18. Count the cells using a counting chamber.

Each brain is expected to provide 1×10^6 cells. Cell death should not exceed 10%.

19. Dilute the cell suspension in pre-warmed culture medium to 100,000 cells/ml.

For four PNC plates, dilute 5.6×10^6 cells in 56 ml culture medium.

20. Pour the cell suspension into a 50-ml sterile reservoir and add 40 μl to each well within rows B to O and columns 2 to 23 using a 16-channel pipet.

Resuspend the cell suspension in the reservoir by pipetting up and down every 5 to 8 columns using the 16-channel pipet.

Coulon et al.

5 of 24

21. Incubate the screening plates overnight in the tissue culture incubator and proceed directly to Basic Protocol 2.

LENTIVIRAL shRNA OF PRIMARY NEURONAL CULTURE IN 384-WELL PLATES

The choice of experimental controls is crucial in HCS, as controls help to ensure data quality and reliability. Controls should be chosen to produce an easily detectable and reproducible response. As a positive control, we choose to use an shRNA targeting Synaptophysin (shSyp), resulting in a decrease in the expression of the corresponding protein. The negative control used is a non-targeting shRNA (shNT). The transduction is performed at 1 day *in vitro* (DIV1) according to the plate map (Fig. 1). Each shRNA is present in technical duplicates in each plate, and two plates are transduced for each MOI, namely MOI2 and MOI4. These numbers are arbitrary and can be adapted to other HCS applications. Our plate map allows for testing the impact of the under-expression of a maximum of 107 genes of interest in technical quadruplicates at two different MOIs.

Materials

- 1000× polybrene (Hexadimethrine bromide 4 mg/ml; Sigma, cat. no. 107689-10G) Culture medium (see recipe)
- Four screening plates, containing rat postnatal hippocampal cultures at DIV1 (see Basic Protocol 1)
- Lentiviral shRNA bank source plate, containing lentiviral shRNAs targeting genes of interest and lentiviral control shRNAs shNT (Merck, MISSION[®] shC002V) and shSyp (Merck, MISSION[®] NM_009305 TRCN0000379864)
- 384-well plates (for intermediate dilutions; Brand, cat. no. 701355)
- 16-channel pipet (Finnpipette F1; Thermo Scientific, cat. no. 4661090N)

NOTE: Use sterile pipet tips with filters (Finntip 50; Thermo Scientific, cat. no. 94052060).

NOTE: All culture incubations are performed in a 37°C, 5% CO₂ tissue culture incubator unless otherwise specified.

Change medium in the screening plates

1. Dilute 6.7 µl of 1000× polybrene in 10 ml culture medium (0.67× polybrene) and warm it to 37°C.
2. Warm culture medium to 37°C.
3. Allocate two screening plates each for transduction at MOI2 and MOI4 (four plates total).
4. For each MOI4 screening plate, remove 40 µl medium from each well and add 10 µl fresh pre-warmed culture medium from step 2.
Execute this step column by column to avoid drying of the cells.
5. For each MOI2 screening plate, remove 40 µl medium from each well and add 15 µl fresh pre-warmed culture medium containing 0.67× polybrene from step 1.
Execute this step column by column to avoid drying of the cells.
6. Store the screening plates in the incubator until the intermediate plates are ready (see steps 7 to 11).

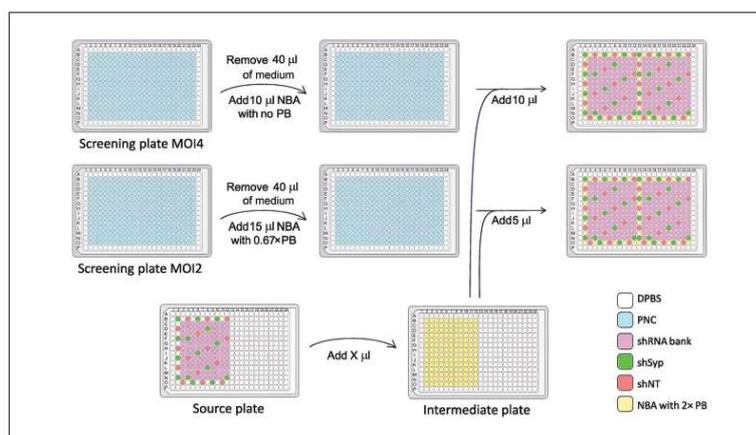


Figure 2 Workflow for lentiviral transduction of primary neuronal cells with the shRNA bank in the screening plates. Lentiviral shRNAs from the source plate are diluted in the intermediate plate to reach a transduction unit of 1.6×10^6 VP/ml and used for transducing cells cultured in two screening plates at MOI4 and two screening plates at MOI2. All these steps are performed using a 16-channel pipet. shNT: non-targeting shRNA; shSyp: shRNA targeting Synaptophysin; PNC: primary neuronal culture; PB: polybrene; NBA: Neurobasal-A Medium; DPBS: Dulbecco's phosphate-buffered saline.

Prepare intermediate plates

7. To dilute the lentiviruses from the source plate into the intermediate plate to reach a transduction unit of 1.6×10^6 viral particles per milliliter (VP/ml), calculate the volume of the medium required separately for each shRNA in the bank (Fig. 2).

The volume in the intermediate plate should be between 70 µl and 280 µl per well.

There is inherent variation in the virus titer received from the producer. For screening, the virus titer needs to be uniform throughout the plate (for a given MOI). The intermediate plate is where the lentiviruses are diluted to a common transduction unit before they are added to the screening plates. A minimum 70 µl lentivirus suspension is needed to screen an shRNA in quadruplicate (two plates per MOI and two wells per plate) at MOI2 and MOI4. Here, a total of $10 \mu\text{l} \times 4 = 40 \mu\text{l}$ is needed for MOI4 plates and a total of $5 \mu\text{l} \times 4 = 20 \mu\text{l}$ is needed for MOI2 plates, plus 10 µl dead volume, resulting in 70 µl. One well of a 384-well plate can safely receive a maximum of 280 µl, considering the tip volume.

For example, for a lentivirus bank where the titer varies between 1.3×10^7 VP/ml and 4.3×10^7 VP/ml, one can dilute 9 µl shRNA into a total volume varying from $[9 \mu\text{l} \times (1.3 \times 10^7 / 1.6 \times 10^6)] = 73 \mu\text{l}$ to $[9 \mu\text{l} \times (4.3 \times 10^7 / 1.6 \times 10^6)] = 242 \mu\text{l}$. Similarly, one can dilute 10 µl shRNA into a total volume varying from $[10 \mu\text{l} \times (1.3 \times 10^7 / 1.6 \times 10^6)] = 81 \mu\text{l}$ to $[10 \mu\text{l} \times (4.3 \times 10^7 / 1.6 \times 10^6)] = 268 \mu\text{l}$. Diluting 8 µl of the shRNA with the lowest titer would result in a final volume of $[8 \mu\text{l} \times (1.3 \times 10^7 / 1.6 \times 10^6)] = 65 \mu\text{l}$, which is not desirable because it is <70 µl. On the other hand, diluting 11 µl of the shRNA with the highest titer would result in a final volume of $[11 \mu\text{l} \times (4.3 \times 10^7 / 1.6 \times 10^6)] = 295 \mu\text{l}$, which is beyond the 280-µl safe well capacity.

These calculations will have to be repeated for each lentivirus bank and for the number of technical replications and MOI(s) chosen by the user.

8. For each shRNA, round the volume of medium required to dilute the lentivirus suspension (equal to the final volume calculated in step 7 minus the volume of the lentiviral suspension) to the nearest 10 µl.

Following one of the examples in step 7, if one decided to dilute 10 μ l shRNA at a titer of 1.3×10^7 VP/ml, the rounded volume for this shRNA would be $81 \mu\text{l} - 10 \mu\text{l} = 71 \mu\text{l} \approx 70 \mu\text{l}$.

9. Thaw the lentiviral shRNA bank source plate.

The source plate is ideally packaged in the 384-well plate format with a minimum volume of 15 μ l and a minimum transduction unit of 10^7 VP/ml.

10. Dilute 40 μ l of 1000 \times polybrene in 20 ml pre-warmed culture medium to obtain 2 \times polybrene. Using a single-channel pipet, fill the wells of a 384-well plate (the intermediate plate) with the different volumes of medium calculated in step 7 for each shRNA. Fill the non-transduced wells with 100 μ l pre-warmed culture medium.
11. Using a 16-channel pipet, transfer the volume of shRNAs from the source plate to the corresponding wells of the intermediate plate.

It is important for the quality of the shRNA bank that a multichannel pipet is used to minimize the time required for dilution after thawing. This can only be assured by fixing a set volume of lentivirus suspension, regardless of the titer. This, however, requires that the medium volume for each shRNA should be calculated and added to the wells in advance (see step 10).

Transduce cells with lentiviruses

12. Transfer 10 μ l lentivirus suspension at 1.6×10^6 VP/ml from each well of the intermediate plate to the corresponding well and its duplicate in the two MOI4 screening plates (see step 6).
13. Transfer 5 μ l lentivirus suspension at 1.6×10^6 VP/ml from each well of the intermediate plate to the corresponding well and its duplicate in the two MOI2 screening plates (see step 6).
14. Incubate screening plates for 6 hr in the tissue culture incubator.
15. Add 20 μ l fresh pre-warmed NBA medium to each transduction well (40 ml in total).
16. Incubate the screening plates in the tissue culture incubator until DIV21 and then proceed directly to Basic Protocol 3.

BASIC PROTOCOL 3

IMMUNOSTAINING OF THE NEURONAL NETWORK AND SYNAPTIC MARKERS IN 384-WELL PLATES

This HCS approach is based on the immunolabeling of a presynaptic protein (Synaptophysin) and a postsynaptic protein (Homer1) and the quantitative analysis of their relative positions. This strategy has recently been shown to have sufficient sensitivity to detect the changes in synaptic connectivity induced by exposing neurons to cell-secreted A β oligomers at physiologically relevant concentrations (Kilinc et al., 2020). To ensure an efficient and reproducible immunolabeling process in 384-well plates, washing steps are automated using a robotic platform. To reduce the damage to fixed cells, the position of the distribution/aspiration heads is optimized and the flow rate is reduced. Automated steps of the protocol need to be adapted to the material available to the user. Addition of primary and secondary antibody mixes, however, is done manually to avoid waste due to the relatively large dead volume.

Materials

- Four screening plates, containing transduced rat hippocampal cultures at DIV21 (see Basic Protocol 2)
- 4% (v/v) formaldehyde in DPBS
- 0.3% (v/v) Triton X-100 in DPBS

Coulon et al.

8 of 24

Current Protocols

2.5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in DPBS with 0.1% (v/v) Triton X-100

Primary antibodies:

Chicken anti-Homer1 (Synaptic Systems, cat. no. 160006)

Guinea pig anti-Synaptophysin (Synaptic Systems, cat. no. 101004)

Mouse anti-MAP2 (Synaptic Systems, cat. no. 188011)

1 × DPBS

Secondary antibodies:

Donkey anti-chicken Alexa 488 (Jackson ImmunoResearch, cat. no. 703-545-155)

Goat anti-guinea pig Alexa 555 (Life Technologies, cat. no. A21435)

Donkey anti-mouse Alexa 647 (Jackson ImmunoResearch, cat. no. 715-605-151)

16-channel pipet (Finnpipette F1; Thermo Scientific, cat. no. 4661090N)

Aluminum sealing tape (Dutscher, cat. no. 106570, or similar)

PlateHUB rotating plate-storage carousel (Agilent, model G5500-23447)

Plate washer associated with liquid handler (BioTek, model EL406)

Wash_Primary.pro and Wash_Secondary.pro programs (see Supporting Information)

VWorks automation control software (Agilent)

Aspirate.LHC and Aspirate-Dispense.LHC subroutines (see Supporting Information)

Direct Drive Robot (Agilent)

NOTE: Use sterile pipet tips with filters (Finntip 50; Thermo Scientific, cat. no. 94052060).

Fix, permeabilize, and saturate the cells

1. Using a 16-channel pipet, carefully remove the culture medium from each of the four screening plates and add 20 μ l of 4% formaldehyde in DPBS per well. Incubate for 15 to 20 min at room temperature.

Execute this step column by column to avoid drying and harming the neurons.

Use the 16-channel pipet in steps 1 to 7.

2. Remove formaldehyde and wash for 10 min with 40 μ l DPBS per well.
3. Remove DPBS and permeabilize the cells using 20 μ l of 0.3% Triton X-100 in DPBS per well for 5 min.
4. Remove Triton X-100 and saturate the cells using 20 μ l of 2.5% BSA in DPBS with 0.1% Triton X-100 per well.
5. Incubate 2 hr at room temperature.

Incubate screening plates with primary antibodies

6. Prepare the primary antibody mix by diluting primary antibodies 1:500 in 1 × DPBS.
7. Remove buffer from step 4 and add 15 μ l primary antibody mix to each per well.
8. Seal all plates with aluminum sealing tape and incubate overnight at 4°C.
9. Bring assay plates from 4°C to room temperature, remove their seals, and place them on PlateHUB cassette 1 of the PlateHUB rotating plate-storage carousel.
10. Plug a bottle of 1 × DPBS bottle to the plate washer associated with the liquid handler and install the distribution heads.

Coulon et al.

9 of 24

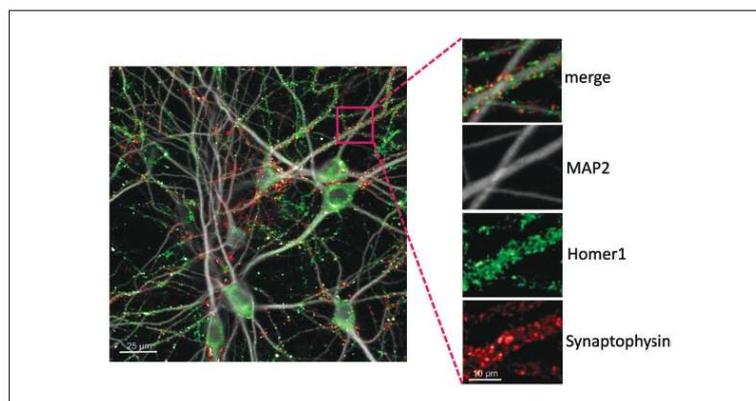


Figure 4 Representative images of MAP2, Homer1, and Synaptophysin staining acquired with IN Cell Analyzer 6000.

- a. Repeat steps 11a to 11c twice.
- b. Pick a plate, remove its lid, and place it on plate washer.
- c. Aspirate the buffer from each well and add 40 μ l DPBS per well.
- d. Remove the plate from plate washer, replace its lid, and move it to PlateHUB cassette 7.

When step 14d is finished the last assay plate, this completes program Wash_Secondary.pro. This program runs steps 14a to 14d in an automated fashion for each plate (Fig. 3). This program automatically calls Aspirate.LHC and _Aspirate-Dispense.LHC subroutines for the BioTek plate washer to perform respectively the buffer aspiration and the PBS dispensing steps. All automated plate transfers are done by the Direct Drive Robot.

15. Remove DPBS bottle from the plate washer and wash tubes, pumps, and distribution heads.
16. Proceed immediately to image acquisition (see Basic Protocol 4) for the first plate and store other plates at 4°C.

IMAGE ACQUISITION USING A HIGH-THROUGHPUT READER

Imaging three wavelengths at sufficiently high spatial resolution (0.1083 μ m/px in our case) should produce satisfactory presynaptic and postsynaptic signals, as well as imaging of the somatodendritic network (Fig. 4).

Materials

Immunostained screening plates (see Basic Protocol 3)
IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare; or similar automated confocal microscope)

1. Once immunostaining is completed (see Basic Protocol 3), pick an immunostained screening plate and proceed to setting up the image acquisition parameters (steps 2 to 8).

Keep the other plates at 4°C.

2. When using the IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare) for the first time, select (or define) the plate used (in our case, Greiner μ clear 384-well plate 781091). Select the lowest-magnification objective available and verify that the autofocus range in

BASIC PROTOCOL 4

Coulon et al.

11 of 24

different wells of the plate is sufficiently large. Adjust the plate thickness parameter if necessary.

Plate thickness varies between different production batches and affects the microscope autofocus function.

A similar automated confocal microscope may be used.

3. In the Dashboard tab, select the highest-magnification objective (in our case, Nikon 60 × /0.95, Plan Apo, Corr Collar 0.11-0.23, CFI/60 Lambda), set binning as 1 × 1, and set laser autofocus power level at 50%. Additionally, select the following acquisition wavelengths: Cy5 (642/706 nm) for MAP2, dsRed (561/605 nm) for Synaptophysin, and FITC (488/525 nm) for Homer1.
4. For all channels, set image mode as “maximum intensity projection” and set Z-slice number as 3. Deselect open aperture and set laser power to 100% and aperture to 1.05.
5. For each channel, define laser intensity as 100% and set up the autofocus offset and exposure time.

In our setup, i.e., with the antibody concentrations and incubation periods described, the exposure times were 200 ms for Cy5, 200 ms for FITC, and 150 ms for dsRed. The autofocus offsets varied between 0.5 and 1.5 μm. Exposure times and autofocus offsets need to be verified for each acquisition batch.

6. Define the wells to be imaged: 308 wells from B2 (top left corner) to O23 (bottom right corner).
7. In the Field tab, define number of fields per well as 16, acquisition sequence as “horizontal serpentine”, and spacing between fields as X: 100 μm and Y: 100 μm. Position the fields in the center-right portion of the well.
8. In the Z-Stack setup tab, define the Z Step as 0.5 μm. Position the 3D focus at the center slice.
9. Save image acquisition parameters in a .xaqp file.
10. Insert the first plate in the IN Cell microscope and start automated imaging.

The imaging time per plate (308 wells; 16 fields per well; 3 wavelengths; 3 Z slices) is <7 hr.

11. Repeat step 10 for the remaining plates. Store imaged plates at 4°C.
12. When the last plate imaged, proceed to Basic Protocol 5 to transfer the images to the Columbus server for image segmentation and analysis.

BASIC PROTOCOL 5

IMAGE SEGMENTATION AND ANALYSIS

Image segmentation is an essential step for defining the synaptic puncta. Considering the large number of images acquired, this process needs to be done automatically (or semi-automatically) with specialized software. In this protocol, we will describe the image analysis conducted in Columbus software, but the commands can be adapted to any software with similar capabilities (Fig. 5).

Materials

Columbus Image Data Storage and Analysis System, version 2.7 or above (Perkin Elmer; or similar software)
Data from Basic Protocol 4

Coulon et al.

12 of 24

Current Protocols

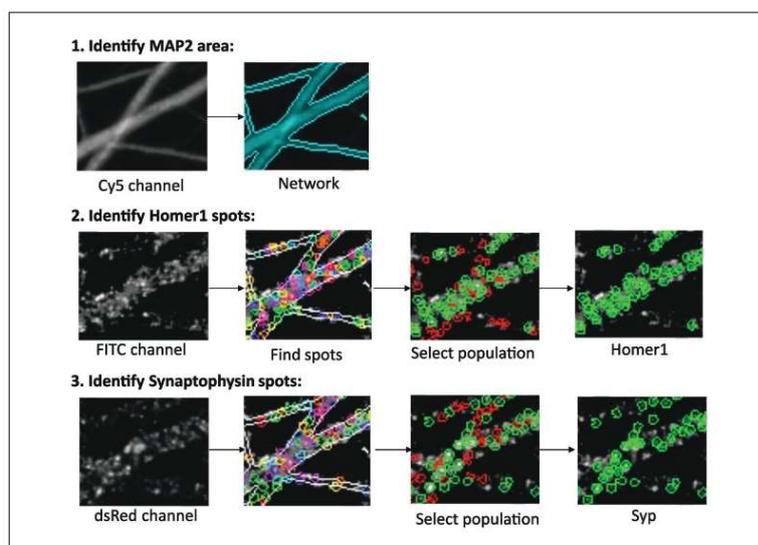


Figure 5 Image segmentation and analysis using Columbus software. MAP2 staining was used to define the somatodendritic network area, and Homer1 and Synaptophysin spots were detected within the network area. At the “select population” step, spots that did not satisfy the defined criteria (red spots) were excluded from final results (green spots).

Identify and measure MAP2 areas

1. Open “Import” under the Workflow menu in the Columbus Image Data Storage and Analysis System, select Import Type as “InCell XDCE/TIF”, select source folder (where images and .XDCE files are stored), define the name of the screen/imaging, and start importing data from Basic Protocol 4.

Giving the same screening name to each of the imported plates will save them into the same folder.

2. Select “Image Analysis”, select an “Assay Plate” under the “Data Tree”, and select an shNT control well from the “Image Selection” menu.

Columbus uses an “Image Analysis” interface with building blocks that are used for image segmentation. This interface contains two default building blocks: Input Image and Define Results. All other building blocks need to be added between these two building blocks and validated. The next steps describe how to set up the image analysis in Columbus software. Alternatively, you can import the HCS_Synapse.aas program (see Supporting Information) and only proceed to the training for spot identification (steps 9 and 13) before analyzing images of full plates (steps 24 and 25).

3. In the **Input Image** building block, select “Maximum Projection” for Stack Processing and “None” for Flatfield Correction.
4. Add a **Find Image Region** building block with “Channel” = “Cy5”; “ROI” = “None”; “Method” = “Common Threshold”. As second-tier inputs, define “Threshold” as 0.40 and “Area cut-offs” as 0 and deselect “Split into Objects” and “Fill Holes” options. Name “Output Population” and “Output Region” as “Network”.

Depending on your images, “Threshold” can be adjusted in order to better delineate MAP2 areas.

Coulon et al.

13 of 24

5. Add a **Calculate Morphology Properties** building block with “Population” = “Network”; “Region” = “Network”; “Method” = “Standard”. As second-tier inputs, select “Area (in μm^2)”. Name “Output Properties” as “Network”.
6. Add a **Calculate Intensity Properties** building block with “Channel” = “Cy5”; “Population” = “Network”; “Region” = “Network”; “Method” = “Standard”. As second-tier inputs, select “mean” and “sum”. Name “Output Properties” as “Intensity Network”.

Identify and quantify Homer1 spots

7. Add a **Find Spots** building block with “Channel” = “FITC”; “ROI” = “Network”; “Population” = “Network”; “Region” = “Network”; “Method” = “C”. As second-tier inputs, set “Radius” to “< 0.1”, “Contrast” to “> 0”, “Uncorrected Spot to Region Intensity” to “> 0”, “Distance” to “ $\geq 0.75 \mu\text{m}$ ”, and “Spot Peak Radius” to “0.21 μm ”. Select “Calculate Spot Properties”. Name “Output Population” as “Homer Spot”.
8. Add a **Calculate Intensity Properties** building block with “Channel” = “FITC”; “Population” = “Homer Spot”; “Region” = “Homer Spot”; “Method” = “Standard”. As second-tier inputs, select “mean”, “sum”, “max”, “90% quantile fraction”, and “contrast”. Name “Output Properties” as “Intensity Spot FITC”.
9. Add a **Select Population** building block with “Population” = “Homer Spot”; “Method” = “Linear Classifier”. As second-tier inputs, select “2” as “number of classes” and select the following fields: “Relative Spot Intensity”; “Corrected Spot Intensity”; “Uncorrected Spot Peak Intensity”; “Spot Contrast”; “Spot Background Intensity”; “Spot Area [px²]”; “Region Intensity”; “Spot to Region Intensity”; “Intensity Spot FITC Mean”; “Intensity Spot FITC Maximum”; “Intensity Spot FITC Sum”; “Intensity Spot FITC Quantile 90%”; “Intensity Spot FITC Contrast”. Name “Output Population A” as “Homerselect” and “Output Population B” as “fake”. Choose an shNT control well and click on “Train...”. Select “Class A: green” and click on spots that one could consider as true Homer1 spots. Select “Class B: red” and click on spots that one could consider as falsely identified Homer1 spots. Train the computer by selecting at least 10 spots for each class in at least 10 images from different shNT control wells. Once satisfied with the selection, accept and exit the training.
10. Add another **Select Population** building block with “Population” = “Homerselect”; “Method” = “Filter By Property”. As second-tier inputs, set “Intensity Spot FITC mean” as “> 1500”. Name “Output Population” as “Homer1”.

Depending on your images, adjust the threshold (set as 1500) to optimize the identification of Homer1 spots.

Identify and quantify Synaptophysin spots

11. Add a **Find Spots** building block with “Channel” = “dsRed”; “ROI” = “Network”; “Population” = “Network”; “Region” = “Network”; “Method” = “C”. “Radius” to “< 0.1”, “Contrast” to “> 0”, “Uncorrected Spot to Region Intensity” to “> 0”, “Distance” to “ $\geq 0.75 \mu\text{m}$ ”, and “Spot Peak Radius” to “0.21 μm ”. Select “Calculate Spot Properties”. Name “Output Population” as “Syn Spot”.
12. Add a **Calculate Intensity Properties** building with “Channel” = “dsRed”; “Population” = “Syn Spot”; “Region” = “Syn Spot”; “Method” = “Standard”. As second-tier inputs, select “mean”, “sum”, “max”, “90% quantile fraction”, and “contrast”. Name “Output Properties” as “Intensity Spot dsRed”.

13. Add a **Select Population** building block with “Population” = “Syn Spot”; “Method” = “Linear Classifier”. As second-tier inputs, select “2” as “number of classes” and select the following fields: “Relative Spot Intensity”; “Corrected Spot Intensity”; “Uncorrected Spot Peak Intensity”; “Spot Contrast”; “Spot Background Intensity”; “Spot Area [μm^2]”; “Region Intensity”; “Spot to Region Intensity”; “Intensity Spot dsRed Mean”; “Intensity Spot dsRed Maximum”; “Intensity Spot dsRed Sum”; “Intensity Spot dsRed Quantile 90%”; “Intensity Spot dsRed Contrast”. Name “Output Population A” as “Synselect” and “Output Population B” as “fake(2)”. Choose an shNT control well and click on “Train...”. Select “Class A: green” and click on spots that one could consider as true Synaptophysin spots. Select “Class B: red” and click on spots that one could consider as falsely identified Synaptophysin spots. Train the computer by selecting at least 10 spots for each class in at least 10 images from different shNT control wells. Once satisfied with the selection, accept and exit the training.
14. Add another **Select Population** building block with “Population” = “Synselect”; “Method” = “Filter By Property”. As second-tier inputs, set “Intensity Spot dsRed mean” as “> 1100”. Name “Output Population” as “Syn1”.
Depending on your images, adjust the threshold (set as 1100) to optimize the identification of Synaptophysin spots.

Define Results

15. In the **Define Results** building block, select “List of Outputs” as “Method”. Open “fake”, “fake(2)”, “Homerselect”, and “Synselect” input fields to confirm that nothing is selected. In “Population: Homer Spots” and “Population: Syn Spots” input fields, select only “Number of Objects”. In “Population: Homer1” and “Population: Syn1” input fields, select “Number of Objects”, set “Apply to all” as “Individual Selection”, and select “ALL” for “Intensity Spot Mean”, “Intensity Spot Maximum”, and “Intensity Spot Sum”. In “Population: Network” input field, deselect “Number of Objects”, set “Apply to all” as “Individual Selection”, and select “ALL” for “Network Area” and “Intensity Network Sum”.
16. For steps 17 to 21, remain in the same **Define Results** building block, add “Formula” as “Method” and confirm that “a/b” is set as “Formula”.
17. Select “Syn1 - Number of Objects” as “Variable A” and “Network - Network Area [μm^2] Mean” as “Variable B”. Name “Output Population” as “Syn1 density”.
18. Select “Homer1 - Number of Objects” as “Variable A” and “Network - Network Area [μm^2] Mean” as “Variable B”. Name “Output Population” as “Hom1 density”.
19. Select “Homer1 - Number of Objects” as “Variable A” and “Syn1 - Number of Objects” as “Variable B”. Name “Output Population” as “Hom1/Syn1”.
20. Select “Syn1 - Number of Objects” as “Variable A” and “Syn Spots - Number of Objects” as “Variable B”. Name “Output Population” as “Syn1/Syn”.
21. Select “Hom1 - Number of Objects” as “Variable A” and “Homer Spots - Number of Objects” as “Variable B”. Name “Output Population” as “Hom1/Hom”.
22. In the **Object Results** building block, select “ALL” for “Homer1”, “Syn1”, and “Network” populations. Select “None” for the other population.
23. Save Columbus script via “Save Analysis to Disk”.

Coulon et al.

15 of 24

Analyze images of full plates

- Open “Batch Analysis” under the Workflow menu, select the measurement to analyze (i.e., “Assay Plate” subfolder) and the analysis script in “Data Tree”, and start analysis.

Repeat this step for all assay plates. Analysis of each plate takes 4 hr.

- Open “Export” under the Workflow menu and select the measurement folder (automatically generated by Columbus) in “Data Tree”. In the “Select Export Options” tab, select “Export to Disk” as “Method”, designate an “Export Folder”, select “Excel (txt)” as “Results”, and choose “Generate Subfolders” and “Include Header”.

Repeat this step for all assay plates. Export of each plate takes 30 min.

SYNAPTIC DENSITY ANALYSIS

Columbus generates tabulated data that contains information for each detected synaptic spot, for each field in each well in each plate. To analyze this massive amount of tabulated data, we have generated a custom Matlab algorithm that extracts data from .txt files in stored specific folders into matrices that contain network area and network staining intensity per field, as well as *xy*-position and staining intensity for all Synaptophysin and Homer1 spots. The algorithm first excludes fields with no presynaptic or postsynaptic spots detected. It then identifies outlier fields within a well in terms of network area or network staining intensity. After excluding the outlier fields, the algorithm runs a subroutine to calculate, for each Homer1 spot, its Euclidian distance to all Synaptophysin spots in the same field. Each Homer1 spot is then assigned to the nearest Synaptophysin spot with a pre-determined cut-off distance. In control cultures, the fraction of Synaptophysin spots with at least one Homer1 spot assigned linearly increases with increasing cut-off distance, until it starts to reach a plateau. We thus select a cut-off distance in the linear portion of the curve and apply it to all images in the screen. The ultimate read-out of the screen, synapse density, is then defined as the area density of Synaptophysin spots with at least one Homer1 spot assigned.

Materials

Columbus results (see Basic Protocol 5)
 Matlab, version R2017b or above (Mathworks; or similar numerical analysis software)
 Matlab code HCS_CPCB_annotated.m (see Supporting Information)
 Microsoft Excel (or similar spreadsheet software)

Copy Columbus results to a local folder and run Matlab code

- For each plate, copy Columbus results (.txt files) into the “data” folder of the Matlab environment (or similar numerical analysis software) and run Matlab code HCS_CPCB_annotated.m.

Columbus results will be stored in three text files per well: one each for MAP2 network, Synaptophysin spots, and Homer1 spots.

- Set the initial parameters in the *Matlab* code: “cutoffs” stands for the different cut-off distances in micrometers; “fieldnum” stands for the number of fields acquired per well; and “resolution” stands for the pixel resolution of images in $\mu\text{m}/\text{px}$.

The length of the cut-off distances vector is arbitrary and can be 1. The code acquires well names from .txt file names using the following command:

```
wellnames(k) = strrep(strrep(eraseBetween(eraseBetween(MyFolderInfo(k*3+2).name,'Syn','.'), '[','txt'), 'Syn', result.', '), '[txt', "');
```

Table 1 Matlab Output Parameters

Output parameter	Definition
1	Number of Syn spots ($\times 1000$)
2	Number of Homer1 spots ($\times 1000$)
3	% of Synaptophysin spots assigned by any Homer1 spot
4	Mean distance of assignments
5	Mean number of assignments per Synaptophysin spot
6	Mean distance of assignments (μm)
7	% of Homer1 spots assigned to any Synaptophysin spot
8	Network area (μm^2)
9	Network intensity
10	Number of fields remaining after removing outliers
11	Synaptophysin1 – Intensity Spot dsRed Sum
12	Homer1 – Intensity Spot FITC Sum

Table 2 Column Headers of the display.mat File

Row	Column names	Well names	Number of fields (10)	Output parameter mean	Output parameter SD	Output parameter SD
				Cutoff 1	Cutoff 2	Cutoff...
				Cutoff 1	Cutoff 2	Cutoff...
			1 2 8 9 11 12	3 5 6 7 3 5 6 7	1 2 8 9 11 12	3 5 6 7 3 5 6 7

If the output file name format of Columbus changes, adapt the Matlab command to the new name needed.

The code will exclude fields with no Homer1 spots or Synaptophysin spots by looking at the corresponding network file.

For each well, the code will exclude fields with network area outside median ± 2 median absolute differences (MADs), as well as fields with mean network intensity outside median ± 2 MADs.

3. Back up the three output files generated by the Matlab code (batchres.mat, display.mat, and wellnames.mat) by associating them with the screen name.

The results are first written in BATCHRES, a 4D matrix with the following dimensions: wellnum \times fieldnum \times cutoffnum \times 12, corresponding to the number of wells to be analyzed, number of fields per well, length of the cut-off distances vector, and number of output parameters (Table 1).

The well-averaged summary data are then stored in DISPLAY, a 2D matrix with the following dimensions: wellnum \times n, where $n = 13 + 8 \times$ length of the cut-off distances matrix. The DISPLAY matrix stores, for each well, the number of fields that are remaining after removing outlier fields and the mean and standard deviation (per well) of six output parameters that are independent of the assignment cut-off distance (1, 2, 8, 9, 11, 12) and four output parameters that vary with the assignment cut-off distance (3, 5, 6, 7).

Extract Matlab results to Excel and conduct post-analysis

4. Open wellnames.mat in Matlab and copy the only column to column C of a new Microsoft Excel file.
5. Open display.mat in Matlab and copy table into columns D to CJ of the Excel file.
6. Insert three lines at the top of the sheet and label the columns as in Table 2.

Coulon et al.

17 of 24

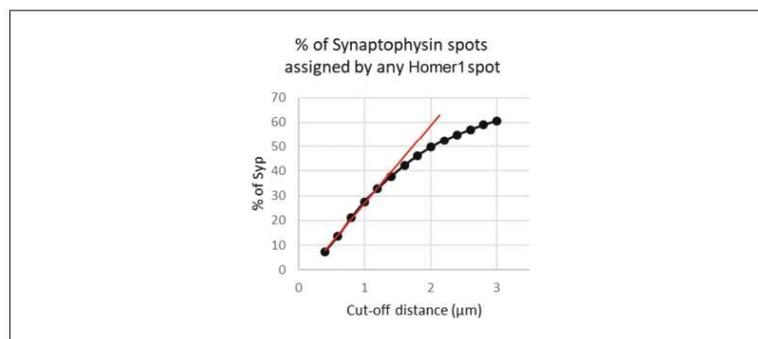


Figure 6 Plot of the percentage of Synaptophysin spots assigned by at least one Homer1 spot as a function of cut-off distance. The red line indicates the linear part of the curve. For this set of experiments, 1 μm is chosen as the cut-off distance.

7. Complete columns A and B with the column number and the row number corresponding to each well and use these columns to sort the wells from B2 to O23.
8. Use column CK to associate each well with its respective shRNA (e.g., shNT, shSyp, shGeneX).
9. Calculate the β -score of the plate: $\beta = \frac{\mu_{\text{shNT}} - \mu_{\text{shSyp}}}{\sigma_{\text{shNT}} + \sigma_{\text{shSyp}}}$, where μ and σ are the mean and standard deviation of Syp density for control wells treated with shNT and shSyp. Analyze only the plates with a β -score > 1 .
10. Use the data from non-transduced wells to calculate the mean of “% of Synaptophysin with no Homer assigned” for each cut-off. Plot % of Synaptophysin spots assigned by at least one Homer1 spot as a function of cut-off distance (Fig. 6).

The curve should reach a plateau. For the rest of the analysis, use a single cut-off value, located before the upper end of the linear part of the curve (typically 1 μm).

11. Add a column to calculate “Synapse density” for each well.

Synapse density = % Synaptophysin assigned \times Syn1 density.
12. Copy the results of all shNT control wells into a new Excel tab and calculate the means for each parameter.
13. Copy the results of all wells to a new Excel tab and normalize them using the means calculated in step 12.
14. Repeat steps 4 to 13 for each plate.
15. Copy the normalized results from each plate into a new Excel file.
16. Exclude the wells with shRNA-induced toxicity, as defined by normalized Network Area < 0.4 ($< 40\%$ of control average).
17. Pool the data for the entire screen and discard shRNAs for which there are fewer than two values.
18. Identify shRNAs that have the strongest effect on synapse density.

REAGENTS AND SOLUTIONS

Borate buffer (pH 8.5), 0.1 M

1.55 g boric acid (Sigma-Aldrich, cat. no. B9645-500G)

2.375 g sodium tetraborate
400 ml ultrapure H₂O
Stir for 4 hr at room temperature to dissolve sodium tetraborate
After reagents dissolve, pH should be stable at 8.5
Bring to 500 ml with ultrapure H₂O
Filter-sterilize
Store ≤4-6 weeks at 4°C

Culture medium

2 ml 50× B27 supplement (Gibco, cat. no. 17504001)
250 μl 100× GlutaMAX (Gibco, cat. no. 35050038)
Bring to 100 ml with Neurobasal-A Medium (Gibco, cat. no. 10888022)
Filter-sterilize
Store ≤4 days at 4°C

Dissection buffer

2.5 ml 20× penicillin/streptomycin (Gibco, cat. no. 1507063)
5 ml 1 M HEPES (Gibco, cat. no. 15630056)
5 ml 100 mM sodium pyruvate (Gibco, cat. no. 11360039)
50 ml 10× Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Gibco, cat. no. 14185045)
Bring to 500 ml with ultrapure H₂O
Filter-sterilize
Store ≤6 weeks at 4°C

Dissociation medium

0.25 ml 20× penicillin/streptomycin (Gibco, cat. no. 15070063)
0.4 ml 1× MEM vitamins (Gibco, cat. no. 11120037)
0.5 ml 100× GlutaMAX (Gibco, cat. no. 35050038)
1.5 ml 20% (w/v) d-glucose (Sigma, cat. no. G8270)
5 ml fetal bovine serum (FBS; Gibco, cat. no. 10270106)
Bring to 50 ml with minimum essential medium (MEM) without glutamine (Gibco, cat. no. 21090022)
Filter-sterilize
Store ≤4 days at 4°C

COMMENTARY

Background Information

Quantification of synaptic density can help decipher the mechanisms of synaptogenesis, synaptic plasticity, and synaptic loss observed in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. Here, we describe an HCS method that we applied to assess the impact of an shRNA library targeting 198 AD-associated genes on synaptic density to test the hypothesis if synapse loss driven by genetic risk factors plays a role in AD pathophysiology.

HCS combines automated imaging and quantitative data analysis in a high-throughput format suitable for large-scale applications. However, accurate assessment of synaptic density in an HCS pipeline requires mature neuronal cell cultures, adequate methods for imaging synapses, and a reliable approach to quantify synaptic density. Several

HCS approaches have been developed, but most of them encountered (i) limited scalability due to the use of low-density (96-well) assay plates (Berryer et al., 2023; Jiang et al., 2020; Nieland et al., 2014), (ii) difficulties in maintaining native synaptic properties *in vitro* using transfection-based overexpressed synaptic proteins (Green et al., 2019), and (iii) challenges in identifying and quantifying functional/mature synapses due to the use of a single presynaptic or postsynaptic marker (Berryer et al., 2023; Spicer et al., 2017). Although several open-source methods for synaptic quantification have been developed, such as SynQuant (Wang et al., 2020), SynapseJ (Moreno Manrique et al., 2021), SynPAnal (Danielson & Lee, 2014), and ALPAQAS (Berryer et al., 2023), the HCS method we describe here is one of the

Coulon et al.

19 of 24

few that use automated imaging of fluorescently labeled endogenous presynaptic and postsynaptic markers in mature primary neurons cultured in 384-well microplates, as well as a semi-automated image analysis workflow to quantify synapses by the proximity-based assignment of postsynaptic puncta to presynaptic puncta. Process automation ensures the throughput, accuracy, and reproducibility of our HCS, and as proof of concept, we generated data showing that our method robustly identifies modulators of synaptic density through unbiased screening of 198 shRNAs targeting AD-associated genes.

The present approach permits us not only to identify modulators of synaptic density but also to screen potential therapeutic molecules for neurodevelopmental or neurodegenerative diseases. Our future directions include the use of human induced pluripotent stem cell derived neurons to analyze the convergent or divergent mechanisms of synaptic development and alteration between humans and rodents, as well as the use of patient-derived pluripotent stem cells for *in vitro* modeling of neurological diseases.

Critical Parameters

Before transducing the shRNA lentiviral library (Basic Protocol 2), it is recommended to check the quality of the PNC (Basic Protocol 1). If the cells have not adhered well to the substrate or if the neuronal network appears fragmented and/or vacuolated, it is preferable not to proceed with transduction because it is highly likely that the neurons will not survive. During the 21 days of neuronal maturation, no change of medium is needed, but it is recommended to check the level of culture medium and to add medium in the event of excessive evaporation. In our screening model, we chose to use a large number of positive and negative controls per screening plate. After optimization, the number and the semi-random distribution of control wells proved necessary to ensure the quality of our approach. As the cellular model we used is a neonatal rat neuronal culture model, it is necessary to verify that the lentiviral shRNA library used targets the rat genome. This article presents the optimal conditions for immunolabeling (Basic Protocol 3), but it is possible to adapt the protocol according to the needs of the user. Formalin use for fixation and natural donkey serum as a blocking agent are perfectly acceptable alternatives. Before starting image acquisition on a full plate (Basic Protocol 4), it is always advisable to check the quality of immunolabel-

ing in several randomly selected wells located in different parts of the plate. Immunolabeling is highly sensitive to the ambient temperature, and image acquisition takes place at room temperature. For this reason, the reading of a plate should never exceed 8 hr of acquisition, and plates should always be stored at 4°C. Monitoring the temperature of the microscope is recommended to ensure that it does not overheat during plate reading, which would decrease the signal quality in parts of the plate. Once the image analysis has been completed, it is recommended to quickly check the quality of the acquisition using the Columbus software. To do so, one can obtain heat maps for the following parameters: Syn1 density, Hom1 density, and Network Area - Mean per Well. For Hom1 density and Network Area, values must be homogeneous within the plate (no edge or gradient effects). Syn1 density values should follow the same plate layout as the positive controls. After complete data analysis (Basic Protocols 5 and 6), any plate with a β -score below 1 should be excluded from the final results.

Troubleshooting

See Table 3 for a list of potential problems, possible causes, and suggested solutions.

Understanding Results

To reduce the risk of false negatives and false positives, we performed our screen three times using three independent neuronal cultures. Transduction of shSyn at MOI2 and MOI4 decreased the average Synaptophysin density by $69 \pm 12\%$ and $85 \pm 7\%$, respectively. Strictly standardized mean difference (SSMD) was assessed through the β -score using positive and negative controls from each plate. Due to the inherent heterogeneity of our phenotype, a plate should be considered suitable for analysis when its β -score is >1 (Zhang et al., 2007). Among the 11 plates in our HCS study, we obtained a range of β -scores from 1.31 to 2.88 (Table 4), indicating a good level of reproducibility of our model. The synaptic density observed for each shRNA from the bank needs to be normalized by the mean synaptic density of the shNT controls from the same plate to overcome any potential interplate variability in terms of cell culture, immunocytochemistry, and image acquisition.

Time Considerations

To simplify the experimentation, we recommend preparing culture medium, coating solutions, and the intermediate dilution plate on the days prior to neuronal culture. Medium

Table 3 Troubleshooting Guide for High-Content Screening of Synaptic Density Modulators in Primary Neuronal Cultures

Problem	Possible cause	Solution
Cell death after seeding	Dissection and/or dissociation took too long	Dissection should be performed in <30 min. We recommend not to dissect more than 15 brains in one preparation.
	Cell density is too low	Increase the cell density ($\geq 100,000$ cells/ml). Homogenize well before seeding to avoid inter-well variability.
Cell death after lentiviral shRNA transduction	MOI is too high	Decrease the MOI
Staining shows a fragmented network	Cells dried	Never let the cells go without $1 \times$ DPBS or medium. When changing medium, always proceed column-by-column to avoid drying of the cells.
	Over-fixed or over-permeabilized cells	Decrease the time of fixation and/or permeabilization
	Washing steps are too rough	Decrease the flow rate of the washer for automated aspiration/dispensation steps
Weak staining intensity	Over-fixed cells	Decrease the time for fixation
	Non-permeabilized cells	Increase the time for permeabilization
	Antibody concentration is too low	Use a higher concentration of antibodies or increase the time for incubation
High background signal	Insufficient blocking	Increase the saturation time or consider changing the blocking agent to 5% natural donkey serum
	Insufficient washing steps	Add one more washing step or increase the time for washes
	Antibody concentration is too high	Use a lower concentration of antibody
Edge effect	Medium evaporates faster in the border wells than in the center wells	Check the medium level once or twice a week and add some medium if necessary. Do not seed cells in the border wells; instead, fill them with $1 \times$ DPBS.
Decrease in fluorescence intensity over time during acquisition	Increase in ambient temperature	The acquisition temperature must be recorded and controlled all along. Plates should always be kept at 4°C and imaged one after the other to avoid inter-plate variability.
	Plates were left at room temperature	Always keep the plates at 4°C . Imaging should be done within <3 days. Plates should be imaged within <8 hr.
β -score is <1	Positive control is not efficient	Avoid freeze-thawing of the lentiviral shRNAs to avoid a decrease in the lentivirus titer
	Inter-well variability is too high	Check for pipetting errors. In Basic Protocol 3, using an automatic pipet with a stepper mode (Thermo Scientific, cat. no. 46300200) can decrease the inter-well variability.
	Image analysis is not optimal	In the Columbus "Select Population" building block, train the computer on additional images from different wells

and coating solutions can be stored ≤ 1 week at 4°C . The first day is devoted to PNC (~ 3 hr; Basic Protocol 1). Dissection should be carried out as quickly as possible (<30 min) to ensure optimum quality. The second day is de-

voted to transducing the lentiviral shRNA library (Basic Protocol 2). Transduction itself takes ~ 2 hr, followed by a 6-hr-long incubation period before the addition of the culture medium. It then takes 21 days for the

Coulon et al.

21 of 24

Table 4 β -scores of Different Plates After Transduction at MOI2 or MOI4

	β -score	
	MOI2	MOI4
Plate 1	2.26	3.9
Plate 2	1.66	1.67
Plate 3	1.38	1.61
Plate 4	2.14	2.67
Plate 5	2.05	1.33
Plate 6	2.82	2.33
Plate 7	1.94	2.35
Plate 8	1.86	2.67
Plate 9	1.31	2.46
Plate 10	1.33	1.6
Plate 11	1.56	2.02
Mean \pm SD	1.85 \pm 0.46	2.24 \pm 0.72

development of the neural network and the maturation of synapses. During these 21 days, the level of medium must be regularly monitored (1 to 2 times a week). Day 21 is devoted to cell fixation, saturation, and incubation with primary antibodies (Basic Protocol 3). These steps take 3 hr, including 2 hr of incubation. Day 22 is devoted to washing and incubation with secondary antibodies, followed by image acquisition. This immunostaining also takes 3 hr, including 2 hr of incubation. Image acquisition (Basic Protocol 4) must be carried out immediately after immunolabeling and usually takes 8 hr per plate. Each plate must be read immediately, one after the other. Data analysis in Columbus (Basic Protocol 5) takes a variable amount of time, depending on the training time required for successful spot detection. Approximately 10 hr is required for one screening (four plates). Data analysis in Matlab (Basic Protocol 6) takes \sim 6 hr per screening plate.

Acknowledgments

The authors thank Equipex for the Equipex ImagInEx HCS platform for the robotic control and automated microscopy. This work was supported by Fondation Alzheimer (903716), Agence national de la recherche (ANR-21-CE16-0010), Sanofi iAwards Europe 2019 (196026), and Fondation pour la recherche médicale (ALZ201912009628). This work was also funded by the Lille Métropole Communauté Urbaine and the French government's LABEX DISTALZ program (Develop-

ment of innovative strategies for a transdisciplinary approach to Alzheimer's disease). In addition, this work was funded by the Network of Centres of Excellence in Neurodegeneration (CoEN, pathfinder 5010).

Author Contributions

AC conducted the experiments and wrote the original draft; AC, DSW, CN, CG, AMA, FD, and EL conducted primary rat hippocampal cultures; AC, TM, and DK developed methodology and analyzed the data; AV and PB provided access to and technical help for the ImagInEx platform; JCL, DK, JD, and JC conceived the idea and managed the project. All authors reviewed and edited the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Data Availability Statement

Screening data are available from the corresponding author upon request.

Supporting Information

Aspirate.LHC

Program for BioTek plate washer used in Basic Protocol 3.

Aspirate-Dispense.LHC

Program for BioTek plate washer used in Basic Protocol 3.

HCS_CPCB_annotated.m

Program for Matlab used in Basic Protocol 6. Please note that we annotated the .m file such that readers can rewrite the code in the computational platform of their choice.

HCS_Synapse.aas

Program for Columbus software used in Basic Protocol 5.

Wash_primary.pro

Program for VWorks software used in Basic Protocol 3.

Wash_secondary.pro

Program for VWorks software used in Basic Protocol 3.

Literature Cited

Bellenguez, C., Kiciukali, F., Jansen, I. E., Kleiheidam, L., Moreno-Grau, S., Amin, N., Naj, A. C., Campos-Martin, R., Grenier-Boley, B., Andrade, V., Holmans, P. A., Boland, A., Damotte, V., van der Lee, S. J., Costa, M. R., Kuulasmaa, T., Yang, Q., de Rojas, I., Bis, J. C., ... Lambert, J.-C. (2022). New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and

- related dementias. *Nature Genetics*, 54, 412–436. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01024-z>
- Bellucci, A., Mercuri, N. B., Venneri, A., Faustini, G., Longhena, F., Pizzi, M., Missale, C., & Spano, P. (2016). Review: Parkinson's disease: From synaptic loss to connectome dysfunction. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 42, 77–94. <https://doi.org/10.1111/nan.12297>
- Berryer, M. H., Rizki, G., Nathanson, A., Klein, J. A., Trendafilova, D., Susco, S. G., Lam, D., Messana, A., Holton, K. M., Karhohs, K. W., Cimini, B. A., Pfaff, K., Carpenter, A. E., Rubin, L. L., & Barrett, L. E. (2023). High-content synaptic phenotyping in human cellular models reveals a role for BET proteins in synapse assembly. *eLife*, 12, e80168. <https://doi.org/10.7554/eLife.80168>
- Danielson, E., & Lee, S. H. (2014). SynPAnal: Software for rapid quantification of the density and intensity of protein puncta from fluorescence microscopy images of neurons. *PLOS ONE*, 9, e115298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115298>
- DeKosky, S. T., & Scheff, S. W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. *Annals of Neurology*, 27, 457–464. <https://doi.org/10.1002/ana.410270502>
- Fogarty, M. J. (2019). Amyotrophic lateral sclerosis as a synaptopathy. *Neural Regeneration Research*, 14, 189–192. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.244782>
- Gigg, J., McEwan, F., Smausz, R., Neill, J., & Harte, M. K. (2020). Synaptic biomarker reduction and impaired cognition in the sub-chronic PCP mouse model for schizophrenia. *Journal of Psychopharmacology*, 34, 115–124. <https://doi.org/10.1177/0269881119874446>
- Green, M. V., Pengo, T., Raybuck, J. D., Naqvi, T., McMullan, H. M., Hawkinson, J. E., Marron Fernandez de Velasco, E., Muntean, B. S., Martemyanov, K. A., Satterfield, R., Young Jr, S. M., & Thayer, S. A. (2019). Automated live-cell imaging of synapses in rat and human neuronal cultures. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 467. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00467>
- Jiang, H., Esparza, T. J., Kummer, T. T., Zhong, H., Rettig, J., & Brody, D. L. (2020). Live neuron high-content screening reveals synaptotoxic activity in alzheimer mouse model homogenates. *Scientific Reports*, 10, 3412. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60118-y>
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nature Protocols*, 1, 2406–2415. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.356>
- Kilinc, D., Vreulx, A.-C., Mendes, T., Flaig, A., Marques-Coelho, D., Verschoore, M., Demiautte, F., Amouyel, P., Neuro-CEB Brain Bank, Eysert, F., Dourlen, P., Chapuis, J., Costa, M. R., Malmanche, N., Checler, F., & Lambert, J.-C. (2020). Pyk2 overexpression in postsynaptic neurons blocks amyloid β 1-42-induced synaptotoxicity in microfluidic co-cultures. *Brain Communications*, 2, fcaa139. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa139>
- Kunkle, B. W., Grenier-Boley, B., Sims, R., Bis, J. C., Damotte, V., Naj, A. C., Boland, A., Vronskaya, M., van der Lee, S. J., Amlie-Wolf, A., Bellenguez, C., Frizatti, A., Chouraki, V., Martin, E. R., Sleegers, K., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., Hamilton-Nelson, K. L., Moreno-Grau, S., Polygenic and Environmental Risk for Alzheimer's Disease Consortium (GERAD/PERADES). (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, 414–430. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0358-2>
- Mendes, T., Herledan, A., Leroux, F., Deprez, B., Lambert, J.-C., & Kilinc, D. (2020). High-content screening for protein-protein interaction modulators using proximity ligation assay in primary neurons. *Current Protocols in Cell Biology*, 86, e100. <https://doi.org/10.1002/cpcb.100>
- Monteiro, P., & Feng, G. (2017). SHANK proteins: Roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nature Reviews Neuroscience*, 18, 147–157. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.183>
- Moreno Manrique, J. F., Voit, P. R., Windsor, K. E., Karla, A. R., Rodriguez, S. R., & Beaudoin, G. M. J. (2021). SynapseJ: An automated, synapse identification macro for ImageJ. *Frontiers in Neural Circuits*, 15, 731333. <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.731333>
- Nieland, T. J. F., Logan, D. J., Saulnier, J., Lam, D., Johnson, C., Root, D. E., Carpenter, A. E., & Sabatini, B. L. (2014). High content image analysis identifies novel regulators of synaptogenesis in a high-throughput RNAi screen of primary neurons. *PLOS ONE*, 9, e91744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091744>
- Spicer, T. P., Hubbs, C., Vaissiere, T., Collija, D., Rojas, C., Kilinc, M., Vick, K., Madoux, F., Baillargeon, P., Shumate, J., Martemyanov, K. A., Page, D. T., Puthanveetil, S., Hodder, P., Davis, R., Miller, C. A., Scampavia, L., & Rumbaugh, G. (2017). Improved scalability of neuron-based phenotypic screening assays for therapeutic discovery in neuropsychiatric disorders. *Molecular Neuropsychiatry*, 3, 141–150. <https://doi.org/10.1159/000481731>
- Verschuuren, M., Verstraelen, P., García-Díaz Barriga, G., Cilissen, I., Coninx, E., Verslegers, M., Larsen, P. H., Nuydens, R., & de Vos, W. H. (2019). High-throughput microscopy exposes a pharmacological window in which dual leucine zipper kinase inhibition preserves neuronal network connectivity. *Acta Neuropathologica Communications*, 7, 93. <https://doi.org/10.1186/s40478-019-0741-3>
- Verstraelen, P., García-Díaz Barriga, G., Verschuuren, M., Asselbergh, B., Nuydens, R., Larsen, P. H., Timmermans, J.-P., & de Vos, W. H. (2020). Systematic quantification of synapses in primary neuronal culture. *iScience*,

Coulon et al.

23 of 24

23, 101542. <https://doi.org/10.1016/j.jisci.2020.101542>

Wang, Y., Wang, C., Ranefall, P., Broussard, G. J., Wang, Y., Shi, G., Lyu, B., Wu, C.-T., Wang, Y., Tian, L., & Yu, G. (2020). SynQuant: An automatic tool to quantify synapses from microscopy images. *Bioinformatics*, *36*, 1599–1606. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz760>

Wong, M., & Guo, D. (2013). Dendritic spine pathology in epilepsy: Cause or consequence?

Neuroscience, *251*, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.048>

Zhang, X. D., Ferrer, M., Espeseth, A. S., Marine, S. D., Stec, E. M., Crackower, M. A., Holder, D. J., Heyse, J. F., & Strulovici, B. (2007). The use of strictly standardized mean difference for hit selection in primary RNA interference high-throughput screening experiments. *Journal of Biomolecular Screening*, *12*, 497–509. <https://doi.org/10.1177/1087057107300646>

Article 2 : REVEALING THE IMPACT OF THE ALZHEIMER GENETIC RISK FACTOR *PLCG2* ON SYNAPTIC FUNCTIONS AND ALZHEIMER-RELATED PATHOPHYSIOLOGICAL HALLMARKS

Audrey Coulon*¹, Florian Rabiller*¹, Avishek Roy*², Dolores Siedlecki-Wullich¹, Ana Raquel Melo de Farias¹, Chloé Najdek¹, Nina Lannette-Weimann¹, Carla Gelle¹, Anne-Marie Ayrat¹, Florie Demiautte¹, Séverine Deforges², Marcos Costa¹, Devrim Kilinc¹, Christophe Mulle*², Julien Chapuis*¹, Julie Dumont*^{1#}, Jean-Charles Lambert*^{1#}

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

²Interdisciplinary Institute for Neuroscience, CNRS UMR 5297, University of Bordeaux, France.

*Contributed equally

#Address correspondence to: julie.dumont@univ-lille.fr, jean-charles.lambert@pasteur-lille.fr

I) Contexte bibliographique et objectifs

L'approche par criblage à haut-contenu décrite précédemment m'a permis d'évaluer l'impact d'une banque de shARNs ciblant 198 gènes associés au risque de MA sur la densité synaptique de cultures de neurones hippocampiques de rats. Les méthodes HCS, et en particulier celles basées sur l'interférence ARN, comportent cependant un risque de résultats faussement positifs, et doivent faire l'objet d'étapes de validation afin de s'assurer de la fiabilité des effets observés. De plus, notre approche HCS se concentre uniquement sur l'étude morphologique des synapses, au risque de négliger de potentiels changements fonctionnels de l'activité électrique neuronale. Il a notamment été montré que l'activité spontanée dans les cultures de neurones primaires ne corrèle pas linéairement avec la densité synaptique (422). Pour ces différentes raisons, j'ai mis en place des approches complémentaires permettant de valider la spécificité de la sous-expression des gènes sélectionnés par l'approche HCS, et d'étudier leurs impacts sur l'activité électrique des neurones.

II) Résultats

Notre approche de criblage HCS a permis d'identifier 9 gènes associés au risque de MA influençant le nombre de synapses dans un modèle de culture primaire de neurones de rat : 5 gènes dont la sous-expression induisait une diminution de la densité synaptique (*USP6NL*, *PSMC3*, *PLCG2*, *CSNK1G1*, et *CYB561*), et 4 gènes dans la sous-expression induisait une augmentation de la densité synaptique (*SNX1*, *ICA1L*, *OPLAH*, et *NCK2*).

Pour ces 9 gènes, j'ai (i) validé que la transduction des shARNs utilisés dans le criblage entraînait bien une diminution de l'expression de la protéine, (ii) étudié par technique de fractionnement leurs niveaux d'expression dans les compartiments pré- ou post- synaptiques, et (iii) évalué l'impact de leurs sous-expression sur l'activité électrique spontanée par Micro-Electrode Array (MEA).

De manière intéressante, l'un des gènes dont l'effet sur la densité synaptique et l'activité électrique neuronale était le plus important était le gène *PLCG2*. Ce gène code pour une phospholipase C qui catalyse la synthèse des seconds messagers DAG (diacyl-glycerol) et IP3 (myo-inositol 1,4,5-trisphosphate), contrôlant notamment l'homéostasie du calcium intracellulaire. Le rôle du gène *PLCG2* dans la MA est documenté, en raison de l'effet protecteur du variant P522R associé à (i) une augmentation modérée de l'activité phospholipase (374) et (ii) un effet bénéfique dans la clairance des peptides amyloïdes par les cellules microgliales (299). Outre ce variant hypermorphique, l'équipe de Mikko Hultinen (Kuiopo, Finlande) avec laquelle nous collaborons, a identifié deux nouveaux variants rares du gène *PLCG2*, nommés Q816X et R953X, conduisant à l'introduction de codons stop prématurés et associés à une augmentation du risque de MA (**Figure 22**).

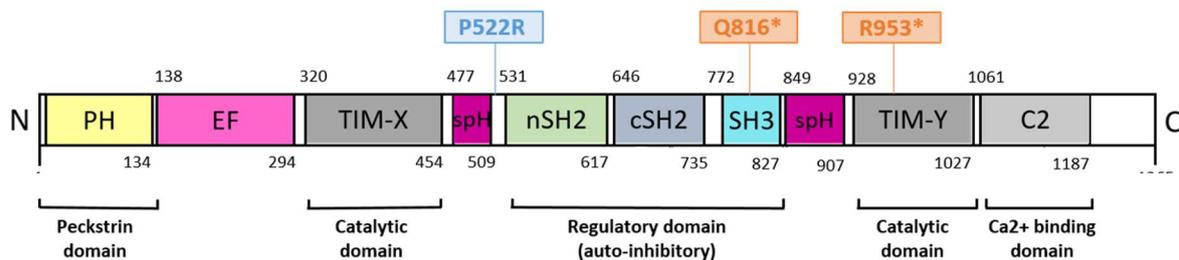


Figure 22 : Localisation des variants P522R, Q816X, et R953X de PLCG2. La protéine PLCG2 est composée de plusieurs domaines. Le variant P522R associé à une diminution du risque de MA (en bleu) est situé à proximité du domaine auto-inhibiteur de PLCG2. Les variants Q816X et R953X associés à une augmentation du risque de MA (en orange) sont situés respectivement dans le domaine SH3 et le domaine catalytique de la protéine.

La caractérisation d'un cerveau d'une patiente atteinte de MA et porteuse de la mutation R953X a permis d'associer la présence du codon stop prématuré à une réduction importante de l'expression de *PLCG2* au niveau protéique (M. Hultinen, communication personnelle). Afin de mieux comprendre comment les variants génétiques à l'origine d'une diminution d'expression de *PLCG2* influencent le développement de la MA, nous avons analysé par des approches *in vitro* et *ex vivo*, l'impact d'un shARN dirigé contre *PLCG2* sur la densité synaptique, l'activité électrique neuronale, le métabolisme de l'APP, et la phosphorylation de Tau.

Les transcrits de *PLCG2* étant retrouvés dans le gyrus denté chez la souris (374), une collaboration avec l'équipe du Dr. Christophe Mulle (*Interdisciplinary Institute For Neuroscience*, Bordeaux) a permis d'étudier l'effet de la sous-expression de *Plcg2* dans le gyrus denté de souris sur la morphologie des dendrites (**Figure 23**).

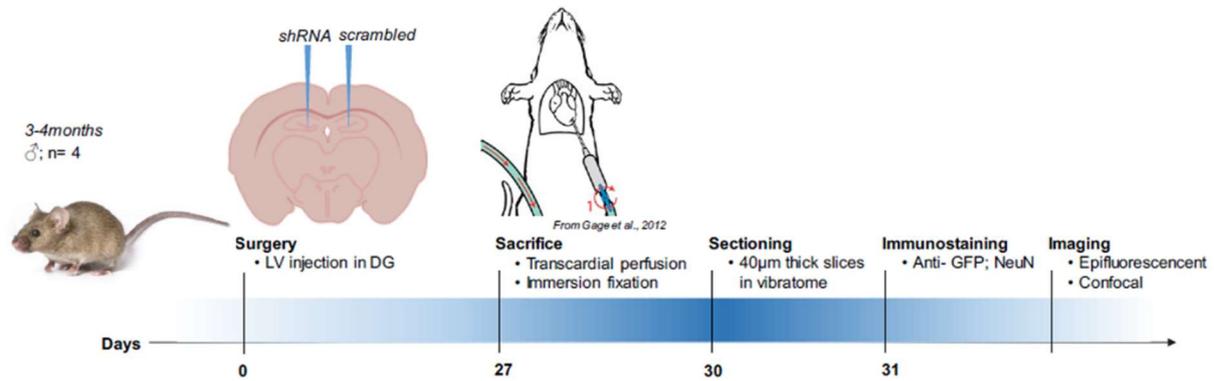


Figure 23 : Etude de la sous-expression de *Plcg2* dans le gyrus denté de souris sur la morphologie des dendrites. Des vecteurs lentiviraux exprimant un shARN contrôle ou un shARN ciblant *Plcg2*, associé à un marquage GFP, sont injectés dans l'hippocampe de souris mâles adultes. Après 27 jours, les souris sont anesthésiées et perfusées. Des sections de cerveaux sont réalisées à l'aide d'un vibratome et marquées par immunofluorescence pour la GFP et NeuN (un marqueur neuronal). Les images acquises au microscope confocal permettent l'analyse de la taille et de l'arborisation des dendrites.

Les résultats montrent que l'inhibition de *Plcg2* dans le gyrus denté des souris conduit à la diminution de la taille et de la complexité de l'arborisation dendritiques au niveau des neurones granulaires.

Afin de mieux comprendre le lien entre le gène *PLCG2* et la MA, j'ai développé un modèle de culture mixtes de neurones et d'astrocytes humains issus d'iPSCs exprimant de façon stable un shARN dirigé contre ce gène (**Figure 24**).

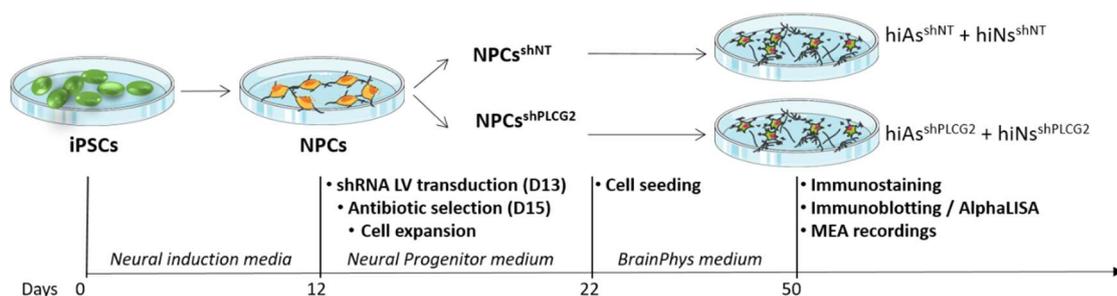


Figure 24. Modèle de culture mixtes de neurones et d'astrocytes humains dérivés d'iPSCs exprimant un shARN dirigé contre *PLCG2* (shPLCG2) ou un shARN contrôle (shNT, Non-Targeting). Après l'induction des iPSCs en NPCs (*Neural Progenitor Cells*), un vecteur lentiviral exprimant le shNT ou le shPLCG2 et une cassette de sélection est transduit dans les cellules. Une fois la sélection par antibiotique et l'expansion des cellules réalisées, les NPCs exprimant stablement le shARN sont différenciées en cultures humaines astrocytaires (hiAs) et neuronales (hiNs). L'impact de la sous-expression du gène *PLCG2* dans ce modèle a été évalué par immunofluorescence, western-blot, alpha-LISA, et MEA.

Nos résultats montrent que la sous-expression de *PLCG2*, mimant l'effet des variants génétiques Q816X and R953X, induit une importante diminution de la densité synaptique et de l'activité électrique neuronale, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'A β , et de la phosphorylation de la protéine Tau, par un mécanisme susceptible d'impliquer GSK3 β .

III) Commentaires

Nos résultats ont notamment permis de :

- (i) Montrer que l'effet de *PLCG2* dans la MA n'est pas uniquement médié par les cellules microgliales.

L'expression de *PLCG2* étant principalement microgliale, les études post-GWAS se sont concentrées uniquement sur l'étude des fonctions de ce gène dans ce type cellulaire. Pour autant, notre approche de criblage HCS a montré un effet de la sous-expression de *Plcg2* dans des cultures primaires de rats néo-nataux où la microglie n'est pas présente, et nos expériences de fractionnement synaptique montrent une expression de *Plcg2* dans les compartiments pré- et post- synaptiques. En inhibant l'expression de *Plcg2* dans les neurones du gyrus denté de souris, ou dans des cultures mixtes astrocytaires et neuronales humaines, nous avons mis en évidence un rôle jusqu'ici inconnu du gène *PLCG2* dans les fonctions synaptiques et neuronales, qui n'est pas médié par les cellules microgliales.

- (ii) Préciser les mécanismes par lesquels des variants génétiques à l'origine d'une perte de fonction de *PLCG2* dans les neurones pourraient impacter la physiopathologie de la MA.

Nos expériences basées sur l'expression d'un ARN interférent afin de sous exprimer *PLCG2* permettent de mimer les conséquences de la présence des variants à risque Q816X et R953X. Nous avons ainsi pu suggérer que la présence de ces variants de *PLCG2* augmente le risque de MA par un impact délétère sur la densité synaptique et l'activité électrique neuronale, la production de peptides amyloïdes, ainsi que la phosphorylation de la protéine Tau, par un mécanisme probablement médié par GSK3 β .

IV) Expériences complémentaires

Dans ce contexte, d'autres expériences en cours visent à valider l'impact de la sous-expression de *Plcg2* dans le gyrus denté des souris sur les fonctions synaptiques par des mesures électrophysiologiques de patch-clamp *ex vivo*. Ces analyses permettront entre autres d'évaluer l'impact de *Plcg2* sur les propriétés intrinsèques neuronales ainsi que sur l'amplitude et la fréquence des courants excitateurs post-synaptiques.

Par ailleurs, puisque nos résultats ont été obtenus à partir de cultures mixtes astrocytaires et neuronales humaines, nous ne pouvons pas exclure que la sous-expression de *PLCG2* dans les astrocytes n'ait pas d'impact sur les effets observés. En conséquence, nous développons actuellement un nouveau modèle de culture purement neuronale *via* l'expression d'*ASCL1*. L'expression du gène *ASCL1* dans les progéniteurs neuronaux facilite en effet leurs différenciations, et permet l'obtention de culture de neurones humains purs (423). Des astrocytes humains exogènes peuvent ensuite être ajoutés à ces cultures pour soutenir la maturation des neurones. Ce modèle cellulaire nous permettrait de sous-exprimer *PLCG2* uniquement dans les neurones ou dans les astrocytes, et de déterminer le type cellulaire médiant les effets précédemment décrits.

Pour finir, d'autres expériences sont actuellement en cours afin d'évaluer de manière directe les effets du variant protecteur P522R, et des variants délétères Q816X et R953X de *PLCG2* sur les phénotypes associés à la MA. La ré-expression du gène *PLCG2* porteur des différents variants dans les progéniteurs neuronaux sh*PLCG2* permettra d'évaluer l'impact de ces variants fonctionnels sur la densité synaptique, le métabolisme de l'APP, et la phosphorylation de Tau.

Revealing the impact of the Alzheimer genetic risk factor *PLCG2* on synaptic functions and Alzheimer-related pathophysiological hallmarks

Audrey Coulon*¹, Florian Rabiller*¹, Avishek Roy*², Dolores Siedlecki-Wullich¹, Tiago Mendes¹, Anaël Ehrardt², Ana Raquel Melo de Farias¹, Chloé Najdek¹, Nina Lannette-Weimann¹, Carla Gelle¹, Alejandra Freire-Regatillo¹, Erwan Lambert¹, Anne-Marie Ayrat¹, Florie Demiautte¹, Séverine Deforges², Marcos Costa¹, Devrim Kilinc¹, Christophe Mulle*², Julien Chapuis*¹, Julie Dumont*^{1#}, Jean-Charles Lambert*^{1#}

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

²Interdisciplinary Institute for Neuroscience, CNRS UMR 5297, University of Bordeaux, France.

*Contributed equally

#Address correspondence to: julie.dumont@univ-lille.fr, jean-charles.lambert@pasteur-lille.fr

ABSTRACT

Synaptic dysfunction/loss is one of the earliest brain pathologies in Alzheimer's disease (AD) and the strongest marker of cognitive decline. However, little is known about the role that genetic risk factors for Alzheimer's disease may have on synaptic loss. Here, we developed a high-content screening to characterize the effect of 198 AD genetic risk factors on synaptic density in rat primary neuronal cultures, selecting 9 genes with strong effects. Among these 9 genes, we also determined that 5 of them were able to influence the electrophysiological properties of rat primary neurons using multi-electrode arrays. We decided to further analyze *PLCG2*, which was initially proposed to modulate AD risk through microglial functions. We showed that shRNA-mediated silencing of *Plcg2* in the mouse dentate gyrus reduces the size and complexity of dendritic arborization and the spine density of granule cells. We also demonstrated that *PLCG2* silencing in human iPSC-derived neurons and astrocytes negatively affects synaptic density and electrical activity in a microfluidic device, extending our findings to a human model. In addition, we observed significantly increased A β production and Tau hyperphosphorylation in cells silenced for *PLCG2*, through a mechanism that probably involves GSK3 β activation. Taken together, these findings suggest a novel role for *PLCG2* in the etiological mechanisms of AD and highlight the need for characterization of unknown pleiotropic functions prior to the development of relevant therapeutic approaches against targets such as *PLCG2*.

Key words: Alzheimer's disease, *PLCG2*, synapse, neuron, gene variant

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is characterized by intracellular aggregation of abnormally hyperphosphorylated Tau protein and extracellular accumulation of amyloid beta (A β) in plaques. According to the "amyloid cascade hypothesis", A β aggregation is an early triggering, toxic condition that can induce Tau aggregation and neuronal death. However, while recent clinical studies using anti-A β therapies in principle support this hypothesis¹, this one has been called partly into question² and has been regularly modified to reflect advancements in our understanding of AD^{3,4}. It is now well accepted that this hypothesis appears to be overly simplistic and fails to account for the intricacy and heterogeneity of the pathophysiological processes involved in the common forms of the disease.

Interestingly, the proportion of risk attributable to genetic susceptibility factors for AD has been estimated to be between 60% and 80% in twin studies⁵. Consequently, defining the genetic component of these common forms is one way of gaining a better understanding of the fundamental disease processes in order to generate complementary/alternative hypotheses integrating additional factors. Thanks to the development of genome-wide association studies (GWASs) and high-throughput sequencing, the AD genetic landscape has been considerably improved over the last fifteen years with the characterization of 76 loci associated with the AD risk⁶⁻⁸. However, it can be difficult to identify the functional genes and variants within these loci and to understand how they mechanistically contribute to AD pathogenesis. These points are important challenges of the post-GWAS era and strong efforts are developed to decipher the link between AD genetics and pathogenesis. To date, enrichment pathway analyses and biological studies have directly linked AD risk genes to APP metabolism, pathophysiological processes linked to Tau, immunity and microglia, a cell-type that was previously neglected in the context of AD pathophysiology⁹⁻¹². In view of the "amyloid cascade hypothesis" limits and the complexity suggested by the new genetic landscape, several non-exclusive hypotheses have been put forward. For example, the "cellular phase" hypothesis postulates feedback and anticipation reactions between all the various cell types in the brain¹³. The "genetically driven synaptic failure" model is based on specific synaptic fragility/sensitivity to pathological triggers, depending on genetic risk factors¹³ of which for several of them, synaptic functions have already been assigned such as BIN1, FERMT2, PTK2B or CD2AP¹⁴⁻¹⁷. The later fits with key clinical observations that synapse dysfunction/loss is (i) one of the earliest pathological hallmarks in the brain before hippocampal neuronal death and (ii) the strongest marker of cognitive decline (for a review, see¹⁸⁻²⁰).

Within this background, we decided to specifically address the potential synaptic functions of the genes located in the loci associated with AD risk as reported in ⁶. For this purpose, we developed a high-content screening (HCS) allowing us to systematically analyze the impact of the under-expression of a large number of genes in the AD loci on synaptic density and to reveal potential functions of these genes on synaptic functions.

RESULTS

HCS identifies GWAS-defined genes as potential modulators of synapse density

In order to determine whether AD genetic risk factors may contribute to synaptic functions, we developed a HCS approach to systematically characterize the impact of GWAS-defined genes on synaptic density, i.e., more than 300 genes associated with the risk of developing AD in 76 loci (see supplementary data). From this gene list, we then developed and screened a lentiviral shRNA library

targeting 198 genes that we selected as expressed in brain cells (according to publicly available RNAseq datasets). This screen was realized in 384-well plates using rat hippocampal primary neuronal cultures (PNCs) and cells were transduced at day in vitro (DIV) 1 using two multiplicities of infection (MOI 2 and 4). Non-targeting shRNA (shNT) and shRNA against Synaptophysin 1 (shSyp) were used as controls for transduction. Immunofluorescence was conducted against SYP (a pre-synaptic marker), HOMER1 (a post-synaptic marker) and MAP2 (somatodendritic marker). Synaptic density was then assessed by a high-content analysis workflow by assigning each post-synaptic structure to the nearest pre-synaptic structure as previously published²¹. In three independent experiments, we selected the genes that had the strongest effect on synaptic density (the top and bottom 5%). Under-expression of five AD-risk genes was associated with lower synaptic density whereas under-expression of four was associated with higher synaptic density (**figure 1**). Of note, we validated in PNCs the impact of shRNAs on protein levels for the 9 genes selected (**figure 2a-b**). In conclusion, high-content screening allowed us to identify several genes located within the loci associated with AD risk that may influence synaptic density in rat PNCs.

GWAS-defined genes and especially *PLCG2*, impacts electrophysiological properties of PNCs

We first determined whether proteins encoded by the 9 genes selected above could be detected in synaptosomes purified from PNCs (**supplementary figure 1**). We observed their presence in the PSD95 fraction, in the non-PSD95 fraction, or in both fractions with the exception of *OPLAH* that is mostly cytosolic and *CYB561* that we did not detect.

We then analyzed the impact of their under-expression on electrophysiological properties of PNCs using multiple electrode arrays (MEAs). Mean spike and burst frequencies were used as read-outs for neuronal activity at DIV21 (**figures 2c and 2d**, respectively). As a positive control, under-expression of *Syp* showed an impact in both read-outs. Similar to *Syp* under-expression, *Usp6nl*, *Psmc3* and *Plcg2* underexpressions significantly decreased spike and burst frequencies at DIV21. These results are of particular interest since *PLCG2* was believed to be almost only expressed in microglia and, as a consequence, this AD risk gene was almost exclusively investigated in this cell type²²⁻²⁵. We thus focused on *PLCG2*, which is also expressed in glutamatergic neurons as evidenced by (i) recent, publicly available Allen Brain single-nuclei (sn) RNAseq datasets from human brains (<https://portal.brain-map.org/atlas-and-data/rnaseq>) and (ii) in-house snRNAseq datasets from human brain organoids (**supplementary figure 2**).

***Plcg2* silencing in mouse dentate gyrus reduces dendritic arborization complexity and spine density of granule cells**

PLCG2 transcript is highly expressed in the dentate gyrus (DG), in mouse and human²⁶. The DG is the main gateway from the entorhinal cortex inputs to the hippocampus; it sends its axonal projections to CA3 through mossy fibers (Mf)²⁷, which is essential for the rapid encoding of episodic memory, a feature which is affected at early stages of AD. In mouse models of AD, synaptic plasticity in the DG or at its output Mf-CA3 synapses are severely affected^{28,29}. In order to explore the impact of silencing *PLCG2* gene on the morphological properties of DG granule cells, lentivirus encoding either a shRNA against *PLCG2* (LV-sh*PLCG2*-GFP) or a non-targeting control shRNA (LV-shNT-GFP) were injected in the dorsal hippocampus of adult male mice. A prominent expression of GFP was observed in both experimental groups in the DG, spanning from the dorsal to ventral hippocampus (-1.46mm to -2.9mm), even if GFP expression appeared more intense in the shNT than the sh*PLCG2* injected side (**supplementary Figure 3**). In order to explore potential morphological changes in dendritic trees after

PLCG2 silencing in the DG, we measured total dendritic length, total dendritic volume and total dendritic surface area (**Figure 3a**). Total dendrite length was close to show a significant change ($p=0.0501$; $n=26$; **figure 3b**), whereas total volume and total surface area of granule cell dendrites were significantly reduced after silencing *PLCG2*, as compared to the non-targeting counterpart (respectively $p<0.0001$; $n=26$; and $p=0.0273$; $n=26$, **figure 3 c-d**). In addition, we observed a significant reduction in the spine density on the sh*PLCG2* injected side compared to the shNT group, regardless of the spine type (**figure 3g**) ($p<0.0001$; $n=25$; **figure 3e-f**). In conclusion, in accordance with our results observed *in vitro*, *PLCG2* under-expression is able to impact synaptic function *ex vivo*.

***PLCG2* silencing in human iPSC-derived neurons/astrocytes negatively impacts synaptic density and function**

We then sought to extend our findings in rodents to an *in vitro* model based on neurons derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). After 4 weeks of spontaneous differentiation from neural progenitor cells (NPCs) transduced with either a shNT (sham control) or a shRNA targeting *PLCG2* (sh*PLCG2*), we obtained a mixed culture of mature human induced neurons (hiNs) and astrocytes (hiAs) (**figure 4a**). We validated that the *PLCG2* under-expression was effective and, of note, we confirmed that sh*PLCG2* did not extinguish *PLCG1* expression in this mixed culture by immunoblotting (**figure 4b**). We then used custom-designed microfluidic devices to characterize the impact of *PLCG2* silencing on synaptic density in our mixed hiN/hiA cultures. Immunocytochemistry using antibodies targeting pre- and post-synaptic markers was performed and synaptic density was assessed by assigning each post-synaptic marker (Homer1) to the nearest pre-synaptic marker (Synaptophysin 1) as previously described²¹ (**figure 4c**). We fully replicated in hiNs/hiAs the results we obtained in the HCS experiments using rat primary hippocampal neuronal cultures, *i.e.*, *PLCG2* under-expression negatively affects synaptic density (**figure 4d-e**). Lastly, we developed a custom-designed microfluidic device coupled with MEA and, once again, we replicated in hiN/hiA mixed cultures the results we obtained in rat PNCs, *i.e.*, *PLCG2* under-expression induced a decrease in spike and burst frequencies (**figure 4f**). In conclusion, in accordance with our results observed in the rodent brain, *PLCG2* under-expression impacts synaptic function *in vitro* in hiNs/hiAs cultures.

***PLCG2* silencing in human iPSC-derived neurons/astrocytes increases Tau phosphorylation and A β production**

We next investigated the potential impact of *PLCG2* silencing in hiNs/hiAs co-cultures on the different hallmarks of AD, *i.e.*, quantity and phosphorylation state of Tau and APP metabolism. *PLCG2* silencing was associated with a strong increase in Tau phosphorylation at multiple epitopes in hiN/hiA cultures (**figure 5a-b**). Notably, an increase in total Tau expression was also detected (**figure 5c**). Regarding the impact of *PLCG2* silencing on APP metabolism, a significant increase in both APP expression (**figure 5c**) and A β secretion (**figure 5d**) was detected in the mixed cultures under-expressing *PLCG2*. These data thus suggest that *PLCG2* may be directly involved in the development of the main pathological hallmarks of AD.

We finally investigated whether the impact of *PLCG2* silencing on Tau hyperphosphorylation could be mediated through the regulation of ERK1/2, GSK3- β , p38/MAPK, AKT and PYK2 kinases, known actors of Tau phosphorylation (**figure 6a-b**). No difference in the protein levels or phosphorylation status of ERK1/2 or p38/MAPK was observed when *PLCG2* was under-expressed. However, *PLCG2* shRNA-mediated under-expression increased the levels of phosphorylated forms of PYK2 and GSK3 β kinases at Y402 and Y216 residues, respectively. In contrast, phosphorylation of AKT at S473 was decreased in

neurons/astrocytes that express a shRNA against *PLCG2*. Of note, the protein level of GSK3 β was also increased.

DISCUSSION

Functional analyses of several GWAS-defined genes that interact with the amyloid or tau pathologies showed that many of these genes are involved in neuronal function and synaptic plasticity. To determine whether additional AD genetic risk factors may contribute to the genetically driven synaptic failure in AD, we developed an HCS to systematically characterize the impact of the silencing of GWAS-defined genes on synaptic density. Surprisingly, among the genes with the strongest impact on synaptic density, *PLCG2* appeared as a candidate of particular interest.

PLCG2 is a phospholipase C that catalyzes the synthesis of second messengers DAG (diacylglycerol) and IP₃ (inositol 1,4,5-trisphosphate) from the membrane phospholipid PIP₂ (1-phosphatidyl-1D-myoinositol 4,5-bisphosphate). DAG activates the calcium dependent protein kinase C (PKC), which phosphorylates downstream effectors including AKT to activate a variety of cellular functions such as cell polarity, cell proliferation, learning and memory³⁰. IP₃ binds to IP₃ receptors on the endoplasmic reticulum membrane, which induce the release of Ca²⁺ to the cytoplasm.

In AD, *PLCG2* has been mostly studied in microglia and shown to be implicated in multiple signaling pathways, leading to phagocytosis, secretion of cytokines and chemokines, cell survival and proliferation²²⁻²⁵. However, we and others found that *PLCG2* was also expressed in neurons and was localized to both the pre- and post-synaptic compartments²⁶⁻³¹. Our current results, based on three distinct experimental models (and different shRNAs), suggest a new role for this AD genetic risk factor at the synapses. First, shRNA-mediated *PLCG2* silencing strongly affected synapse density and electrophysiological properties in rat hippocampal neurons in vitro. Second, *PLCG2* silencing in the mouse brain resulted in significant reductions in the size and complexity of the dendritic arborization and in the spine density in DG granule cells. Third, *PLCG2* silencing negatively affected synaptic density and electrical activity in human iPSC-derived neuron/astrocyte mixed cultures. Although we cannot rule out the possibility that part of the observed impact of *PLCG2* under-expression on synaptic density and/or function stem from neurodevelopmental effects, our data suggest a role of *PLCG2* after neurodevelopment, since *PLCG2* silencing significantly altered dendritic arborization in the DG of 4-month-old mice, which potentially impacted electrophysiological properties of neurons.

In addition to these new putative roles of *PLCG2* at the synapses, we also observed that *PLCG2* may promote Tau hyperphosphorylation as well as APP overexpression and A β secretion in neurons, suggesting that *PLCG2* in neurons may directly participate in the development of the main hallmarks of AD. To better characterize the impact of *PLCG2* under-expression on Tau hyperphosphorylation in neurons, we also investigated several Tau kinases. Interestingly, we observed an increase in GSK3 β expression and activity through auto-phosphorylation at Y216 in human induced neurons/astrocytes silenced for *PLCG2*. In agreement with GSK3 β activation, we observed a significant increase in Tau phosphorylation at T181, S202-T205, T217, T231 and S396-404 residues which are known phosphorylation sites of this kinase. In addition, we observed a significant impact of *PLCG2* underexpression on phosphorylation-mediated activation of PYK2, a Ca²⁺-sensitive tyrosine kinase encoded by the *PTK2B* gene, another AD genetic risk factor that plays important roles in synapse formation and plasticity as well as in Tau pathology³². PYK2 is also suspected to regulate neuronal GSK3 β activity through tyrosine phosphorylation³³⁻³⁵. In human induced neurons/astrocytes, we also

detected that *PLCG2* silencing inhibits AKT phosphorylation at S473, which may explain the increase in GSK3 β tyrosine phosphorylation observed. Collectively, these data suggest that AKT and PYK2 can be part of a signaling cascade that mediate the impact of *PLCG2* silencing on increased GSK3 β activity, which, in turn, result in Tau hyperphosphorylation, synapse loss and dysfunction³⁶, as we observed in neurons. However, further experiments are needed in both *in vitro* and *in vivo* models to fully characterize the molecular mechanisms underlying *PLCG2* function in AD pathophysiology.

PLCG2 mediates calcium release from the endoplasmic reticulum *via* the synthesis of IP3 and neuronal calcium dyshomeostasis is a pathological feature of AD. Of note, many of the kinases involved in Tau hyperphosphorylation including AKT, PYK2 and GSK3 β are regulated by calcium^{32, 37, 38} and we detected significant changes in the phosphorylation-mediated activity of these three kinases in human induced neurons/astrocytes silenced for *PLCG2*. In this context, we can postulate that *PLCG2* silencing may dysregulate calcium homeostasis by triggering abnormal cytosolic and/or endoplasmic reticulum calcium levels, potentially explaining downstream effects on Tau hyperphosphorylation and the synaptic structure and function³⁹. According to this postulate, *PLCG2* underexpression may limit intracellular calcium oscillations that control neurotransmitter release, which can impair the regulation of excitatory postsynaptic currents and alter hippocampal synaptic plasticity and memory functions⁴⁰. Importantly, our results do fit with that we know about the genetic variants in *PLCG2* and associated AD risk. The *PLCG2* P522R variant has been described to be protective against AD and functionally hypermorphic²⁶. In contrast, rare loss-of-function (LOF) variants in *PLCG2* have been associated with an increased risk of AD in a Finnish population and in the European ADES dataset (unpublished data), including the Q816X and R953X variants. These two variants lead to a premature stop codon and the 953X allele has been associated with a significant decrease in *PLCG2* protein expression in the AD brain, which can be mimicked by a *PLCG2* shRNA (Mikko Hultinen, personal communication).

In conclusion, our results report a new role for the AD genetic risk factor *PLCG2* likely in neurons. Although we cannot rule out a potential role for *PLCG2* in astrocytes as well, our results in mouse DG neurons expressing *PLCG2* shRNA on dendritic arborization strongly argue in favor of a direct effect of *PLCG2* at the synapses. Through its role in intracellular calcium homeostasis, *PLCG2* dysfunction in neurons may result in the inactivation of phosphorylation cascades responsible for gene expression changes that are essential for neuronal survival and synaptic plasticity. Therefore, an overview of the transcriptome and phospho-proteome changes induced by the *PLCG2* gene variants would be informative for the identification of *PLCG2*-dependent signaling pathways. Lastly, *PLCG2* emerging as a major genetic risk factor for AD, it appears as a target of interest for drug development. In this context, knowing which signaling pathways are related to *PLCG2*, not only in microglia, but also in neurons, may be important for identifying druggable targets.

METHODS

Primary neuronal culture

Primary hippocampal and cortical neurons were obtained from P0 Wistar rats, according to previously described procedures with minor modifications⁴¹. Culture media and supplements were from Gibco, ThermoFisher Scientific, unless mentioned otherwise.

Briefly, hippocampi and cortex were isolated, washed with ice-cold dissection medium (HBSS supplemented with sodium pyruvate, HEPES, and penicillin/streptomycin), and trypsinized 10 min at

37°C (2.5%). Trypsin was then inactivated with dissociation medium (MEM supplemented with inactivated FBS, Glutamax, D-glucose (Sigma), MEM vitamins, and penicillin/streptomycin) containing DNase (5 mg/ml, Sigma). Tissues were then dissociated in culture medium (neurobasal A supplemented with glutamax and B27) to obtain a homogenous cell suspension, followed by centrifugation (200 × g for 8 min). Cells were resuspended in culture medium and seeded in plates precoated with poly-D-lysine (0.1 mg/mL, Sigma) in borate buffer, at a density of 50,000 cells/cm² for 384-well plates (Greiner bio-one), 100,000 cells/cm² for 24-well plates, or 125,000 cells/cm² for 10 cm culture dishes. For MEA 96-well plates, a 5 µL drop of a 15 000 cells was placed on the top of the electrodes, and medium was added after a minimum of 5 minutes to allow the cells to attach. For all types of culture, media was fully replaced after 24 hours and cells were maintained in a tissue culture incubator at 37°C with 5% CO₂ for 21 days.

Human induced neurons and astrocytes co-culture

Culture media and supplements were from Stem Cell Technologies, unless mentioned otherwise.

Available hiPSC cell line (ASE-9109, Applied Stem Cell Inc. CA, USA) was maintained in non-treated cell culture dishes/plates pre-coated with 10 µg/ml of vitronectin fresh-diluted in Cell Adhere Dilution Buffer, in mTeSR1 + 5X supplemented medium fully changed daily.

NPCs were generated using the embryoid body method detailed by Stem Cell Technologies and maintained in complete Neural Progenitor Medium (NPM, supplemented with supplements A and B), in treated cell culture dishes pre-coated with 0.001% poly-L-ornithine (PLO) diluted in water and 10 µg/mL laminin diluted in PBS 0.01M with Ca²⁺ and Mg²⁺. Full media change was performed daily.

To generate NPCs stably expressing shRNAs non-targeting or targeting PLCG2 gene, NPCs were transduced 4 hours after seeding with lentiviral shRNAs carrying an antibiotic resistance cassette (pLV-Hygro-U6>scramble_shRNA#1 and pLV-Hygro-U6>hPLCG2_shRNA#1, Vector Builder). Two days after the transduction, Hygromycin (500 µg/mL, Invitrogen) was added to cell medium and kept until selection was complete (approximately 10 days).

Mixed cultures of hiNs and hiAs were obtained from shRNA-transduced NPCs after 4 weeks of spontaneous differentiation. For immunoblotting and immunostaining, 70 000 NPCs/wells were plated in PLO/Laminin pre-coated 24-well cell imaging plates (Eppendorff, 0030741005). In microfluidic devices, 40 000 NPCs for synaptic density analysis, and 60 000 NPCs for electrophysiological recordings, were seeded in both chambers of pre-coated PLL/Laminin microfluidic chips. Cells were kept in complete NPM containing 10 µM of Y-27632 ROCK Inhibitor for 24 h, before adding an equal volume of complete BrainPhys medium (supplemented with N2, SM1, BDNF, GDNF, laminin, dibutyryl-cAMP, and ascorbic acid). Cells were maintained in a tissue culture incubator at 37 °C with 5% CO₂, and half-media changed was performed bi-weekly during 4 weeks.

HCS shRNA library

A HCS was performed to assess the impact of a lentiviral Mission pLKO,1-shRNA library targeting 198 AD-associated genes on synaptic density. The detailed methodology of our HCS was published elsewhere (Coulon et al. Curr Protoc, in press). The screening was organized in two parts: (i) 105 genes reported in 2019¹⁰, and (ii) 93 genes reported in 2022⁶. These genes were selected using The Allen Brain Human MTG SmartSeq Dataset (<https://portal.brain-map.org/atlas-and-data/rnaseq>) to limit our analysis to genes expressed in brain cells. Non-coding genes, and genes with no homologous in rats were also excluded. PNC were transduced at Multiplicity of Infection (MOI) 2 and 4, and the HCS

was performed three times using three independent neuronal cultures. A shRNA targeting Synaptophysin (shSyp, Mission, NM_009305 TRCN0000379864), and a shRNA non-targeting (shNT, Mission, shC002V) were used as positive and negative controls, respectively.

shRNA library Transduction

Primary neuronal culture (PNC) were transduced on DIV1 with lentiviral Mission pLKO,1-shRNA vectors (Merck). Viral constructs were added to pre-warmed supplemented culture media with 4- μ g/mL polybrene (hexadimethrine bromide, Sigma). Culture media was removed and transduction mixture was added to each well to reach 20 μ L final volume for 384-well plates or 250 μ L final volume for 24-well plates. PNC were incubated for 6 h before the same volume of fresh pre-warmed culture media was added.

Neural Progenitor Cells (NPCs) were transduced on DIV0/1 with lentiviral-shRNA vectors (pLV-Hygro-U6>scramble_shRNA#1 and pLV-Hygro-U6>hPLCG2_shRNA#1, Vector Builder). Viral constructs were diluted in cell culture medium and directly added on top of NPCs culture.

Immunostaining

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (EMS, Hatfield, PA) for 20 min at RT, permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS for 5 min at RT, and blocked with 5% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch) and 0.1% Triton X-100 for 1 h at RT. Alternatively, neurons in 384-well plates were blocked with 2.5% BSA and 0.1% Triton X-100 for 2 h at RT. Cells were washed with PBS at RT between each step. For 384-well plates, washes were automated using an automated platform (Works automation control software (Agilent), Direct Drive Robot (Agilent), Plate washer (BioTek, EL406)). After blocking, neurons were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: Chicken or Guinea-Pig anti-Homer 1 (Synaptic Systems, 160006 and 160004), Guinea-Pig or Mouse anti-Synaptophysin (Synaptic Systems, 101004 and 101011), Mouse or Chicken anti-MAP2 (Synaptic Systems, 188011 and 188006), Guinea-Pig anti-GFAP (Synaptic Systems, 173004), Rabbit anti-hTau (Dako, A0024), Mouse anti-pT231Tau (P. Davies, RZ3). After washes with PBS, cells were incubated 2h at RT with the following secondary antibodies: Donkey anti-Chicken Alexa 488 or 647 (Jackson ImmunoResearch, 703-545-155 and 703-605-155), Donkey anti-Rabbit Alexa 488 or 647 (Jackson ImmunoResearch, 711-645-152 and 711-605-152), Goat anti-Guinea-Pig Alexa 555 (Life technology, A21435), Donkey anti-Guinea-Pig Alexa 405 or 594 (Jackson ImmunoResearch, 706-475-148 and 706-585-148), Donkey anti-Mouse Alexa 488 or 594 or 647 (Jackson ImmunoResearch, 715-545-151, 711585-151 and 715-605-151).

HCS imaging and image analyses

384-well plates were imaged using IN Cell Analyzer 6000 Cell Imaging System (GE Healthcare) equipped with a Nikon 60 \times 0.95 NA objective and a CMOS camera. 16 images (2048 \times 2048 pixels) per well were acquired in 3 stacks (z-stack interval: 0.5 μ m) from 3 channels (dsRed, FITC, and Cy5). Customized image analysis software (PerkinElmer) was used for the image analysis. MAP2 staining was used to defined network area and Synaptophysin and Homer1 spots were detected within this area. A custom MATLAB (MathWorks, Natick, MA) process is the used to exclude outlier fields in terms of network area or staining intensity, and to assigned each Homer1 spots to the nearest Synaptophysin spot with a 1 μ m cut-off distance. The density of Synaptophysin spots assigned by at least one Homer1 spots is used to calculate the synaptic density. or each well, data was normalized by the mean of non-transduced wells from the same plate. Wells with shRNA-induced toxicity, as defined by normalized

network area < 0.4 were excluded from the analysis. Assay quality was assessed using β -score calculating as $\beta = \frac{\mu_{shNT} - \mu_{shSyp}}{\sigma_{shNT}^2 + \sigma_{shSyp}^2}$, where μ and σ are the mean and standard deviation of Synaptophysin density for control wells treated with shNT and shSyp, and only plates with a β -score > 1 were analyzed. After all screenings were performed, mean and standard error of measurement (SEM) of normalized synaptic density were calculated for each shRNA that did not affect network quality in at least 2 screenings. shRNAs that potentially affect synaptic density were determined as those belonging to the top or bottom 5% tiers.

Microfluidics chip fabrication

Masters of microfluidic devices were fabricated through photolithography as previously described⁴². Devices were cast from polydimethylsiloxane (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI) and irreversibly bonded to glass coverslips using an O₂ plasma generator (Diener, Ebhausen, Germany). Prior to cell culture, devices were sterilized under UV (Light Progress, Anghiari, Italy) for 30 min, and coated with 0.1 mg/ml poly-L-lysine (PLL, Sigma) diluted in borate buffer (0.31% boric acid, 0.475% sodium tetraborate, pH = 8.5) and 20 μ g/mL laminin (CC095, Sigma-Aldrich) diluted in 0.01M PBS with Ca²⁺ and Mg²⁺ (Gibco, ThermoFisher Scientific). For MEA recordings, a new microfluidic device was developed that places two identical yet distinct bicompartments on the same MEA, such that two experimental conditions could be included in the same experiment/recording (figure 4c). For quantification of synapses, tricompartments microfluidic devices that isolate the neuronal network from cell bodies were used (figure 4e)²¹. Three devices were employed for each experimental condition and three independent cultures were performed.

Synapse imaging and analysis

Synaptic compartments of microfluidic chips were imaged via Spinning Disk XLight V3 microscope (Nikon), using a 60 \times objective and a z-stack interval of 0.5 μ m. Images were deconvoluted using Huygens Professional (Scientific Volume Imaging) and analyzed using Imaris (Bitplane, Zürich, Switzerland) by reconstructing Synaptophysin and Homer1 puncta in 3D. The relative positions of all puncta were analyzed using the custom MATLAB process described before to evaluate the synaptic density. Statistically significant outliers were calculated and excluded, using the mean absolute deviation method (± 3 MAD).

Synapse fractionation

7 $\times 10^7$ cortical neurons were resuspended in a cold buffer containing 0.32 M sucrose and 10 mM HEPES, pH = 7.4, and were centrifuged at 1000 $\times g$ for 10 min. The resulting supernatant was concentrated at 12,000 $\times g$ for 20 min to remove the cytosolic fraction. Then, the resulting pellet was resuspended in a second solution (4 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH = 7.4) and centrifuged twice at 12,000 $\times g$ for 20 min. The new pellet was incubated in a third solution (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, pH = 7.2) for 1 h at 4 $^{\circ}$ C with mild agitation and then centrifuged at 12,000 $\times g$ for 20 min. The supernatant collected corresponds to the triton-soluble non-PSD fraction. The remaining pellet was resuspended and incubated in a buffer containing 20 mM HEPES, 0.15 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholic acid, 1% SDS, pH = 7.5 for 1 h at 4 $^{\circ}$ C, and then centrifuged at 10,000 $\times g$ for 15 min to obtain a supernatant containing the triton-insoluble PSD fraction. The cytosolic, non-PSD, and PSD fractions were then analyzed by immunoblotting.

Immunoblotting

Protein quantification was performed using the BCA protein assay (ThermoFisher Scientific). Equal amounts (5–20 µg) of cell lysate were collected in RIPA buffer (1 M Tris, 1.5 M NaCl, 0.1% NP-40, 10% SDS, 100 mM sodium orthovanadate, and 0.5% sodium deoxycholate, pH = 7.4) containing protease inhibitors (Complete mini, Roche Applied Science, Penzberg, Germany), lithium dodecyl sulfate (ThermoFisher Scientific), and reducing agent (Invitrogen). Samples were sonicated at 60% and denatured at 95°C for 5 min. Protein extracts were separated in 4-12% Bis-Tris, or 3-8 % Tris-Acetate SDS–polyacrylamide gels (NuPAGE, Thermo Scientific) and transferred on to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked in SuperBlock (ThermoFisher Scientific) for 1 h at RT, and incubated with primary antibodies at 4°C overnight. The following day, membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies 2h at RT, and revealed using Immobilon Crescendo Western HRP Substrat (Millipore) and the Amersham Imager 600 (GE Life Sciences). Optical densities of bands were quantified using ImageJ. The following primary antibodies was used: Chicken anti-Synaptophysin (Synaptic System, 101006), Guinea-Pig anti-PSD95 (Synaptic System 124014), Chicken anti-GAPDH (Millipore, AB2302), Rabbit anti-USP6NL (ThermoFisher Scientific, PA575944), Mouse anti-PSMC3 (ThermoFisher Scientific, MA538612), Rabbit anti-CSNK1G1 (ThermoFisher Scientific, PA5-205268), Rabbit anti-CYB561 (Merck, SAB2100516), Rabbit anti-SNX1 (Abcam, ab134216), Rabbit anti-ICA1L (ThermoFisher Scientific, 16828054), Mouse anti-OPLAH (Santa-Cruz, sc-398205), Mouse anti-NCK2 (Santa-Cruz, sc-20020), Mouse anti-PLCG2 (Santa-Cruz, sc-5283), Rabbit anti-PLCG1 (Abcam, ab76155), Rabbit anti-APP (Sigma, A8717), Rabbit anti-hTau (Dako, A0024), Mouse anti-pTauS396/404 (P. Davies, PHF1), Mouse anti-pTauT231 (P. Davies, RZ3), Mouse anti-pTauS202/T205 (ThermoFisher Scientific, MN1020), Rabbit anti-pTauT217 (ThermoFisher Scientific, 10536653), Mouse anti-pTauT181 (ThermoFisher Scientific, MN1050), Mouse anti-GSK-3βpY216 (BD Bioscience, 612313), Rabbit anti-GSK-3β (Cell Signaling, 9315), Mouse anti-ERK1/2 (Cell Signaling, 4696), Rabbit anti-phospho- ERK1/2 MAPK (Cell Signaling, 9101), Rabbit anti-Akt (Ozyme, C67E7), Rabbit anti-phospho-Akt(Ser473) (Ozyme, CST4060), Rabbit anti-PYK2 (Merck, P3902), Rabbit anti-phospho-PTK2B(Y402) (Cell Signaling, 3291), Rabbit anti-38MAPK (Cell Signaling, 9212), Rabbit anti-phospho-p38MAPK(Thr180/Tyr182) (Cell Signaling, 4511) and Mouse anti-actin (Sigma, A1979). Secondary antibodies used for the immunoblots were: Goat anti-Chicken HRP (ThermoFisher Scientific, A16054), Goat anti-Guinea-Pig HRP (Jackson Immunoresearch, 106-035-003), Goat anti-Rabbit HRP (Jackson Immunoresearch, 111-035-003), Goat anti-Mouse HRP (Jackson Immunoresearch, 115-035-003).

Alpha-LISA measurements

Cell culture media were collected at 4 weeks of differentiation in order to dose secreted Aβ using Alpha-LISA assays (Alpha-LISA Amyloid β1–X Kit, AL288C, PerkinElmer) according to the manufacturer's instructions. 5 µL of cell medium or standard solution diluted in BrainPhys medium was added to an Optiplate-96 microplate (PerkinElmer), incubated with 5 µL of 10X mixture of acceptor beads and biotinylated antibody for 1h at RT, and then by 40 µL of 1.25X donor beads for 30 min at RT. Luminescence was measured using an EnVision-Alpha Reader (PerkinElmer) at 680-nm excitation and 615-nm emission wavelengths.

Microelectrode array recordings and analyses

PNC were cultured on PDL/Laminin pre-coated MEA 96-well plates (CytoView MEA 96, Axion Biosystems, USA) and extracellular action potentials were recorded at DIV21 in three independent

cultures using the MaestroPro (Axion Biosystems, Inc, USA). Signals were recorded for 5 min and transient potentials were detected using 6 standard deviations adaptive threshold crossing method. Channels containing detected waveforms were processed for spike waveform classification using Valley Seeking algorithm in Offline Sorter v3 (Plexon, USA). Bursts were defined as a minimum of 3 spikes in 100 ms. Channels < 0.1 Hz were excluded from the analysis. In separate experiments, hiNs were cultured in microfluidic devices bound to multi-electrode arrays (256MEA100/30iR-ITO, Multi-Channel Systems, Germany) and were recorded at 4 weeks of differentiation using the MEA2100-256-System (Multi-Channel Systems). Signals were recorded for 5 min, at 20 kHz sampling rate, and transient potentials were detected and extracted using 5.5 standard deviations upward or downward of the raw signal and a dead zone of 3 ms. Spike bursts were defined as at least 5 spikes within 50 ms.

Morphometric analysis of mouse DG granule cells

4 male control mice (littermates of APP/PS1 mice) aged between 3-4 months old with a body weight of 36.0 ± 1.4 g, were used in this study. In order to silence the *plcg2* gene in mice we have injected lentiviral constructs expressing either a shRNA against PLCG2 or a non-targeting shRNA, combined with GFP expressed under the control of the PGK promoter, in the dorsal dentate gyrus through stereotaxic manipulation. To compare the efficacy of transduction of both LV constructs, we injected in a same mouse LV-*plcg2*shRNA and LV- scramble in the ipsi- and contra-lateral sides, respectively. After 27 days, mice were transcardially perfused and the brain was isolated and post-fixed in paraformaldehyde (PFA, 4%). Next, 40 μ m thick sections were prepared with vibratome, immuno-stained and imaged for expression of NeuN and GFP. To analyze the morphology of GFP expressing DG granule cells, we used a confocal microscope (SP1, Leica Microsystems) to acquire Z-stacks at randomly chosen positions in the supra or infrapyramidal blade of DG. Images were obtained with a 63X objective (numerical aperture, NA 1.4) and regular photomultipliers. Spine density was measured in four animals with 13 fields at high magnification with >2X zoom in SP1 confocal, at least 2-3 neurites per field. In order to analyze the dendritic and spine morphometry we have used neuronstudio (ver. 0.9.92 64 bit)⁴³ and ImageJ⁴⁴ for reconstruction as well as analysis.

Statistical analyses:

All the results are presented as mean \pm SD or mean \pm SEM. Data were analyzed either using Mann–Whitney nonparametric or a Kruskal–Wallis test when appropriate. A p-value <0.05 was interpreted as significant.

REFERENCES

1. CH, van D. et al. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. N. Engl. J. Med. 388, 142–143 (2023).
2. Herrup, K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. Nat. Neurosci. 18, 794–799 (2015).
3. Selkoe, D. J. & Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. EMBO Mol. Med. 8, 595–608 (2016).
4. Frisoni, G. B. et al. The probabilistic model of Alzheimer disease: the amyloid hypothesis revised. Nat. Rev. Neurosci. 23, 53–66 (2022).
5. Gatz, M. et al. Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease. Arch. Gen. Psychiatry 63, 168 (2006).

6. Bellenguez, C. et al. New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nat. Genet.* 54, 412–436 (2022).
7. Holstege, H. et al. Exome sequencing identifies rare damaging variants in ATP8B4 and ABCA1 as risk factors for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 54, 1786–1794 (2022).
8. Lambert, J. C., Ramirez, A., Grenier-Boley, B. & Bellenguez, C. Step by step: towards a better understanding of the genetic architecture of Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* (2023) doi:10.1038/S41380-023-02076-1.
9. Lambert, J. C. et al. Implication of the immune system in Alzheimer's disease: evidence from genome-wide pathway analysis. *J. Alzheimers. Dis.* 20, 1107–1118 (2010).
10. Kunkle, B. W. et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nat. Genet.* 51, 414–430 (2019).
11. Dourlen, P., Kilinc, D., Malmanche, N., Chapuis, J. & Lambert, J.-C. The new genetic landscape of Alzheimer's disease: from amyloid cascade to genetically driven synaptic failure hypothesis? *Acta Neuropathol.* 138, 221–236 (2019).
12. Jorfi, M., Maaser-Hecker, A. & Tanzi, R. E. The neuroimmune axis of Alzheimer's disease. *Genome Med.* 15, (2023).
13. De Strooper, B. & Karran, E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* 164, 603–615 (2016).
14. Eysert, F. et al. Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 (Kindlin-2) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner. *Mol. Psychiatry* 26, 5592–5607 (2021).
15. Giralt, A. et al. Pyk2 modulates hippocampal excitatory synapses and contributes to cognitive deficits in a Huntington's disease model. *Nat. Commun.* 2017 8, 1–16 (2017).
16. Ojelade, S. A. et al. cindr, the Drosophila Homolog of the CD2AP Alzheimer's Disease Risk Gene, Is Required for Synaptic Transmission and Proteostasis. *Cell Rep.* 28, 1799–1813.e5 (2019).
17. Schürmann, B. et al. A novel role for the late-onset Alzheimer's disease (LOAD)-associated protein Bin1 in regulating postsynaptic trafficking and glutamatergic signaling. *Mol. Psychiatry* 25, 2000–2016 (2020).
18. Masliah, E. Mechanisms of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Histology and Histopathology* vol. 10 509–519 (1995).
19. Barthet, G. & Mulle, C. Presynaptic failure in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 194, (2020).
20. Ribarič, S. Detecting Early Cognitive Decline in Alzheimer's Disease with Brain Synaptic Structural and Functional Evaluation. *Biomedicines* 11, (2023).
21. Kilinc, D. et al. Pyk2 overexpression in postsynaptic neurons blocks amyloid β 1-42-induced synaptotoxicity in microfluidic co-cultures. *Brain Commun.* 2, (2020).
22. Takalo, M. et al. The Alzheimer's disease-associated protective Plc γ 2-P522R variant promotes immune functions. *Mol. Neurodegener.* 15, 1–14 (2020).
23. Claes, C. et al. The P522R protective variant of PLCG2 promotes the expression of antigen presentation genes by human microglia in an Alzheimer's disease mouse model. *Alzheimers. Dement.* 18, (2022).
24. Tsai, A. P. et al. PLCG2 is associated with the inflammatory response and is induced by amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Genome Med.* 14, (2022).
25. Tsai, A. P. et al. Genetic variants of phospholipase C- γ 2 alter the phenotype and function of microglia and confer differential risk for Alzheimer's disease. *Immunity* 56, 2121–2136.e6 (2023).
26. Magno, L. et al. Alzheimer's disease phospholipase C-gamma-2 (PLCG2) protective variant is a functional hypermorph. *Alzheimers. Res. Ther.* 11, (2019).
27. Rebola, N., Carta, M. & Mulle, C. Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: implications for memory encoding. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 209–221 (2017).
28. Jiang, N. et al. Impaired plasticity of intrinsic excitability in the dentate gyrus alters spike transfer in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 154, (2021).
29. Viana Da Silva, S. et al. Hippocampal Mossy Fibers Synapses in CA3 Pyramidal Cells Are Altered at an Early Stage in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 39, 4193–4205 (2019).

30. Sun, M. K. & Alkon, D. L. Pharmacology of protein kinase C activators: cognition-enhancing and antidementic therapeutics. *Pharmacol. Ther.* 127, 66–77 (2010).
31. Leng, K. et al. Molecular characterization of selectively vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 24, 276–287 (2021).
32. de Pins, B., Mendes, T., Giralt, A. & Girault, J.-A. The Non-receptor Tyrosine Kinase Pyk2 in Brain Function and Neurological and Psychiatric Diseases. *Front. Synaptic Neurosci.* 13, (2021).
33. Tian, D., Litvak, V. & Lev, S. Cerebral ischemia and seizures induce tyrosine phosphorylation of PYK2 in neurons and microglial cells. *J. Neurosci.* 20, 6478–6487 (2000).
34. Bhat, R. V. et al. Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 11074–11079 (2000).
35. Hartigan, J. A., Xiong, W. C. & Johnson, G. V. Glycogen synthase kinase 3beta is tyrosine phosphorylated by PYK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 485–9 (2001).
36. Lauretti, E., Dincer, O. & Praticò, D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* vol. 1867 (2020).
37. Avila, J. et al. Tau in neurodegenerative diseases: Tau phosphorylation and assembly. *Neurotox. Res.* 6, 477–482 (2004).
38. Nicholson-Fish, J. C., Cousin, M. A. & Smillie, K. J. Phosphatidylinositol 3-Kinase Couples Localised Calcium Influx to Activation of Akt in Central Nerve Terminals. *Neurochem. Res.* 41, 534–43 (2016).
39. Marambaud, P., Dreses-Werringloer, U. & Vingtdeux, V. Calcium signaling in neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.* 4, (2009).
40. Berridge, M. J. Calcium regulation of neural rhythms, memory and Alzheimer's disease. *J. Physiol.* 592, 281–293 (2014).
41. Kaech, S. & Banker, G. Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* 1, 2406–2415 (2006).
42. Blasiak, A., Lee, G. U. & Kilinc, D. Neuron Subpopulations with Different Elongation Rates and DCC Dynamics Exhibit Distinct Responses to Isolated Netrin-1 Treatment. *ACS Chem. Neurosci.* 6, 1578–1590 (2015).
43. Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Hof, P. R. & Wearne, S. L. Rayburst sampling, an algorithm for automated three-dimensional shape analysis from laser scanning microscopy images. *Nat. Protoc.* 1, 2152–61 (2006).
44. Schindelin, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* 9, 676–82 (2012).

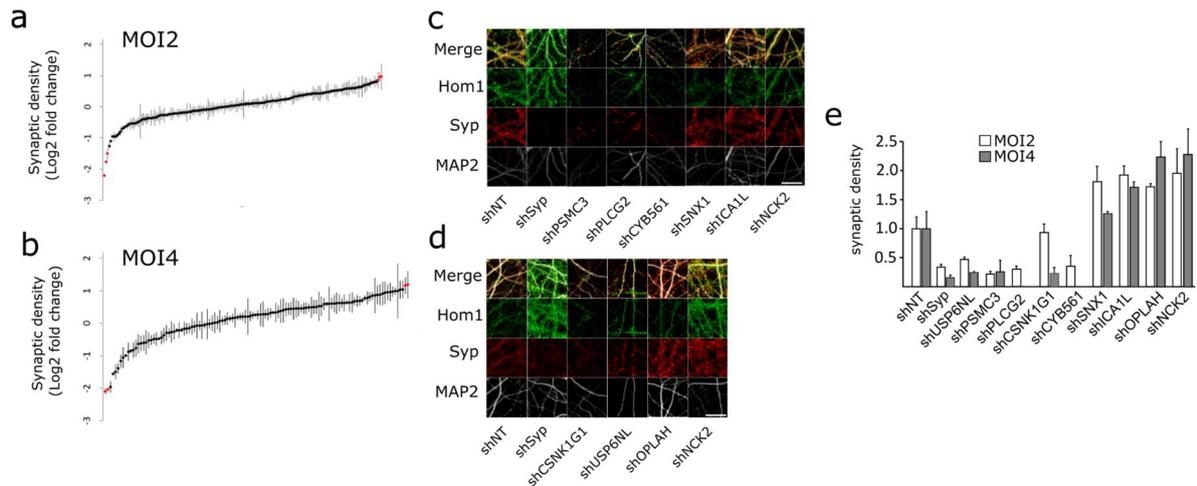


Figure 1. High-content screening identified nine AD-associated genes that significantly impact synaptic density in rat primary neurons

(a-b) Impact of shRNAs against 198 AD-associated genes on synaptic density in rat hippocampal primary neurons, virally transduced at MOI 2 **(a)** and MOI 4 **(b)**. Top and bottom 2.5% are shown in red. **(c-d)** Representative images of MAP2, SYP and HOMER1 immunostainings following shRNA-mediated silencing of *SYP*, *PSMC3*, *PLCG2*, *CYB561*, *SNX1*, *ICA1L* and *NCK2* at MOI 2 **(c)** and of *SYP*, *CSNK1G1*, *USP6NL*, *OPLAH*, and *NCK2* at MOI 4 **(d)**; Scale bar= 20 μ m. **(e)** Quantification of synapse density by the assignment of SYP to HOMER1 spots on MAP2 surfaces. Data are means \pm SEM, n=3.

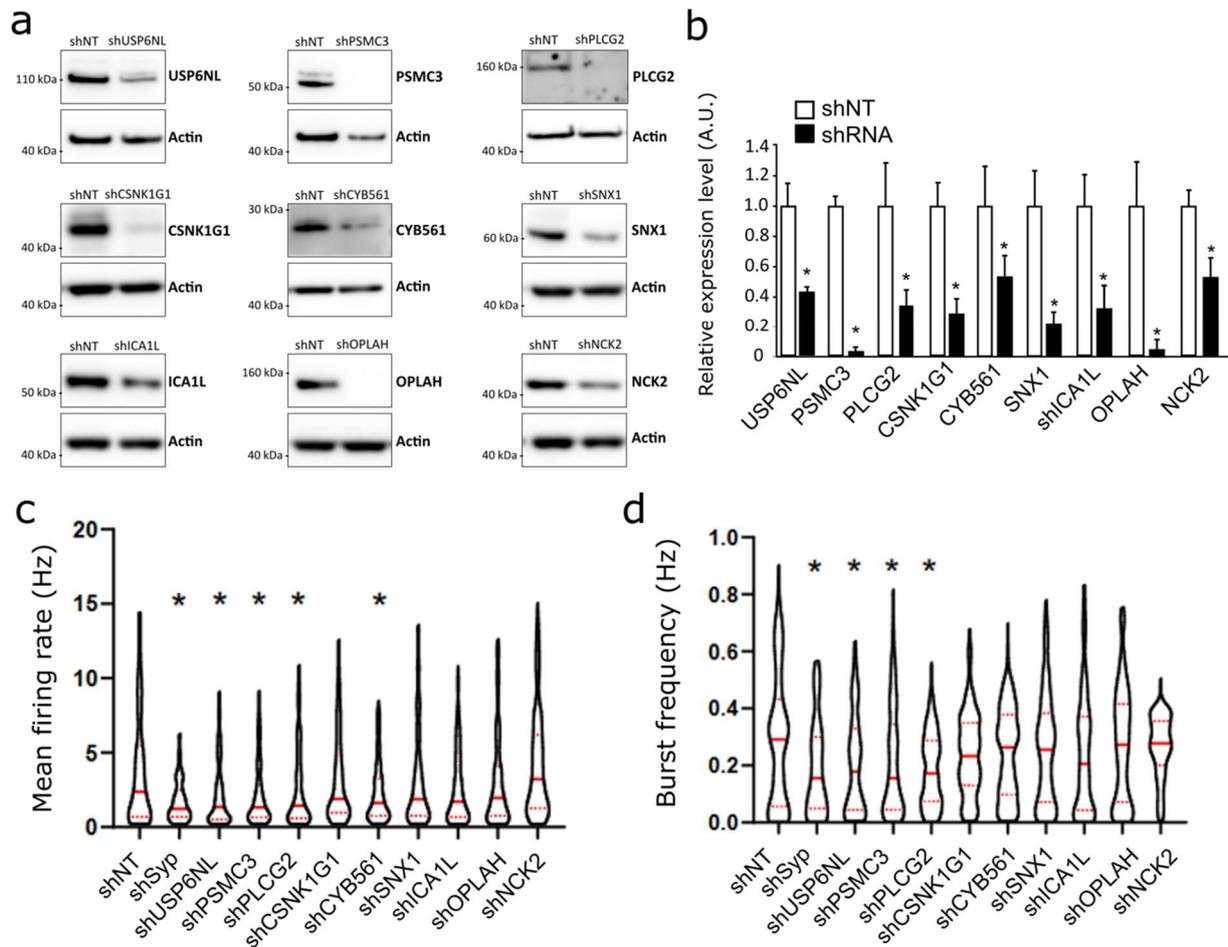


Figure 2. Potential synaptic function of nine AD-associated genes in neurons

(a) Validation of the 9 shRNAs against *USP6NL*, *PSMC3*, *PLCG2*, *CSNK1G1*, *CYB561*, *SNX1*, *ICA1L*, *OPLAH* and *NCK2* transduced at MOI 2 in rat hippocampal primary neuron cultures *via* immunoblotting. **(b)** Comparison of protein levels in the 9 shRNAs vs non-targeting control (shNT) transduced neuron/astrocyte mixed cultures. Data are means \pm SD, $n=3$; * $p<0.05$. **(c-d)** Impact of the 9 shRNAs on mean firing rates **(c)** and burst frequencies **(d)** in rat hippocampal neurons at DIV21, as measured with a MEA. Data are median \pm interquartile, $n=3$; * $p<0.05$.

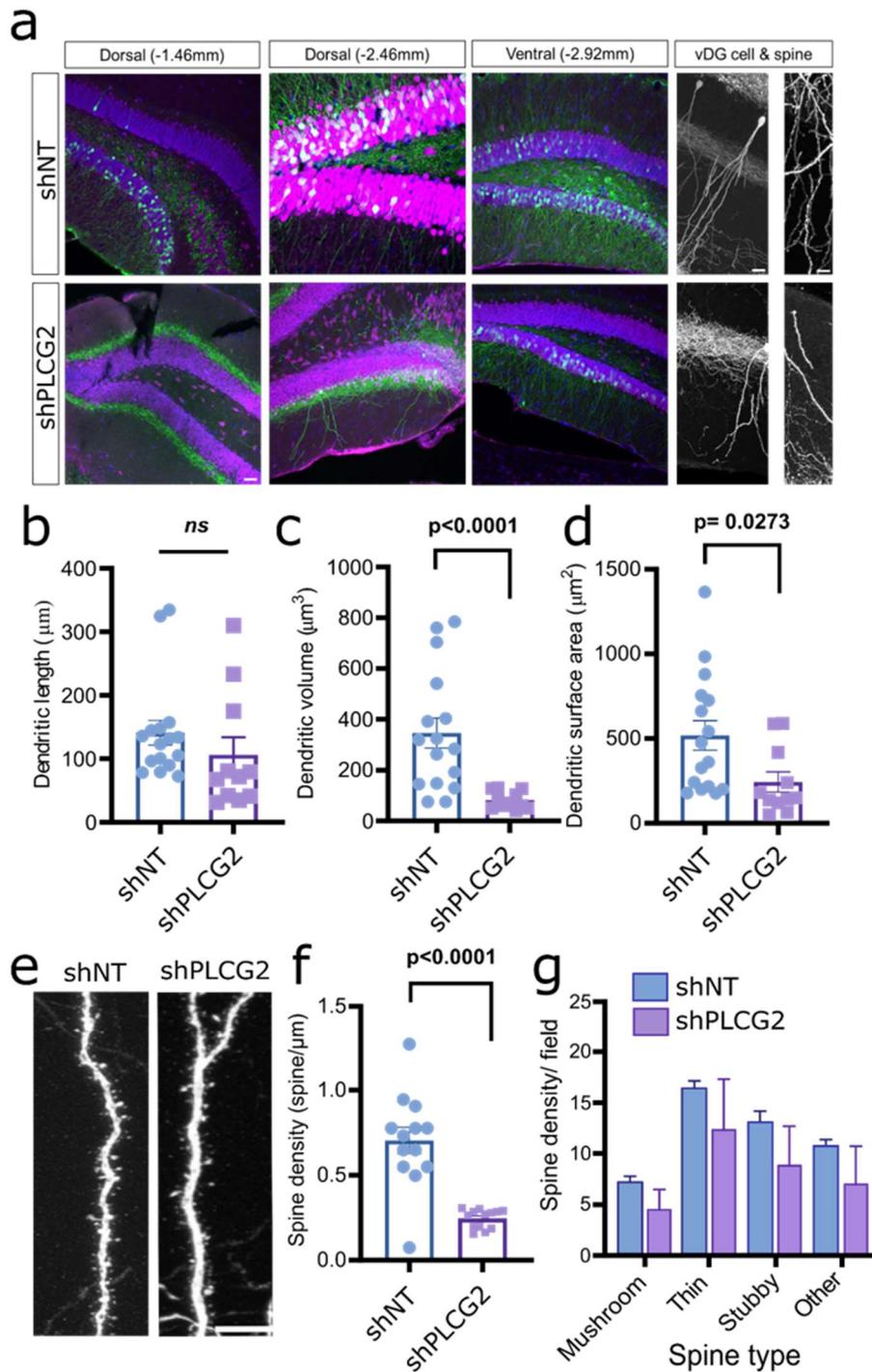


Figure 3. *Plcg2* silencing in the mouse DG reduces dendritic volume and spine density of granule cells
(a) Immunofluorescence images of coronal slices of hippocampus from anterior (-1.46 mm) to posterior (-2.92 mm) with high magnification images of DG cells as well as their dendritic spines in shNT and shPLCG2 injected neurites (mean \pm SEM; $n = 13$); scale bar = 20 μm . **(b-d)** Change in total dendritic length **(b)**, total dendritic volume **(c)**, and total surface area of dendrites **(d)** in the two experimental groups. **(e-g)** Dendritic spine morphology **(e)** and density **(f)** according to the spine type **(g)** in shNT and shPLCG2 expressing neurites. Data are means \pm SEM, $n = 13$.

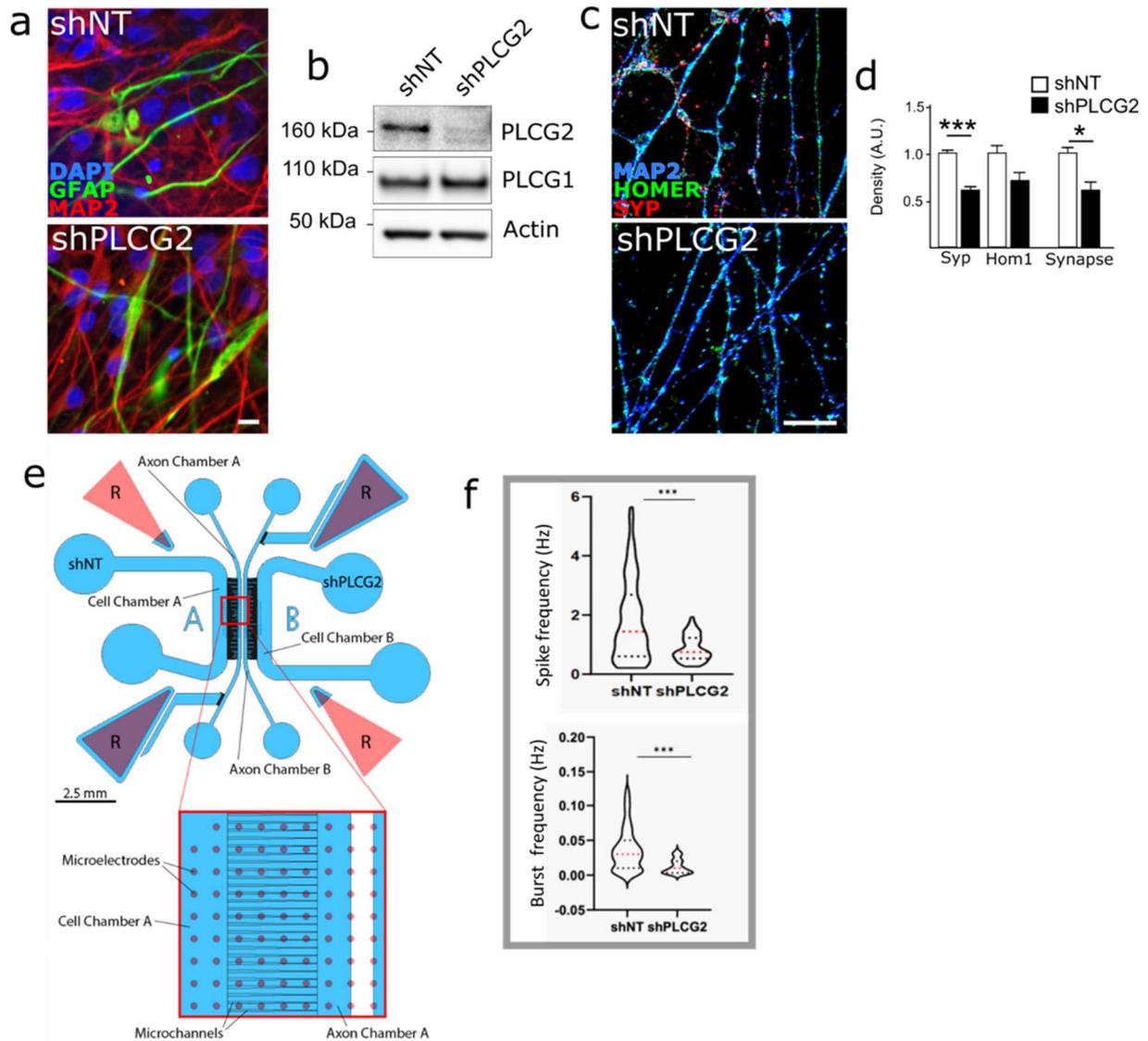


Figure 4. *PLCG2* silencing in human iPSCs-derived neurons/astrocytes impacts synaptic density and function

(a) Representative images of hiN/hiA mixed cultures after 4 weeks of spontaneous differentiation from progenitors stably expressing shNT (control) or a shRNA targeting *PLCG2*; scale bar= 20 μ m. **(b)** Western blot showing specific *PLCG2* silencing via shPLCG2 in hiNs/hiAs. **(c)** Immunofluorescence images of MAP2, SYP and HOMER1 synaptic markers in shNT and shPLCG2 transduced hiNs/hiAs at 4 weeks. **(d)** Changes in synaptic marker density between the two conditions. Data are mean \pm SEM, $n=3$, *** $p<0.01$, * $p<0.05$. **(e)** Schematics of the MEA-integrated microfluidic device used to measure neuronal activity. Overlay shows the microfluidic device (blue) and the MEA (red) underneath. R indicates reference electrodes. Boxed area is 8.4 \times magnified. **(f)** Impact of shPLCG2 on spike and burst frequencies in hiNs, measured via MEA coupled to microfluidics. *n=1 here; n=2 and 3 under analysis.*

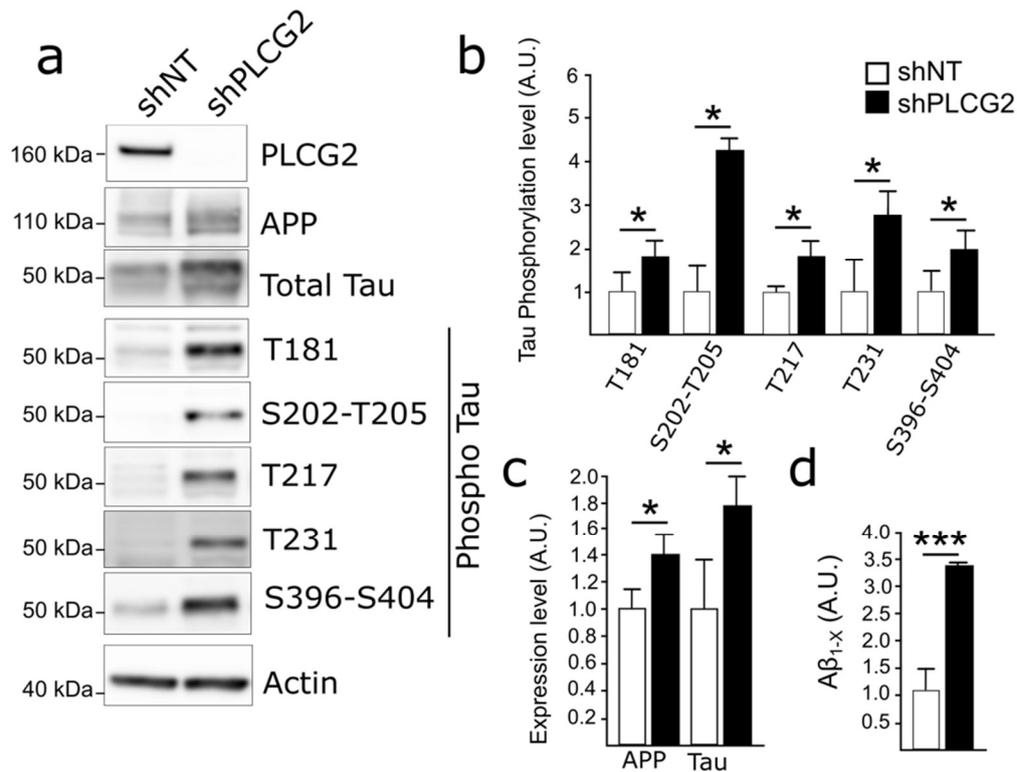


Figure 5. *PLCG2* silencing negatively affects AD-related Amyloid and Tau pathologies in human induced neurons/astrocytes

(a) Representative western-blot images of APP, total Tau and of Tau phosphorylation at T181, S202-T205, T217, T231 and S396-S404 in shNT and shPLCG2 transduced hiNs/hiAs. **(b-c)** Changes in Tau phosphorylation levels **(b)**, and in APP and Tau expression **(c)** in hiNs silenced for *PLCG2*. Data are means \pm SD, n=3, *p<0.05. **(d)** A β peptide production by shPLCG2 vs shNT-expressing hiNs/hiAs as measured by Alpha-LISA. Data are means \pm SEM, n=3, *p<0.05.

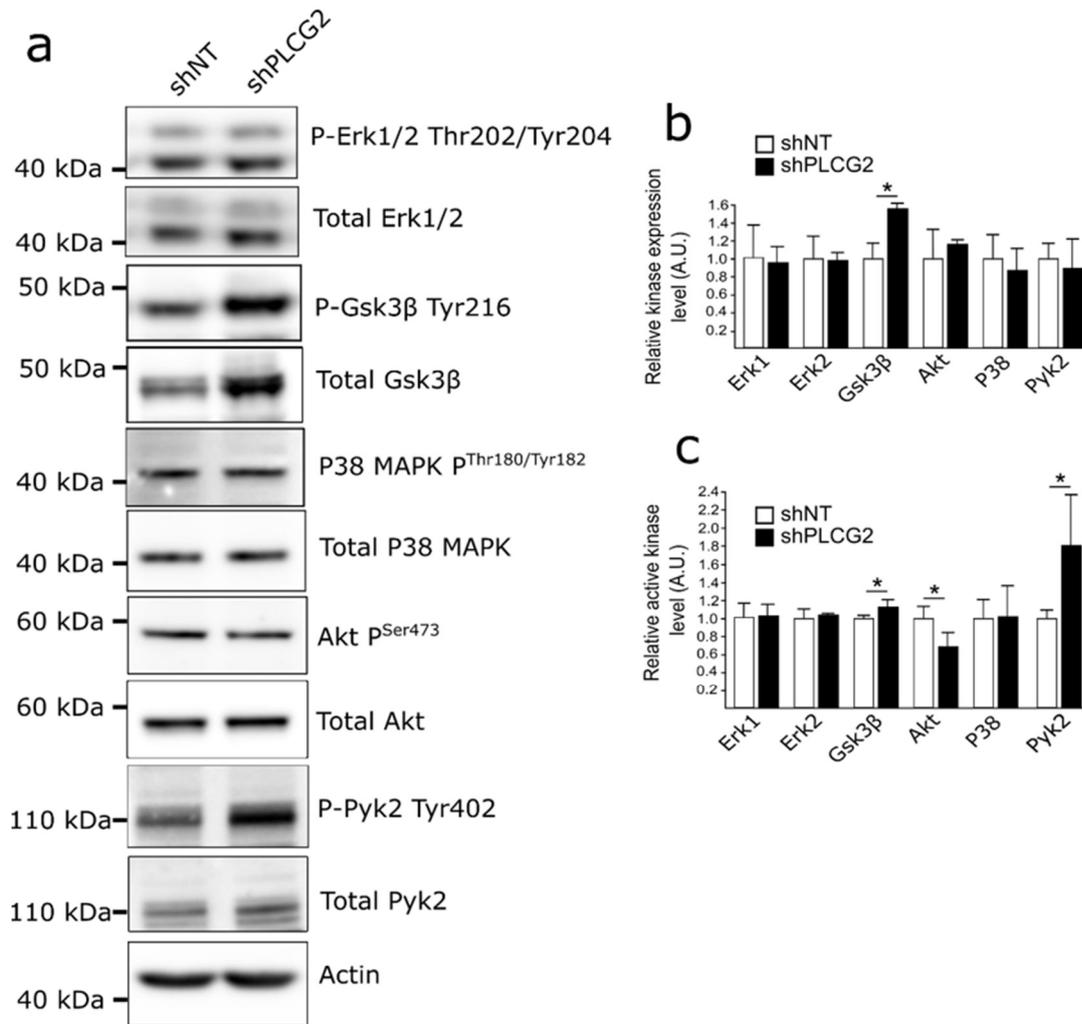
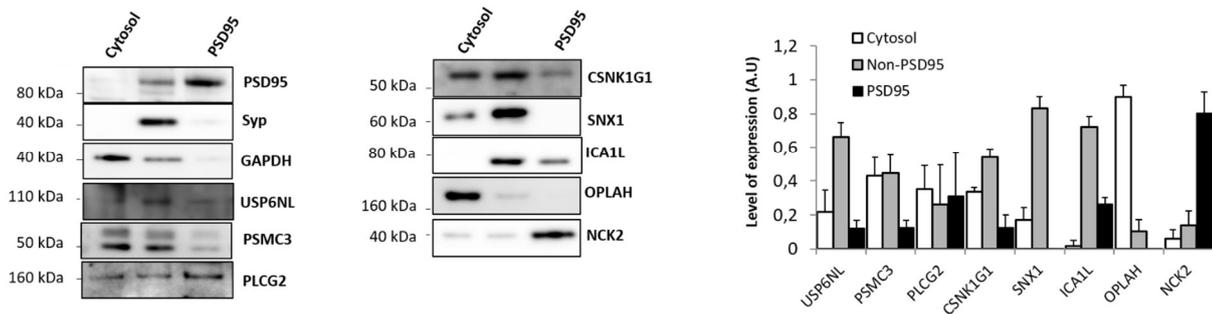


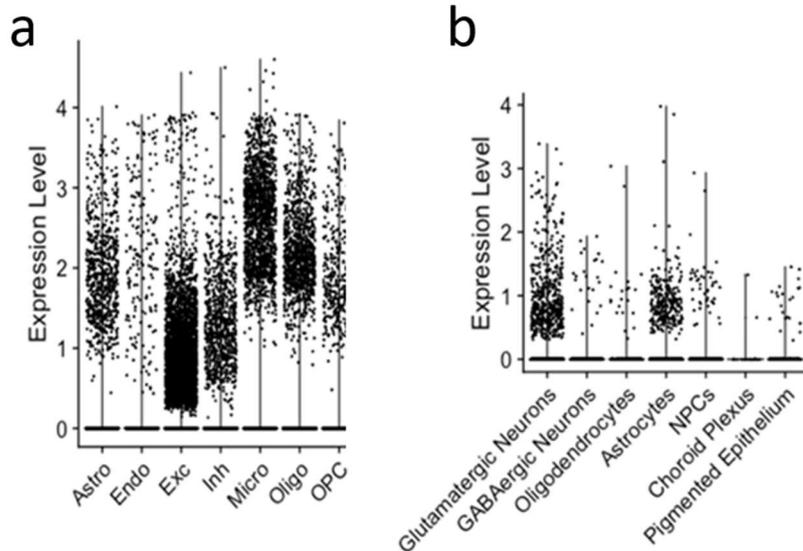
Figure 6. *PLCG2* silencing in iPSCs-derived neurons/astrocytes increases GSK3β expression and phosphorylation, potentially through the phosphorylation of AKT and PYK2

(a) Representative western-blot of ERK1/2, GSK3β, AKT, p38-MAPK and PYK2 and their respective phosphorylated active forms in shNT and shPLCG2 transduced hiNs/hiAs. **(b-c)** Changes in total protein **(b)** and phospho-protein **(c)** expression levels in hiNs/hiAs silenced for PLCG2 normalized by shNT-transduced control levels. Data are means ± SD n=3, *p<0.05.



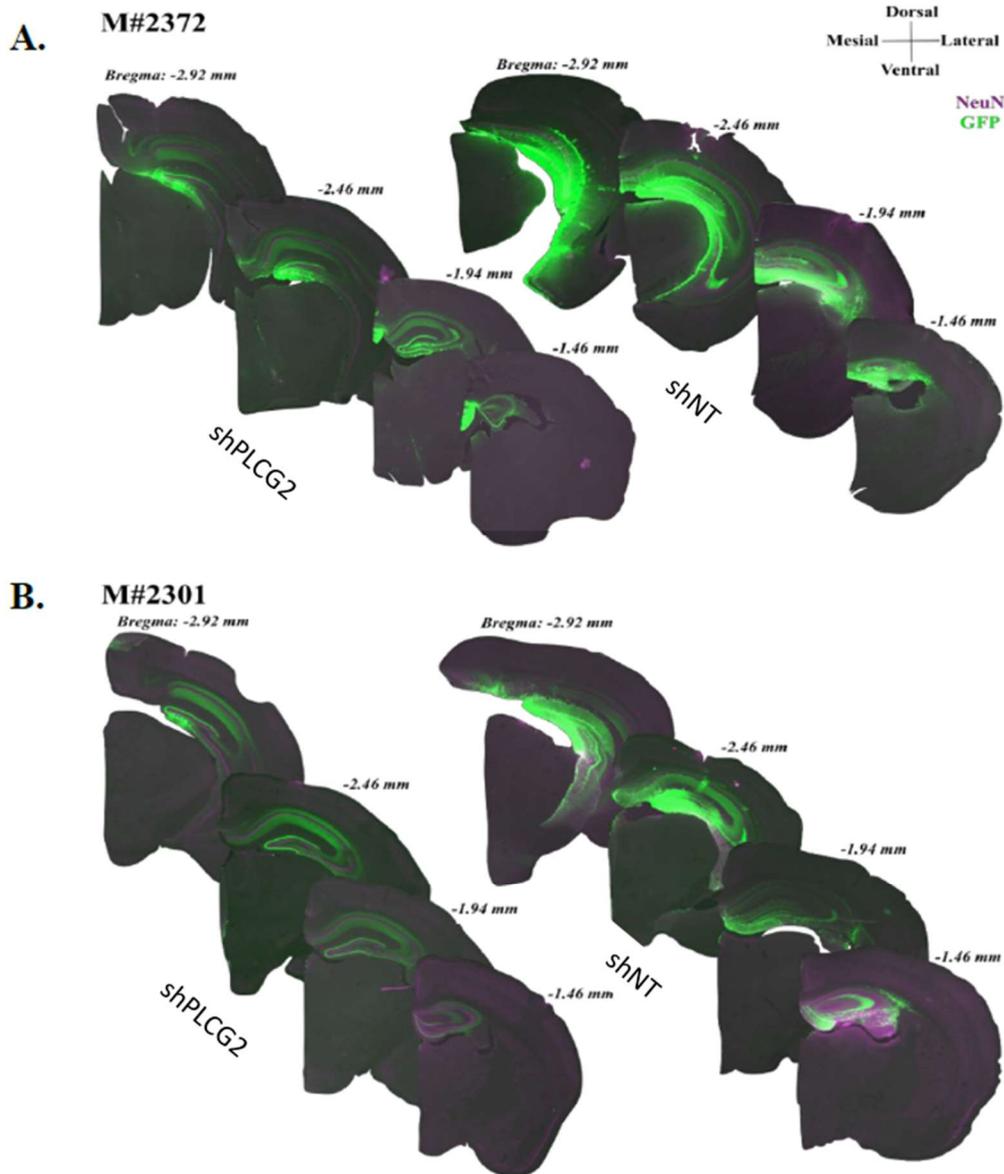
Supplementary figure 1. PSMC3, PLCG2, SNX1, ICA1L, CSNK1G1, USP6NL, and NCK2 proteins are expressed in the pre- and/or post-synaptic compartments.

Immunoblotting of PSD95 and non-PSD95 fractions in primary rat hippocampal neurons (at DIV21) synaptosomes.



Supplementary figure 2. *PLCG2* transcripts are expressed in human neurons

Levels of expression of *PLCG2* transcripts in the human brain (a) and iPSC-derived brain organoids (b), respectively, based on public (<https://portal.brain-map.org/atlas-and-data/rnaseq>) and in-house snRNASeq databases.



Supplementary figure 3. shRNAs against *Plgc2* are expressed in mouse DG granule cells

Expression of GFP in the animals injected with 2.9 μ l volume of either shNT- (control) or shPLCG2- lentivirus. Mature neuronal nucleus (NeuN) and GFP are shown in purple and green, respectively. Plates of the coronal sections from animal no.2372 (a) and 2301 (b) were arranged in anterior to posterior fashion with the corresponding coordinated as per atlas.

Article 3 : ALZHEIMER'S GENETIC RISK FACTOR *FERMT2* (KINDLIN-2) CONTROLS AXONAL GROWTH AND SYNAPTIC PLASTICITY IN AN APP-DEPENDENT MANNER

Fanny Eysert,¹ **Audrey Coulon**,¹ Emmanuelle Boscher,^{2,3} Anaïs-Camille Vreulx,¹ Amandine Flaig,¹ Tiago Mendes,¹ Sandrine Hughes,⁴ Benjamin Grenier-Boley,¹ Xavier Hanouille,⁵ Florie Demiautte,¹ Charlotte Bauer,⁶ Mikael Marttinen,⁷ Mari Takalo,⁷ Philippe Amouyel,¹ Shruti Desai,¹ Ian Pike,⁸ Mikko Hiltunen,⁷ Frédéric Chécler,⁶ Mélissa Farinelli,⁴ Charlotte Delay,¹ Nicolas Malmanche,¹ Sébastien S. Hébert,^{2,3} Julie Dumont,¹ Devrim Kilinc,¹ Jean-Charles Lambert,^{#1} and Julien Chapuis^{#1}

¹Université de Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167—RID-AGE—Facteurs de Risque et Déterminants Moléculaires des Maladies Liées au Vieillessement, Lille, 59019 France

²Centre de Recherche du CHU de Québec-Université Laval, CHUL, Axe Neurosciences, Québec City, QC Canada

³Faculté de Médecine, Département de Psychiatrie et de Neurosciences, Université Laval, Québec City, QC Canada

⁴E-Phy-Science, Bioparc de Sophia Antipolis, 2400 route des Colles, Biot, 06410 France

⁵Université de Lille, CNRS, UMR8576—Labex DISTALZ, Villeneuve d'Ascq, 59655 France

⁶Université Côte d'Azur, Inserm, CNRS, IPMC, DistAlz Laboratory of Excellence, Valbonne, France

⁷Institute of Biomedicine, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland

⁸Proteome Sciences plc, Hamilton House, London, WC1H 9BB UK

Corresponding author: Julien Chapuis

[#]Contributed equally.

I) Contexte bibliographique et objectifs

La réalisation d'un autre criblage HCS avant mon arrivée au laboratoire avait permis de mettre en évidence l'implication du gène *FERMT2* dans la modulation du métabolisme de l'APP. Comme pour le gène *PLCG2*, *FERMT2* avait été identifié par les études GWAS comme facteur de risque génétique de la MA, et les travaux de thèse de Fanny Eysert (première auteure de cet article) avaient montré que l'inhibition de ce gène entraînait une diminution de la densité synaptique et de l'activité électrique neuronale. Cependant, les mécanismes moléculaires expliquant le lien entre les variants génétiques de *FERMT2* et le risque de développer la MA restaient indéterminés.

Plusieurs études ont montré que les micro-ARNs exprimés dans le système nerveux central jouaient un rôle important dans la différenciation neuronale et la plasticité synaptique (395). De plus, on sait qu'il existe une importante dérégulation des micro-ARNs dans les cerveaux des patients atteints de MA (396). Dans ce contexte, une étude systématique de la régulation par les micro-ARNs des gènes identifiés par GWAS a été menée au laboratoire (399). Cette analyse a permis de suggérer l'impact potentiel du variant génétique rs7143400 situé dans la région 3'UTR du gène *FERMT2*, sur son niveau d'expression via la fixation différentielle d'un micro-ARN selon les allèles. Ce variant, qui consiste en la substitution d'une guanine (G) par une thymine (T), est associé à un risque augmenté de développer la MA, et crée un site de liaison parfait pour le micro-ARN 4504 (miR-4504). De plus, le variant

rs7143400 est retrouvé associé à un eQTL, c'est à dire que les individus porteurs de l'allèle à risque présentent une expression de *FERMT2* significativement diminuée par rapport aux individus non porteurs.

Dans ce contexte, j'ai tout d'abord évalué l'effet de ce variant sur l'expression d'un gène rapporteur luciférase. J'ai ensuite généré un modèle cellulaire porteur des différents allèles pour le variant rs7143400, afin d'évaluer son impact sur l'expression endogène de la protéine FERMT2, ainsi que sur la modulation du métabolisme de l'APP.

II) Résultats

En utilisant la technique d'édition du génome par CRISPR/Cas9, je suis parvenue à mettre en place un modèle de cellules HEK293 porteuses hétérozygotes de l'allèle à risque du variant rs7143400. Les résultats obtenus dans ce modèle m'ont permis de confirmer que l'allèle à risque du variant rs7143400 induisait une diminution significative de l'expression de *FERMT2* via la création d'un site de fixation pour le miR-4504, conduisant ainsi à la modulation du métabolisme de l'APP et de la production des peptides amyloïdes (**Figure 25**).

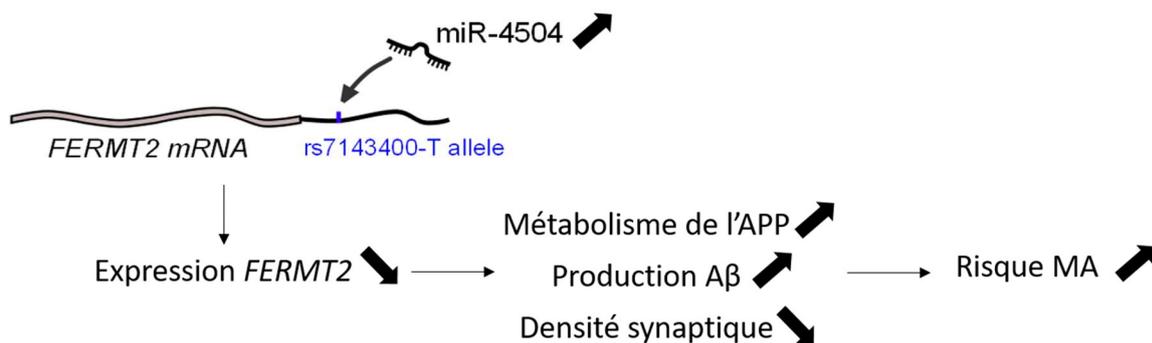


Figure 25 : Mécanismes moléculaires reliant le variant rs7143400 du gène *FERMT2* au risque de développer la maladie d'Alzheimer. La présence de l'allèle T du variant rs7143400 de *FERMT2* crée un site de fixation pour le miR-4504, et induit ainsi une diminution de l'expression de *FERMT2*. La sous-expression de *FERMT2* conduit à l'augmentation du métabolisme de l'APP et de la production de petite A β , ainsi qu'à une diminution de la densité synaptique, renforçant le risque de développer la MA.

III) Commentaires

L'intérêt de ce travail repose notamment sur :

- (i) La caractérisation *in vitro* d'un variant fonctionnel dans le gène *FERMT2* expliquant son association avec le métabolisme de l'APP et le risque de développer la MA.
- (ii) La mise en place de la technique d'édition du génome d'une lignée cellulaire par CRISPR/Cas9 au sein de l'équipe. Cela a entre autres permis de cerner les points critiques

dans son développement et sa transposition à d'autres modèles cellulaires plus pertinents dans le cadre de la MA, comme les neurones dérivant d'iPSCs. La possibilité d'accéder à des modèles de cellules ne différant que par le(s) variant(s) d'intérêt constitue une opportunité pour pouvoir caractériser le(s) variant(s) réellement fonctionnel(s) dans les gènes de susceptibilité à la MA et disséquer les mécanismes moléculaires les reliant aux phénotypes cellulaires caractéristiques de la pathologie.



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

Fanny Eysert¹ · Audrey Coulon¹ · Emmanuelle Boscher^{2,3} · Anaïs-Camille Vreulx¹ · Amandine Flaig¹ · Tiago Mendes¹ · Sandrine Hughes⁴ · Benjamin Grenier-Boley¹ · Xavier Hanoulle⁵ · Florie Demiautte¹ · Charlotte Bauer⁶ · Mikael Marttinen⁷ · Mari Takalo⁷ · Philippe Amouyel¹ · Shruti Desai¹ · Ian Pike⁸ · Mikko Hiltunen⁷ · Frédéric Chécler⁶ · Mélissa Farinelli⁴ · Charlotte Delay¹ · Nicolas Malmanche¹ · Sébastien S. Hébert^{2,3} · Julie Dumont¹ · Devrim Kilinc¹ · Jean-Charles Lambert¹ · Julien Chapuis¹

Received: 12 December 2019 / Revised: 2 October 2020 / Accepted: 19 October 2020 / Published online: 3 November 2020
© The Author(s) 2020. This article is published with open access, corrected publication 2020

Abstract

Although APP metabolism is being intensively investigated, a large fraction of its modulators is yet to be characterized. In this context, we combined two genome-wide high-content screenings to assess the functional impact of miRNAs and genes on APP metabolism and the signaling pathways involved. This approach highlighted the involvement of *FERMT2* (or Kindlin-2), a genetic risk factor of Alzheimer's disease (AD), as a potential key modulator of axon guidance, a neuronal process that depends on the regulation of APP metabolism. We found that *FERMT2* directly interacts with APP to modulate its metabolism, and that *FERMT2* underexpression impacts axonal growth, synaptic connectivity, and long-term potentiation in an APP-dependent manner. Last, the rs7143400-T allele, which is associated with an increased AD risk and localized within the 3'UTR of *FERMT2*, induced a downregulation of *FERMT2* expression through binding of miR-4504 among others. This miRNA is mainly expressed in neurons and significantly overexpressed in AD brains compared to controls. Altogether, our data provide strong evidence for a detrimental effect of *FERMT2* underexpression in neurons and insight into how this may influence AD pathogenesis.

These authors contributed equally: Jean-Charles Lambert, Julien Chapuis

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41380-020-00926-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

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

¹ Université de Lille, Insem, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167—RID-AGE—Facteurs de Risque et Déterminants Moléculaires des Maladies Liées au Vieillessement, Lille 59019, France

² Centre de Recherche du CHU de Québec-Université Laval, CHUL, Axe Neurosciences, Québec City, QC, Canada

³ Faculté de Médecine, Département de Psychiatrie et de Neurosciences, Université Laval, Québec City, QC, Canada

Introduction

AD is a neurodegenerative disease characterized by two main pathological hallmarks: (i) intracellular neurofibrillary tangles consisting of hyperphosphorylated Tau proteins and (ii) extracellular amyloid plaques consisting of aggregates of β -amyloid ($A\beta$) peptides resulting from the processing of amyloid precursor protein (APP). Three main proteases (α -, β -, and γ -secretases) are involved in APP processing through (i) the amyloidogenic pathway

⁴ E-Phy-Science, Bioparc de Sophia Antipolis, 2400 route des Colles, Biot 06410, France

⁵ Université de Lille, CNRS, UMR8576—Labex DISTALZ, Villeneuve d'Ascq 59655, France

⁶ Université Côte d'Azur, Insem, CNRS, IPMC, DistAlz Laboratory of Excellence, Valbonne, France

⁷ Institute of Biomedicine, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland

⁸ Proteome Sciences plc, Hamilton House, London WC1H 9BB, UK

(β - and γ -secretases), leading to A β production, and (ii) the non-amyloidogenic pathway (α - and γ -secretases), which prevents A β generation by cleaving APP within the A β sequence [1].

The identification of early-onset autosomal-dominant AD-linked mutations in the genes for *APP* and presenilins (*PSEN1* and *PSEN2*, part of the γ -secretase), has placed abnormal APP metabolism at the center of the disease, further supporting the amyloid-cascade hypothesis [2, 3]: the overproduction of A β peptides—especially the longer forms that are thought to be more neurotoxic—may lead to (or favor) Tau pathology and subsequent neuronal death.

Although the validity of the amyloid-cascade hypothesis is debated [4], the importance of APP has recently been emphasized by the discovery of a rare *APP* mutation hampering A β production that lowers AD risk [5]. Moreover, loss-of-function variants in Sortilin-related receptor (L(DLR class A)), which is a strong regulator of APP metabolism and A β production, are associated with early- and late-onset forms of AD [6–8]. Beyond A β production, the involvement of genetic risk factors, such as APOE and TREM2 in modulation of A β aggregation and/or degradation/clearance, has been proposed to be essential in the AD process [9, 10]. Recent high-throughput genomic approaches have also highlighted APP metabolism in the AD pathophysiological process: the main actors of APP metabolism, e.g., ADAM10 and A β PH1B (part of the γ -secretase complex), have been characterized as genetic determinants [11, 12], and numerous other genetic determinants have been described as potential modulators of APP metabolism (for a review, see ref. [13]).

Among these genetic determinants, *FERMT2* has been identified to be involved in APP metabolism using an agnostic, systematic approach, i.e., high-content screening of 18,107 siRNA pools in HEK293 cells stably overexpressing an APP fusion protein (mCherry-APP^{695WT}-YFP) that allows for the quantification of intracellular APP fragments [14]. Following this initial screening, *FERMT2* underexpression was then specifically associated with increasing levels of mature APP at the cell surface, where *FERMT2* facilitates APP recycling, resulting in increased A β -peptide production [14].

Little is known about *FERMT2*. This protein localizes to focal adhesions, where it is proposed to interact with β 3 integrin and to be a major actor in integrin activation [15]. *FERMT2* has been reported as a key protein involved in cardiac and skeletal muscle development [16], and has been involved in cancer progression [17–19]. However, despite the fact that *FERMT2* is a genetic risk factor of AD, the physiological and/or pathophysiological roles of *FERMT2* in the brain have not been identified. Within this background, we sought to determine how *FERMT2* regulation

impacts APP metabolism and/or AD risk and its involvement in neuronal functions.

Methods

Cell culture

Human HeLa (RRID:CVCL_0030) and HEK293 (RRID:CVCL_0045) cells were respectively maintained in Eagle's minimal essential medium (American Type Culture Collection, Teddington, UK) and DMEM/Ham's F-12 1:1 medium (Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 2-mM L-glutamine, penicillin (10 UI/mL)/streptomycin (10 μ g/mL). All cell lines were tested negative for mycoplasma contamination using PCR test (Venor GeM OneStep, Minerva Biolabs, Germany).

Microfluidic chip fabrication

Masters of multicompartiment microfluidic devices were fabricated through photolithography as previously described [20]. Polydimethylsiloxane (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI) pads were replica-molded (2 h at 70 °C) and irreversibly bonded to glass coverslips via O₂ plasma (Diener, Ebhausen, Germany). The devices were placed in plastic Petri dishes, wetted with dH₂O, and UV-sterilized for 30 min.

Primary neuronal culture and viral transductions

Animal housing and experimentation were carried out in accordance with the French Council in Animal Care guidelines for the care and use of animals and following the protocols approved by the Institut Pasteur de Lille ethical committee. Primary neuronal cultures were obtained from hippocampus or cortices of postnatal (P0) rats as described previously [21]. Briefly, after the dissection of the brains, hippocampi were washed three times in HBSS (HBSS, 1-M HEPES, penicillin/streptomycin, and 100-mM sodium pyruvate, Gibco) and were dissociated via trypsin digestion (2.5%, 37 °C, Gibco) for 7 min. Next, hippocampi were incubated with DNase (5 mg/mL, Sigma) for 1 min and washed again in MEM medium supplemented with 10% SVF, 1% GlutaMax, 0.8% MEM vitamins, 0.5% penicillin/streptomycin, and 0.45% D-glucose (Sigma). With a pipette, hippocampi were mechanically dissociated and resuspended in Neurobasal A medium (Gibco) supplemented with 2% B27 (Gibco) and 0.25% GlutaMax. In total, 200,000 neurons were seeded per well in 24-well plates. In total, 50,000 neurons were seeded in the somatic chamber of microfluidic devices, precoated with poly-L-lysine (0.1 mg/mL, Sigma)

in borate buffer (0.31% boric acid, 0.475% sodium tetraborate, pH = 8.5). About 0.1% EDTA (in H₂O) was added to the Petri dishes containing microfluidic devices to minimize evaporation. The culture medium was refreshed every 3 days. Neurons were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Lentiviral transductions

Lentiviral transductions were carried out at 1 day in vitro (DIV1) with a multiplicity of infection (MOI) of 10. In the case of co-transduction, MOI of 5 was used for each lentivirus. Briefly, lentiviruses were diluted in culture medium containing 4-µg/mL polybrene (hexadimethrine bromide, Sigma) and were added to the cells. After 6 h of transduction, lentivirus suspension was replaced with fresh medium. The following lentiviruses were used for transduction: Mission shRNA vectors (Sigma) shNT (Non-Mammalian shRNA Control, SHC002), shFERMT2 (TRCN0000191859), shAPP (TRCN000006707), and pLenti6 empty vectors (Mock) or including human FERMT2^{WT} or FERMT2^{QW} cDNA sequences. LifeAct-Ruby lentivirus (pLenti.PGK.LifeAct-Ruby.W: RRID:Addgene_51009) was a kind gift from Rusty Lansford.

RFLP genotyping

Genomic DNA in the vicinity of the rs7143400 was amplified by PCR using the following primers 5'-GGTTGGGTGTGAATAGGAAT-3' and 5'-TGCATGCCTGATTATTTGG-3' before digestion with Tsp45I enzyme (Thermo Scientific). Finally, treated PCR products were analyzed in 2% agarose gel to visualize the cleavage bands.

Designing CRISPR/Cas9 and genome editing

gRNA sequences were predicted by Benchling (<http://www.benchling.com>) and cloned into the GeneArt CRISPR OFF Nuclease Vector (ThermoFisher Scientific) allowing Cas9 and gRNA expression. Homology-directed repair was induced by co-transfection of 71-pb double-stranded DNA oligonucleotide template, including rs7143400-T allele in HEK293 cells (Supplementary Fig. 1). HEK293 clones were isolated by limiting dilution before RFLP genotyping. Sequence integrity of the FERMT2 3'UTR and predicted potential off-target sites were validated by Sanger sequencing (Supplementary Fig. 1).

Visualization of miRNA expression at the single-cell level

To visualize RNA molecules by fluorescence at single-cell resolution and quantify gene expression, we used

ViewRNA Cell Plus Assay kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Briefly, after fixation and permeabilization, cells were washed 3× with PBS containing RNase inhibitor and were incubated with probes directed against specific mRNA or miRNA for 2 h at 40 °C. After washes, probes were amplified, first, in a pre-amplifier solution, and second, in an amplifier solution, both for 1 h at 40 °C. Then, cells were incubated with nucleotide probes stained with different fluorophores, allowing the detection of mRNA or miRNA puncta. This approach was coupled with immunofluorescence experiments described.

miRNA quantification in human brain samples

This study was approved by CHU de Québec—Université Laval Research Ethics Committee (#2017-3017). Frozen human brain tissue (0.5–1.2 g per sample) was obtained from the Harvard Brain Tissue Resource Center in Belmont, USA, the Brain Endowment Bank in Florida, USA, and the Human Brain and Spinal Fluid Resource Center in Los Angeles, USA, via NIH Neurobiobank. The cohort of patients included nondementia controls ($n = 30$) and AD cases ($n = 52$) based on neuropathological diagnosis. Upon receipt of the specimens, frozen postmortem parietal cortex (BA39) was crushed using a biopulverizer prior to RNA extraction and analysis.

Total RNA was extracted from brain tissue (Supplementary Table 1) using TRIzol reagent (Ambion, 15596018) according to the manufacturer's instructions. miRNA quantifications were done using the TaqMan miR Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Burlington, Canada) and TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystem, 4324018) following the manufacturer's instructions. Primers were purchased from ThermoFisher (miR-4504 ID: 464271_mat; RNU48 ID: 001006; miR-222-3p ID: 002276). MiR-4504 and miR-222 levels were normalized to RNU48. The relative amounts of each mature miRNA were calculated using the comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) method [22].

Immunoblotting and Aβ quantification

Equal amounts (10–25 µg) of cell lysate were collected in RIPA buffer (1-M Tris, 1.5-M NaCl, 0.1% NP-40, 10% SDS, 100-mM sodium orthovanadate, and 0.5% sodium deoxycholate, pH = 7.4) containing protease inhibitors (Complete mini, Roche Applied Science, Penzberg, Germany), lithium dodecyl sulfate (LDS), and reducing agent (Invitrogen). Samples were denatured and analyzed using SDS-PAGE and the following antibodies: human FERMT2 (RRID:AB_10727911), APP C-terminal domain (RRID:AB_258409), actin (RRID:AB_476692), Aβ clone 6E10 (RRID:AB_662798), Aβ clone 4G8 (RRID:AB_662812), Synaptophysin I (RRID:AB_887824), PSD95 (RRID:

AB_2619800), and GAPDH (RRID:AB_10615768). Extracellular culture media were collected in order to dose-secrete A β using Alpha-LISA assays (Alpha-LISA Amyloid β_{1-X} Kit, AL288C, PerkinElmer) according to the manufacturer's instructions.

Cell-surface biotinylation

HEK293-APP^{695WT} cells were transfected with PCDNA4.1, FERMT2^{WT}, or FERMT2^{QW} (PCDNA4/HisMax, Thermo Scientific V86420) for 48 h. Next, cell-surface proteins were biotinylated using sulfo-NHS-SS-biotin (sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionate) for 30 min at 4 °C according to the manufacturer's instructions (Cell Surface Protein Isolation Kit, Pierce, 89881). Then, cells were lysed and immunoprecipitated with streptavidin beads. Precipitated proteins were eluted from the beads with loading buffer containing 50-mM DTT, heated for 10 min at 95 °C, and analyzed by WB.

Co-immunoprecipitation

Equal amounts of protein were collected in co-immunoprecipitation buffer (10-mM HEPES, 140-mM NaCl, and 0.5% NP-40, pH = 7.4) containing protease inhibitors (Complete mini, Roche Applied Science) and phosphatase inhibitor (100-mM sodium orthovanadate) and incubated with the primary A β antibody clone 4G8 (RRID:AB_662812) overnight, with gentle rocking. Production of recombinant C100 fragment was performed as previously described [23]. Co-immunoprecipitation was carried out using Pierce Protein A/G magnetic beads kit (Thermo Scientific, 88802) according to the manufacturer's instructions. Samples with proteins and antibody complexes were incubated with 25 μ L (0.25 mg) of A/G magnetic beads previously washed with co-immunoprecipitation buffer. After 1 h of incubation at 4 °C, the magnetic beads were washed 3 \times , resuspended with loading buffer (LDS and reducing agent) for 10 min at RT, and analyzed by WB.

Immunofluorescence and PLA

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min, washed 3 \times with PBS, and permeabilized for 5 min with 0.3% Triton X-100. Cells were incubated with 5% normal donkey serum for 2 h at RT before overnight incubation with the following primary antibodies: human FERMT2 (RRID:AB_10727911), Kindlin-2 (RRID:AB_2278298), APP C-terminal domain (RRID:AB_258409), APP A4 clone 22C11 (RRID:AB_94882), Synaptophysin I (RRID:AB_887824), PSD95 (RRID:AB_2619800), Homer (RRID:AB_2631222), and α -Tubulin (RRID:AB_2210391). The cells were then

washed 3 \times with PBS and incubated with the following secondary antibodies raised in donkey (AlexaFluor-conjugated AffiniPure Fragment 405, 488, 594, or 647, Jackson ImmunoResearch), 1:10,000 Hoechst 33342, or 1/40 SiR-Actin probe (SC001, Spirochrome). Alternatively, Kindlin-2 (RRID:AB_2278298) and APP A4 22C11 (RRID:AB_94882) antibodies were used for the proximity-ligation assay (PLA) according to the manufacturer's instructions (Duolink[®], Olink Bioscience).

Live-cell microscopy for axon elongation and actin dynamics

After DIV5, once the axons reached the axonal chamber of microfluidic devices, the culture medium was replaced with Neurobasal A without phenol red, supplemented with GlutaMax, 2% B₂₇, and 25-mM HEPES. Phase-contrast images of growing axons were acquired every 10 min for 110 min using Zeiss AxioObserver Z1 microscope equipped with a Prime 95B Scientific CMOS (Photometrics, Tucson, AZ) camera and 32 \times objective. Movies were analyzed using Fiji MTrack J Plugin [24] to determine the axon-growth speed.

To visualize filamentous actin (F-actin) dynamics in the growth cones of elongating axons, neurons were co-transduced with LifeAct-Ruby at DIV1. At DIV5, growth cones expressing LifeAct-Ruby were imaged using a Nikon microscope equipped with Yokogawa spinning-disk system and a Nikon CFI Apochromat 100 \times TIRF objective (NA 1.49), in live superresolution mode (66 nm/px). Processed movies were analyzed using Imaris (Bitplane, Zurich, Switzerland) surface tracking tool to obtain the speed and direction of F-actin puncta undergoing actin-retrograde flow.

Synaptosome extraction

To verify the presence of proteins at the synaptic level, we did a subcellular fractionation as previously described [25]. Briefly, cortical neurons were resuspended in a solution (0.32-M sucrose and 10-mM HEPES, pH = 7.4) and were centrifuged at 1000 \times g for 10 min to remove nuclei and debris. The supernatant was centrifuged at 12,000 \times g for 20 min to remove the cytosolic fraction. The pellet was resuspended in a second solution (4-mM HEPES, 1-mM EDTA, pH = 7.4) and was centrifuged 2 \times at 12,000 \times g for 20 min. The new pellet was resuspended in a third solution (20-mM HEPES, 100-mM NaCl, and 0.5% Triton X-100, pH = 7.2) for 1 h at 4 °C and centrifuged at 12,000 \times g for 20 min. The supernatant collected corresponds to the non-PSD fraction (Triton-soluble). The remaining pellet was resuspended in a fourth solution (20-mM HEPES, 0.15-mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholic acid, and 1% SDS,

pH = 7.5) for 1 h at 4 °C and was centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min to obtain a supernatant containing the PSD fraction (Triton-insoluble). The different fractions were then analyzed by WB.

Quantification of synaptic connectivity

To quantify synaptic connectivity, we transduced primary hippocampal neurons in pre- and/or postsynaptic compartments of microfluidic devices at DIV1 with lentiviruses carrying shNT and/or shFERMT2 (MOI = 10). At DIV14, cultures were fixed and immunostained against Synaptophysin I and Homer pre- and postsynaptic markers, respectively. Synaptic compartments were imaged with Zeiss LSM880 confocal microscope, using a $63\times$ 1.4-NA objective and the AiryScan superresolution unit. Images were analyzed with Imaris software (Bitplane, Zürich, Switzerland) by reconstructing Synaptophysin I and Homer puncta in 3D. The volume and position information of all puncta were processed using a custom Matlab (MathWorks, Natick, MA) program. This program assigns each postsynaptic spot to the nearest presynaptic spot (within a distance threshold of 1 μm) and calculates the number of such assignments for all presynaptic puncta. The percentage of presynaptic spots not assigned by any postsynaptic spot was consistently used as a readout of synaptic connectivity [26].

Lentivirus injection

For stereotaxic injections, C57Bl6/J mice (RRID: IMSR_JAX:000664) were anesthetized with 4% isoflurane (2 L/min) and placed in a stereotaxic frame (68528, RWD Life Science, Shenzhen, China) in which the head of the animal was fixed with a pair of ear bars and a perpendicular tooth bar. During surgical procedures, 1.5% isoflurane (2 L/min) was delivered through a facial mask via spontaneous respiration. Their body temperature was maintained between 36.5 and 37.5 °C with a homeothermic blanket. The head was shaved and Vetedine was applied. Wounds and pressure points were infiltrated with lidocaine. A skin incision was made along the sagittal midline of the scalp. Craniotomy was made to target the structures of interest. Lentiviruses were injected into the right and left hippocampus (1.5 μL per hemisphere, 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$). After injections, wound clips were used for skin closure. For the sham group, surgical procedures were performed without any injection. During the surgery, the level of anesthesia was regularly verified by testing the nociceptive hind-limb withdrawal reflex. Subjects were then allowed to recover in their home cages for at least 7 days before sacrifice for ex vivo electrophysiological recordings.

Hippocampal acute-slice preparation

One week after the surgery, sagittal hippocampal brain slices were obtained using standard brain-slicing methods. Mice were deeply anesthetized with isoflurane and decapitated. The brain was quickly removed and immersed in ice-cold preoxygenated artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing 124-mM NaCl, 3.75-mM KCl, 2-mM MgSO_4 , 2-mM CaCl_2 , 26.5-mM NaHCO_3 , 1.25-mM NaH_2PO_4 , and 10-mM glucose, and was continuously oxygenated (pH = 7.4, 27 °C). In all, 350- μm -thick slices were prepared using a Vibratome (VT 1000S, Leica Microsystems, Bannockburn, IL), and placed in a holding chamber filled with aCSF. Slices were allowed to recover in these conditions at least 1 h before recording.

Electrophysiological recordings

For electrophysiological recordings, a single slice was placed in the recording chamber, submerged and continuously superfused with gassed (95% O_2 and 5% CO_2) aCSF at a constant rate (2 mL/min). Extracellular field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded in the CA1 stratum radiatum using a glass micropipette filled with aCSF. fEPSPs were evoked by the electrical stimulation of Schaffer collaterals/commissural pathway at 0.1 Hz with a glass-stimulating electrode placed in the stratum radiatum (100- μs duration).

To test the effect of miRNA-expressing lentiviruses on basal synaptic transmission, input/output (I/V) curves were constructed at the beginning of the experiment. The slope of fEPSPs was measured and plotted against different intensities of stimulation (from 0 to 100 μA).

Stable baseline fEPSPs were recorded by stimulating at 30% maximal field amplitude for 10 min prior to the beginning of the experiment (single-pulse stimulation every 10 s (0.1 Hz)). The same intensity of stimulation was kept for the remainder of the experiment. For the paired-pulse facilitation (PPF) protocol, two stimulations were applied with 50-, 100-, 150-, 200-, 300-, 400-, and 500-ms interval. For long-term potentiation (LTP) protocol, after a 10-min stable baseline period, LTP was induced by the following stimulation protocol: three trains of 100 stimulations at 100 Hz at the same stimulus intensity, with 20-s intervals between trains. Following this conditioning stimulus, a 1-h test period was recorded where responses were again elicited by a single-pulse stimulation every 10 s (0.1 Hz) at the same stimulus intensity. Signals were amplified with an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Union City, CA) digitized by a Digidata 1550 interface (Axon Instruments, Molecular Devices, San Jose, CA) and sampled at 10 kHz. Recordings were acquired using Clampex (Molecular Devices) and analyzed with Clampfit (Molecular

Devices). Experimenters were blinded to treatment for all experiments.

Statistical analysis

No statistical methods were used to predetermine sample sizes; sample sizes were determined according to data reported in previous publications. All the results are presented as mean \pm SD. Statistically significant outliers were calculated and excluded, using the mean absolute deviation (MAD) method (± 3 MAD). Data were analyzed either using nonparametric (Mann–Whitney) test or a two-way ANOVA (Kruskal–Wallis) for multiple comparisons, including Bonferroni's correction, as indicated in the figure legends. For electrophysiological recordings, unpaired t tests were used to compare groups of hippocampal slides. Data analysis was not blinded.

Results

FERMT2 expression is dependent on miRNAs modulating APP metabolism

We used an unbiased screening approach to identify miRNAs that modulate APP metabolism in a HCS model that allows for the quantification of intracellular APP fragments [14]. We screened a total of 2555 mature human miRNAs in a 384-well-plate format allowing us to identify 50 miRNAs (top and bottom 1%) with the strongest impact on APP metabolism (Supplementary Table 2 and Supplementary Fig. 2). To determine which genes were potentially regulated by these top 50 hits, we selected the intersection of predictions resulting from at least four different algorithms (see "Methods") and thereby identified 6009 putative miRNA-target genes. To further refine the list of predicted genes, we cross-checked them against a list of 832 genes that we previously identified to have a major impact on APP metabolism in a genome-wide siRNA screening [14] (Supplementary Fig. 3). This resulted in 180 common genes that are putative targets of 41 miRNAs. To determine if any of these 180 genes were preferentially regulated by this pool of 41 miRNAs, we performed 1 million drawing lots of 41 miRNAs among the 2555 tested and compared them against the list of miRNAs predicted to bind in the 3'-UTR of each of the 180 genes (Supplementary Fig. 3). The AD genetic risk factor *FERMT2* (encoding Kindlin-2) was among the most significant genes (p value $< 2.77 \times 10^{-4}$ after Bonferroni correction) that strongly modulate APP metabolism, and whose expression is potentially regulated by miRNAs that also strongly modulate APP metabolism. According to our screening, four miRNAs were predicted

to target *FERMT2* 3'UTR: miR-582-5p, miR-200b-3p, miR-221-3p, and miR-222-3p (Fig. 1a).

miRNA-dependent FERMT2 expression and genetic variation associated with AD risk

Our data indicate that regulation of the *FERMT2* expression is dependent on miRNAs, and we aimed to assess whether genetic variations associated with AD risk may modulate the miRNA-dependent expression of *FERMT2*. None of the variants localized within the *FERMT2* 3'-UTR were predicted to modify the binding of miR-582-5p, miR-200b-3p, miR-221-3p, or miR-222-3p to this region (Supplementary methods). In contrast, we had previously identified an AD-associated variant (rs7143400), where the minor T allele creates an 8-mer binding site for miR-4504 within the 3'-UTR of *FERMT2* [27] (Supplementary Fig. 4). This miRNA was not identified as a hit according to our screen, maybe due to the absence of rs7143400-T allele in HEK293 cell line (Fig. 1c). Of note, there is a strong linkage disequilibrium between rs7143400 and the GWAS hit rs17125924 ($R^2 = 0.78$), and rs7143400 has a lower minor allele frequency (MAF = 0.09) and subsequently lower association ($p = 7.14 \times 10^{-5}$) than rs17125924 (MAF = 0.20, $p = 6.6 \times 10^{-7}$). Supporting these predictions, we observed that miR-4504 led to reduced luciferase expression only in the presence of *FERMT2* 3'UTR rs7143400-T allele, whereas the four other miRNAs were able to induce a downregulation, regardless of the rs7143400 allele (Fig. 1b).

We then assessed the impact of these five miRNAs on endogenous *FERMT2* expression levels after their transfection in either HEK293^{WT} or rs7143400-mutated HEK293 cell lines (HEK293^{rs7143400-G/T}) generated by CRISPR–Cas9 technology (Fig. 1c and Supplementary Figs. 1 and 5). Accordingly, transfection of miR-582-5p, miR-200b-3p, miR-221-3p, or miR-222-3p in HEK293 cells led to reduced *FERMT2* expression whatever their genotype, while transfection of miR-4504 decreased the endogenous *FERMT2* expression only in the HEK293^{rs7143400-G/T} cell line (Fig. 1d, e). Similar effects were observed in HeLa cells that were genotyped to be heterozygous for rs7143400 (Fig. 1c–e and Supplementary Fig. 5).

Impact of miRNAs targeting FERMT2 on APP metabolism

These five miRNAs are thus potential candidates to modulate APP metabolism through a direct downregulation of *FERMT2*. However, these miRNAs can also potentially target other genes strongly modulating APP metabolism (Supplementary Table 3). We reasoned that if a candidate miRNA affects APP metabolism mainly through

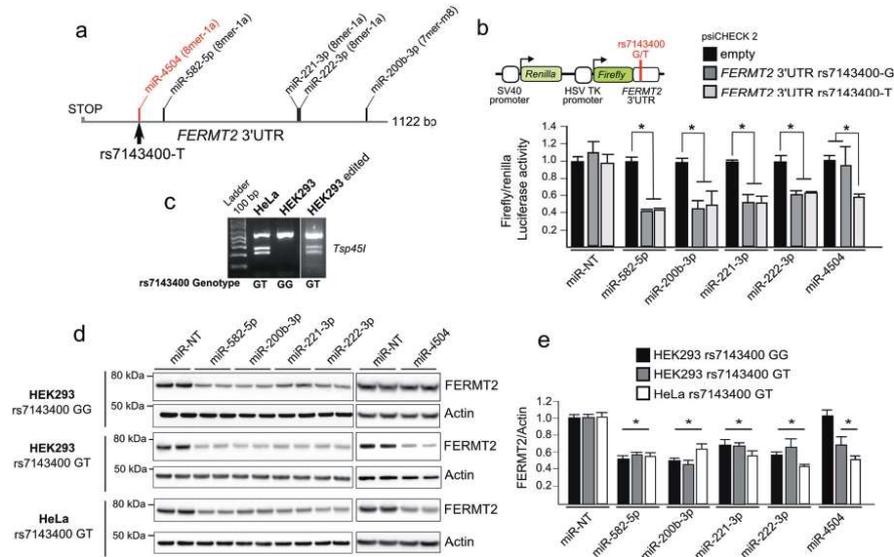


Fig. 1 Validation of functional miRNAs targeting *FERMT2* 3' UTR. **a** Relative positions of miRNA-target sites on *FERMT2* 3' UTR. The target site created by the rs7143400-T allele, which is associated with AD risk, is shown in red. **b** Luciferase activity of *FERMT2* 3' UTR carrying either the rs7143400-G or the rs7143400-T allele in HEK293 cells co-transfected with a nontargeting miRNA (miR-NT) or 5 miRNA mimics. Data are expressed relative to the miR-NT. **c** RFLP genotyping of HeLa and HEK293 cell lines edited or not for the

rs7143400 via CRISPR-Cas9 (Supplementary Fig. 1). **d** Endogenous *FERMT2* expression levels were assessed by Western blot using indicated cell extracts following transient transfection with a non-targeting miR (miR-NT) or with the indicated miR for 72 h. **e** WB quantifications from three independent experiments as in **d**. Data given in mean \pm SD. * $p < 0.05$, nonparametric test compared to miR-NT condition.

downregulating *FERMT2*, this candidate miRNA would have similar effects on APP metabolism as the direct *FERMT2* downregulation by siRNAs we had previously demonstrated, i.e., leading to an increase in both intra- and extracellular by-products of APP [14]. To investigate this hypothesis, we used the data generated in our HCS approach (based on HEK293 cell line stably overexpressing a mCherry-APP695WT-YFP) in order to quantify intracellular by-products of APP [14, 28], and we also measured A β and sAPP α secretion after miR-582-5p, miR-200b-3p, miR-221-3p, or miR-222-3p transfections.

Only miR-582-5p and miR-222-3p showed similar effects as *FERMT2* downregulation [14], i.e., they increased the levels of intracellular APP metabolites tagged by mCherry and YFP, and increased A β and sAPP α secretion (Fig. 2a, b).

Since the potential effects of miR-4504 would depend on the presence of the rs7143400 minor T allele, we were not able to test for its impact in our HCS model. We nevertheless took advantage of HEK293^{rs7143400-G/T} cells by co-transfecting them with miR-4504 and mCherry-APP^{695WT}-YFP cDNA in order to mimic our HCS model. When

compared to HEK293^{rs7143400-G/G}, the transfection of miR-4504 in HEK293^{rs7143400-G/T} led to an accumulation of intracellular APP mCherry and YFP-tagged metabolites and an increase in A β and sAPP α secretion (Fig. 2c, d). MiR-4504 showed similar effects as *FERMT2* downregulation, and this observation further supports that miR-4504 regulates APP metabolism as a function of the *FERMT2* rs7143400 variant.

In conclusion, we characterized that regulation of *FERMT2* expression by miRNAs impacts APP metabolism, and potentially in a genetics-dependent manner.

miRNA expression in different hippocampal cell types and in AD brains

To provide further physiological relevance to our findings, we first combined classical immunocytochemistry with RNA hybridization that allows for the detection of miRNAs at single-copy sensitivity. We observed that miR-200, miR-222, and miR-4504 were mainly expressed in neurons when compared to astrocytes (Fig. 3a). We next measured the expression levels of these miRNAs in the postmortem brain

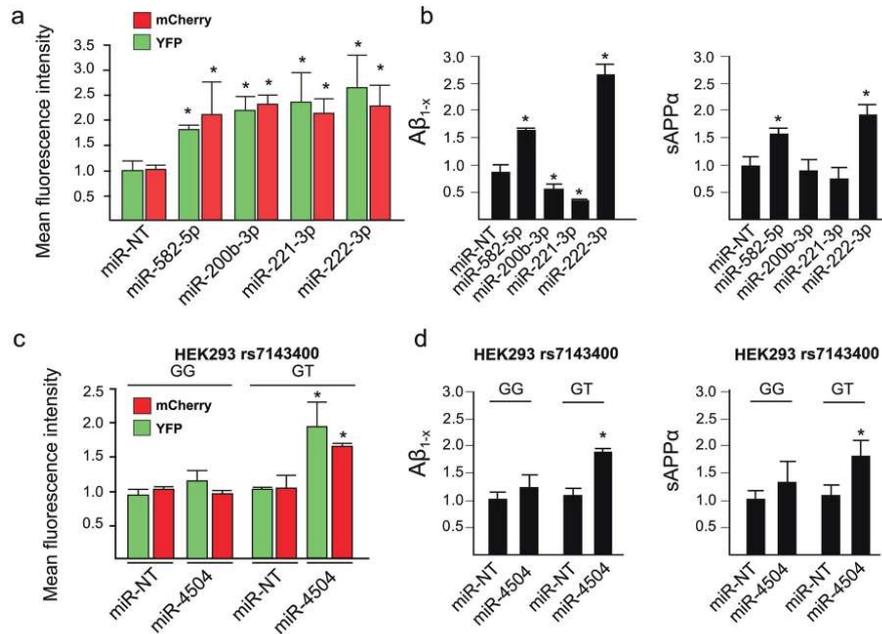


Fig. 2 Validation of the effects of *FERMT2*-targeting miRNA on APP metabolism. **a** Mean fluorescence intensity of intracellular mCherry and YFP signals obtained after miRNA transfection in HEK293 cells stably overexpressing a mCherry-APP^{695WT}-YFP. **b** Quantification of $A\beta$ and sAPP α secretion after miRNA transfection in HEK293 cells stably overexpressing a mCherry-APP^{695WT}-YFP. **c** Mean fluorescence intensity variation of intracellular mCherry and

YFP signal obtained after miRNA transfection in HEK293^{rs7143400-GG} or HEK293^{rs7143400-GT} cell lines transiently overexpressing a mCherry-APP^{695WT}-YFP. **d** Quantification of $A\beta$ and sAPP α secretion after miRNA transfection in HEK293^{rs7143400-GG} or HEK293^{rs7143400-GT} cell lines transiently overexpressing a mCherry-APP^{695WT}-YFP. Bar charts show mean \pm SD. Mann-Whitney test; * $p < 0.05$.

samples from 52 AD patients and 30 control subjects. We observed that the expression levels of miR-200 and miR-4504 were significantly higher in AD brains than in controls (Fig. 3b). Collectively, these data suggest that endogenous *FERMT2* expression and its impact on APP metabolism are dependent on the expression of several miRNAs, two of which are overexpressed in the brains of AD cases and, among these two, one impacts APP metabolism in the presence of a genetic variant associated with AD risk.

Pathway analyses suggest *FERMT2*/APP interaction to be involved in axonal growth

Little is known about the physiological processes that require the regulation of APP expression and/or its metabolism by miRNAs. To obtain a list of potential physiological pathways to be further investigated, pathway-enrichment analysis was performed using the 41 candidate miRNAs that strongly modified APP metabolism in our HCS (Supplementary Table 2). This analysis revealed that the candidate miRNAs

are predicted to regulate neuronal pathways, such as axonal guidance (Table 1a). Since these 41 miRNAs potentially target 180 genes that strongly modulate APP metabolism (Supplementary Table 3), we also performed pathway-enrichment analysis using these 180 genes. This analysis revealed that these genes are predicted to be involved in axonal guidance among others (Table 1b). In conclusion, both miRNAs and genes modulating APP metabolism, e.g., *FERMT2*, potentially play a role in axonal guidance.

APP is already known to be enriched in axonal growth cones during nervous system development and acts as a co-receptor for axon guidance and cell migration cues through its interaction with the extracellular matrix [29, 30]. We thus investigated the potential involvement of *FERMT2* in axonal growth. Using primary neurons cultured in microfluidic devices that fluidically isolate axons from their cell bodies, we first observed the colocalization of endogenous *FERMT2* with APP in the growth cones (Fig. 4a). We then addressed the impact of *FERMT2* silencing on axonal growth cone morphology using lentiviral vectors expressing

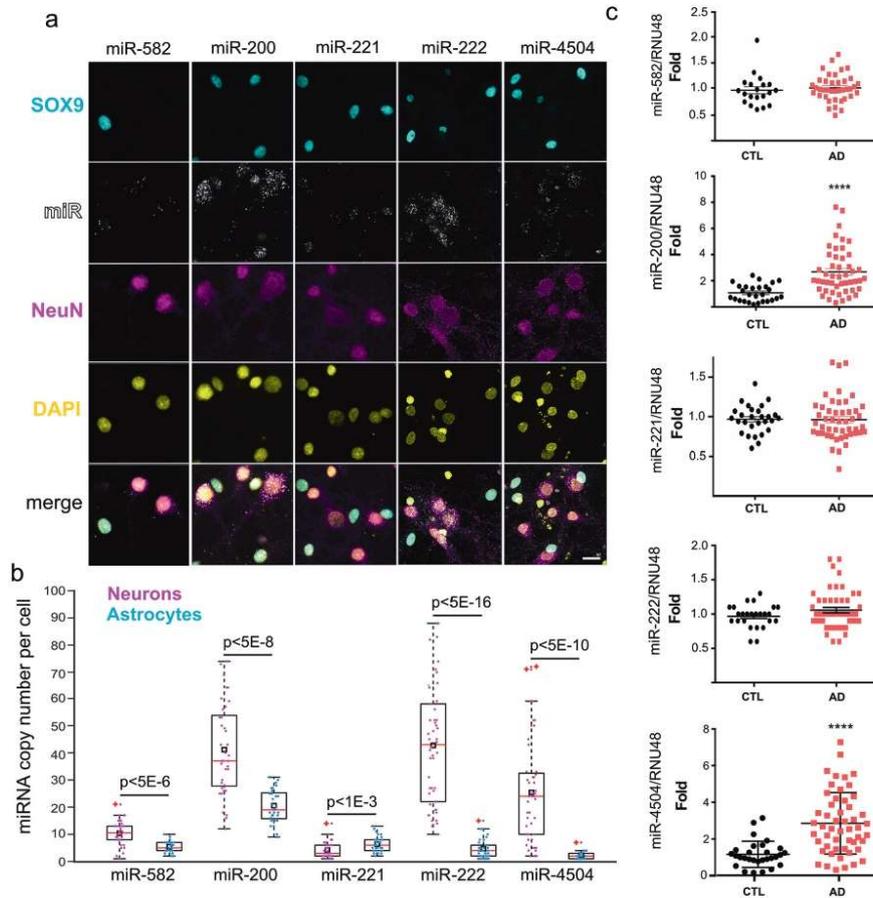


Fig. 3 miRNA expression in primary neuronal cultures and in AD brains. **a** Hybridization experiments in rat postnatal hippocampal neuronal cultures enabling single-copy detection of miRNA combined with immunocytochemistry against astrocytic (SOX9) and neuronal (NeuN) markers. Scale bar = 20 μ m. The box plot shows the

quantification of miRNA copy number in SOX9- or NeuN-positive cells ($N > 30$ cells for each condition). Black rectangles and red plus signs indicate sample mean and outliers, respectively. **b** Relative miRNA expression levels in temporal lobes of nondemented (CTL) and AD groups. Mann–Whitney test; **** $p < 0.0001$.

either shRNA against FERMT2 (shFERMT2) or a non-targeting shRNA (shNT). Actin staining revealed that FERMT2 underexpression led to a significant decrease in growth cone area (9.13 ± 0.71 vs. $12.79 \pm 1.10 \mu\text{m}^2$), as well as in the angular dispersion of growth cone filopodia during axonal growth (0.67 ± 0.04 vs. 0.84 ± 0.02) (Fig. 4b and Supplementary Fig. 6). Of note, no significant impact on actin-retrograde flow rate was observed (0.166 ± 0.003 vs. $0.157 \pm 0.002 \mu\text{m/s}$). These observations suggest a potential impairment of the exploration behavior of the growth cones due to FERMT2 silencing, but not an effect on actin

dynamics per se. FERMT2 underexpression was also associated with an accumulation of endogenous APP in the growth cones (1.38 ± 0.11 vs. 0.85 ± 0.08 , after normalization by the growth cone area).

By performing PLA, we observed PLA-FERMT2/APP signals in axonal growth cones (Fig. 4a), suggesting a potential function of the FERMT2/APP complex in axon-growth behavior. To address this, we first tested the possibility that APP and FERMT2 form a protein–protein complex via three complementary approaches: (i) pull down of endogenous APP from hippocampal primary neuronal

Table 1 Results of pathway-enrichment analyses.

KEGG pathway	<i>p</i> value	#miRNAs
(a) The ten most likely canonical pathways identified after pathway-enrichment analysis of 41 miRNAs that strongly modulate APP metabolism using DIANA Tools mirPath (v3.0)		
Axon guidance	4.70E-08	48
Proteoglycans in cancer	1.82E-06	49
Hippo-signaling pathway	4.10E-06	50
Fatty-acid biosynthesis	8.10E-05	11
Glutamatergic synapse	8.56E-05	48
GABAergic synapse	1.10E-04	48
AMPK-signaling pathway	2.20E-04	46
TGF-beta-signaling pathway	2.50E-04	45
Thyroid hormone-signaling pathway	3.90E-04	48
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	5.00E-04	49
KEGG pathway	<i>p</i> value	#genes
(b) The ten most likely canonical pathways identified after pathway-enrichment analysis of 132 genes targeted by 41 miRNAs (see Supplementary Methods for details)		
Axon guidance	0.0014	19
Ubiquitin-mediated proteolysis	0.010	16
Circadian rhythm	0.036	8

culture extracts co-immunoprecipitated endogenous FERMT2 (Fig. 4c). (ii) Overexpression of FERMT2^{WT} was also able to pull down the recombinant intracellular domain of APP (Fig. 4d). (iii) In addition, we generated a Q₆₂₁W₆₂₂AA FERMT2 mutant (FERMT2^{QW}) that was previously shown to abolish the interaction between the FERMT2 F3 domain and the NxTY motif of Integrin-β3 (which is also present within the intracellular domain of APP) [31]. Remarkably, when overexpressed in HEK293 cells, FERMT2^{QW} was not able to pull down the recombinant intracellular domain of APP. Cumulatively, these findings support a direct interaction between FERMT2 and APP. Based on the recently solved crystal structure of FERMT2 in complex with the integrin-β3 tail [32], we built a structural model of the FERMT2/APP complex (Fig. 4e), supporting our hypothesis that a protein-protein interaction exists between FERMT2 and APP.

We next assessed the biological impact of the FERMT2/APP interaction on APP metabolism. By performing extracellular biotinylation experiments, we observed that FERMT2 overexpression in HEK293-APP^{695wt} cell line decreased the levels of APP at the cell surface, an effect that was abolished by the presence of the QW mutation (Fig. 4f). Further, a dominant negative effect of the FERMT2^{QW} mutant was observed: its overexpression impacted APP metabolism similarly to FERMT2 silencing, i.e., resulting in increased mature APP at the cell surface and increased Aβ production, as previously reported [14]. Altogether, our data

suggest that a FERMT2/APP interaction is necessary for FERMT2 to have an impact on APP metabolism.

In order to characterize in-depth the impact of FERMT2 and/or APP expression on axonal growth, we conducted time-lapse microscopy and measured axon-growth speed at DIV5 following lentiviral transduction (shNT, shFERMT2, or shAPP) of neurons in microfluidic devices at DIV1. FERMT2 silencing led to 31.7% increase in axon-growth speed (Fig. 5 and Supplementary Fig. 6). Conversely, APP underexpression led to 16.7% decrease in axon-growth speed. Remarkably, silencing of APP was able to fully abolish the effect of FERMT2 underexpression on axon-growth speed, suggesting that APP was required for the molecular mechanism by which FERMT2 controls the axon-growth speed. In addition, we observed that FERMT2^{QW} mutant overexpression was able to induce 15.9% increase in axon-growth speed (Fig. 5). Since overexpression of FERMT2^{WT} did not show any impact, these data also suggested a potential dominant negative effect of the FERMT2^{QW} mutant and further supported the involvement of FERMT2/APP complex in axonal growth.

FERMT2 is present at the synapse and controls synaptic connectivity

Next, we investigated the impact of FERMT2 silencing on neuronal maturation at DIV14. First, co-staining between FERMT2 and synaptic markers (Synaptophysin and Homer) suggested the localization of FERMT2 at the synapse (Fig. 6a). The presence of FERMT2 in both pre- and postsynaptic compartments was confirmed by synaptosomal purification (Fig. 6b). To control shRNA expression separately in pre- or postsynaptic neurons, hippocampal neurons were cultured in microfluidic devices that promote synapse formation in an isolated chamber [33]. Thanks to the use of narrow microchannels, these devices spatially isolate neurites from their cell bodies and allow lentiviral transductions to be conducted in different compartments, thereby allowing us to silence FERMT2 expression at the pre- and/or postsynaptic levels (Fig. 6c and Supplementary Fig. 6). The effects of shRNA expression (DIV1) on synaptic connectivity were assessed by confocal microscopy of synaptic markers (DIV14) followed by three-dimensional image segmentation and quantification [26]. Underexpression of FERMT2 in the presynaptic chamber led to a decrease in synaptic connectivity, whereas no such effect was observed when underexpressing FERMT2 in the postsynaptic compartment (Fig. 6d). Altogether, our data suggest that FERMT2 expression is required for synapse connectivity. Moreover, PLA-FERMT2/APP signals were colocalized with Synaptophysin and Homer puncta (Fig. 6e), supporting the possibility of the involvement of the FERMT2/APP complex in synapses.

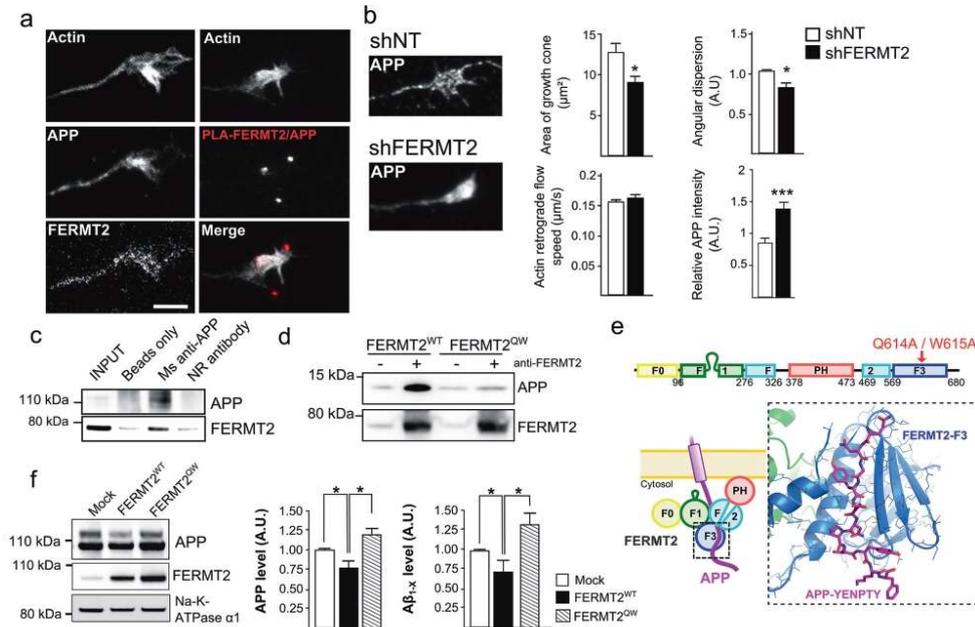


Fig. 4 FERMT2 directly interacts with APP. **a** Immunofluorescence images showing the presence of APP and FERMT2 within the axonal growth cone stained with SiR-Actin. The right panel shows the presence of PLA-FERMT2/APP puncta within the axonal growth cone. **b** Impact of lentiviral transduction of nontargeting shRNA (shNT) or shRNA against FERMT2 (shFERMT2) on growth cone area, angular dispersion and speed of the actin-retrograde flow, and APP immunostaining. **c** Co-IP between endogenous APP and FERMT2 from membrane extracts of hippocampal PNC. Protein extracts were incubated with beads only, a mouse (Ms) antibody against APP (4G8), or a nonrelevant (NR) antibody. **d** APP pull-down experiment with wild-

type (WT) or mutated (QW) FERMT2. Protein extracts from HeLa cells overexpressing FERMT2^{WT} or FERMT2^{QW} were incubated with recombinant APP C-terminal fragment (C100). **e** The domain organization of FERMT2 protein (upper panel). Q614A/W615A (QW) mutation was reported to abolish the interaction of F3 domain of FERMT2 with the NxTY motif. The structural model of the FERMT2-APP complex (lower panel) was built by homology using the crystal structure of the FERMT2-Integrin-β3-tail complex [32]. **f** The impact of FERMT2 on APP metabolism in HEK293-APP^{695WT} cells is reverted with the overexpression of FERMT2^{QW} compared to FERMT2^{WT}. Scale bar = 5 μm. Mann-Whitney test; **p* < 0.05.

FERMT2 expression regulates synaptic plasticity in an APP-dependent manner

We sought to establish the functional impact of FERMT2 and/or APP silencing on PPF and LTP in ex vivo mouse (10-week-old male) hippocampal slices, after stereotactic lentiviral injection allowing for the expression of shNT, shFERMT2, shAPP, or shFERMT2+shAPP.

Broadly speaking, PPF arises due to increased presynaptic Ca²⁺, which leads to the release of neurotransmitter in two distinct waves. In this situation, two action potentials in the presynaptic cell produce two excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) in the postsynaptic cell: the first action potential produces the first EPSP, but the second action potential produces an EPSP that is larger than the EPSP produced by the first. PPF modulation therefore highlights a modulation in presynaptic neurotransmitter release [34]. Using this readout

as a proxy for presynaptic function, we observed a significant decrease in PPF in shFERMT2-infected mice compared to shNT-infected control mice (Fig. 7a). This PPF impairment however was rescued when APP was also downregulated (shAPP+shFERMT2 group).

In separate experiments, tetanic stimulation was delivered to the Shaffer collaterals (SC) in order to induce LTP in hippocampal slices (Fig. 7b). Tetanic stimulation of the SC resulted in a robust, long-lasting potentiation of the fEPSP slope in slices from mice infected with shNT and with shAPP, whereas LTP was impaired in slices from shFERMT2-infected mice. This suggests that an LTP deficit was observed in hippocampal slices infected with shFERMT2, but not in those infected with shAPP (Fig. 7c, d). Remarkably, this deficit was abolished when both APP and FERMT2 were silenced, suggesting that APP was required for the molecular mechanism by which FERMT2 impacts LTP.

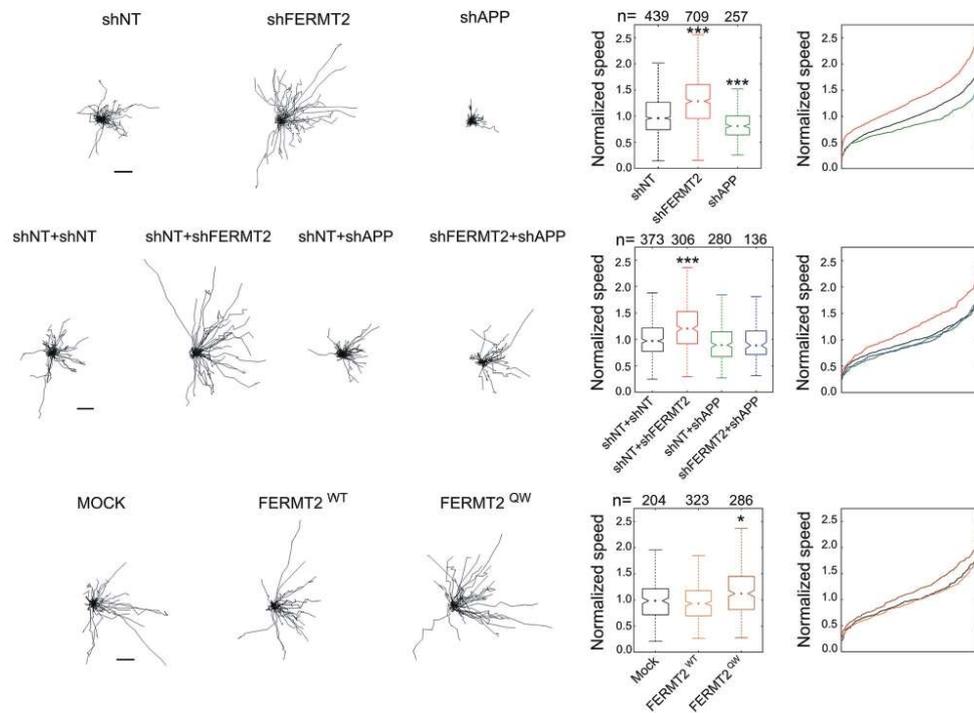


Fig. 5 *FERMT2* regulates axonal growth rate depending on APP expression. Impact of lentiviral transduction on axonal growth speed. Individual axon tracks from a representative set are plotted. Scale bar = 50 μ m. Box plots and cumulative-distribution plots are color-

matched. n is the number of axons analyzed from at least three independent experiments. Kruskal–Wallis ANOVA with multiple comparisons; * $p < 5 \times 10^{-3}$; *** $p < 5 \times 10^{-7}$.

Importantly, in these slices, no significant difference was observed for the normalized average slope of the evoked fEPSP, indicating that no alteration of the CA1 basal synaptic transmission occurred in any of the groups analyzed (Fig. 7e and Supplementary Fig. 7).

Altogether, these data are in agreement with our previous observations that *FERMT2* is involved in the presynaptic compartment and modulates synaptic connectivity in an APP-dependent manner.

Discussion

As in other multifactorial diseases, GWAS in AD are agnostic approaches, and how a genetic risk factor is implicated in pathophysiological processes is typically unknown. Sometimes, even the physiological functions of an AD genetic risk factor in the brain are not known. Understanding the role of these genes is thus a challenge that requires several key questions to be addressed: (i) does

the corresponding protein interact (directly or indirectly) with other key players and pathways known to be involved in AD? (ii) What is (are) the functional variant(s) responsible for the GWAS signal and does this (do these) variant(s) impact the biological function of the corresponding protein and its interaction with key players of AD?

To answer these questions, we developed systematic approaches to determine the genes that are involved in APP metabolism, a major player in AD development. To this end, we had previously developed a HCS, based on the quantification of intracellular APP fragments, to measure the impact of underexpression of 18,107 genes (via siRNA pools) on APP metabolism [14]. In the current study, we screened the impact of the overexpression of 2555 miRNAs on APP metabolism with the hypothesis that genes (i) that modulate the APP metabolism and (ii) whose expression levels are regulated by miRNAs that also modulate the APP metabolism are likely some of the key actors controlling the APP metabolism and functions. The convergence of these two agnostic screens highlighted *FERMT2*, a GWAS-defined genetic risk

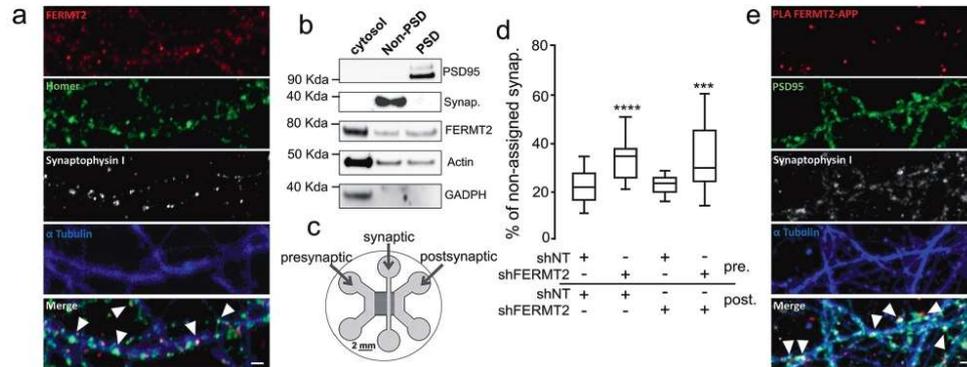


Fig. 6 FERMT2 is present at the synapse and controls synaptic connectivity. **a** Immunofluorescence in hippocampal primary neuronal culture showing the colocalization of FERMT2 puncta with pre- and postsynaptic markers, Synaptophysin and Homer, respectively. **b** Synaptic fractionation experiment revealed the presence of FERMT2 in both pre- and postsynaptic compartments. **c** Schematics of the tri-compartmental microfluidic device. The use of microchannels with different lengths ensures that only axons arrive from the presynaptic to the synaptic compartment, where synapses can be observed

independently of the cell bodies. The device also permits lentiviral transductions to be performed exclusively in the pre- and postsynaptic compartments. **d** Synaptic connectivity as a function of FERMT2 underexpression in pre- and postsynaptic chambers. Increased fraction of Synaptophysin spots not assigned by a Homer spot within a distance threshold of 1 μm is indicative of decreased synaptic connectivity. **e** PLA-FERMT2/APP puncta were observed at the synapses stained for pre- and postsynaptic markers. Scale bar = 2 μm .

factor of AD, for which almost nothing is known in the cerebral and AD contexts.

We demonstrated that a direct interaction between FERMT2 and APP—through the F3 domain of FERMT2 and the NxTY motif within APP's intracellular domain—is necessary for FERMT2 to have an impact on APP metabolism. Moreover, we observed that the FERMT2/APP interaction could be involved in the regulation of axonal growth, in line with APP's function within the growth cone [30] (data we replicated in this study). It has been reported that FERMT2 is required for the recruitment and activation of focal adhesion kinase and the triggering of integrin signaling [15]. In neurons, the focal adhesion pathway is involved in synaptic density and activity through regulating the dendritic spine shape, stability, and the signaling machinery therein [35]. That is why we also analyzed synaptic plasticity, a readout highly relevant to AD, where synaptic dysfunction/loss is one of the earliest events observed. FERMT2 underexpression had detrimental effects on PPF (presynaptic) and LTP (postsynaptic). Remarkably, in both cases, the detrimental effect of FERMT2 underexpression was dependent on APP expression. In this context, it is important to note that numerous evidence indicate that presynaptic physiological functions involving APP, which has been recently proposed as a structural and functional regulator of the hippocampal presynaptic active zone [36], could be major molecular players in AD [37]. As FERMT2 silencing leads to an accumulation of full-length APP and all its by-products (including A β peptides), we can

hypothesize that these accumulations could be involved in the synaptic dysfunction observed due to FERMT2 underexpression, although further experiments are needed to decipher the potential causal link between FERMT2 and APP, i.e., to determine whether FERMT2 impacts the function of full-length APP or invokes A β synaptotoxicity. This is of particular interest, since APP shedding strongly enhances its cell adhesion and synaptogenic activity [38]. Moreover, APP's intracellular domain is required for normal synaptic morphology and plasticity, suggesting that its intracellular interaction partners could be required for proper synaptic function [39]. Remarkably, we have recently proposed a circular model of AD pathogenesis, where the core of the focal adhesion pathway—in which FERMT2 and APP are part of—may participate in the dysfunction of synaptic plasticity in AD [13].

We have also identified that FERMT2 expression level is highly regulated by miRNAs that could be preferentially expressed in neurons. In addition, we previously identified the rs7143400 variant located in FERMT2 3'UTR to be susceptible to alter a binding site for miR-4504 [27]. Here, in addition to in silico prediction suggesting the impact of this variant on miRNA binding (Supplementary Fig. 4), we demonstrate that this variant is functional: the AD-associated rs7143400-T allele downregulates FERMT2 and modulates APP metabolism via its interaction with miR-4504. Remarkably, we observed that miR-4504 is overexpressed in the brains of AD cases compared to controls, and is mainly expressed in neurons in primary mixed hippocampal cultures.

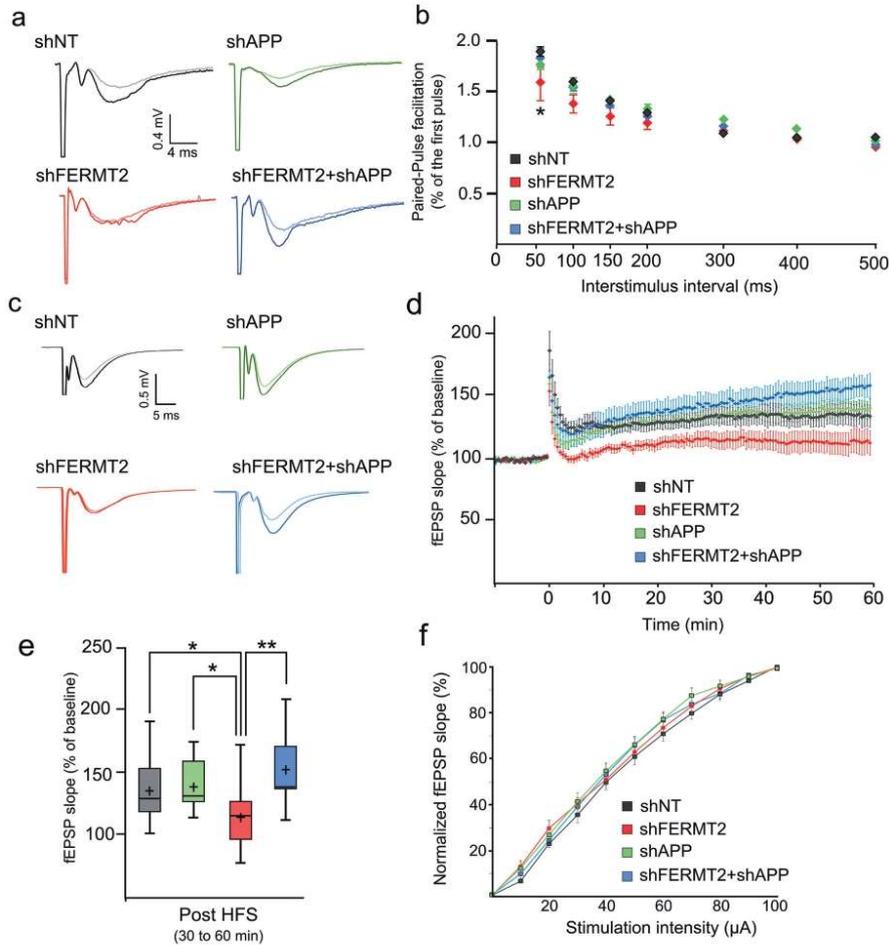


Fig. 7 *FERMT2* underexpression alters PPF and LTP in an APP-dependent manner. **a** Paired-pulse facilitation (PPF) as a function of the interstimulus interval 7 days after viral injection of indicated lentivirus. $n = 3$ mice, 2 slices per animal. **b** Exemplary fEPSP traces during baseline (light line) and 30–60 min after LTP induction (dark line). **c** Time course of the average slope of elicited fEPSP responses following LTP induction by a tetanic stimulation protocol in hippocampal CA1 synapses after viral injection. Time point 0 represents the delivery of the tetanic stimulation. Slopes of each fEPSP are

normalized by the baseline and plotted against time. **d** Box plots of the average slope response during 30–60 min post LTP induction. HFS high-frequency stimulation. $n = 5$ mice, two slices per animal. **e** Normalized average slope of fEPSP evoked in hippocampal slices from animals injected with the indicated lentivirus. Recordings have been performed in the stratum radiatum of hippocampal CA1 region with electrical stimulation of Schaffer collaterals (see “Methods”). Unpaired t test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Together, our data indicate that a deleterious overexpression of miR-4504 can lead to a decrease in *FERMT2* expression in individuals bearing the rs7143400 minor T allele, which subsequently modulates APP metabolism. Interestingly, similar mechanism has been reported for genetic variants associated with AD risk in APP 3'UTR that regulates APP expression

through miRNA binding [40]. Supporting a link between *FERMT2* and APP metabolism, studies from cohorts of patients have reported an association between variants in *FERMT2* gene and A β in CSF [14] and brain amyloidosis [41].

Here, we propose that *FERMT2* downregulation at the earliest stage of AD would depend in part on (i) the miR-4504

expression, (ii) cerebral cell type (i.e., neurons), and (iii) the presence of the rs7143400 minor T allele (observed in 9% of Caucasians). Unfortunately, it is important to keep in mind that all these constraints will make difficult, if not impossible, to detect such a miRNA-dependent decrease in *FERMT2* mRNA levels. Of note, this point may also underline the limitation of expression databases in deciphering the mechanisms underlying the functional effects of GWAS variants, for they do not allow capturing (even hiding) subtle mechanisms.

In publicly available RNA-seq analyses (Mayo Clinic Brain Bank), an overexpression of *FERMT2* mRNA has been observed in postmortem human temporal cortex of AD patients relative to healthy controls [42]. Even though a small sample size did not allow us to observe such a variation in *FERMT2* mRNA levels, we nevertheless detected an increase in *FERMT2* protein levels as a function of Braak stage, especially at later stages (Supplementary Fig. 8). This point is of particular importance since in the Genotype-Tissue Expression Database [43], *FERMT2* variants associated with an increase in AD risk at the genome-wide significance level are also part of an expression quantitative trait locus, significantly associated with decreased brain expression of *FERMT2* mRNA (sentinel variant in GWAS rs17125924; -18% ; p value = 2×10^{-6}). Altogether, these results strongly support the notion that *FERMT2* downregulation is deleterious at the earliest stages of the disease, whereas *FERMT2* overexpression may occur as a pathological consequence at a later stage. In this context, it would be of interest to further investigate the impact of *FERMT2* downregulation in vivo. Since the loss of *FERMT2* in mice results in embryonic lethality at E7.5 [44], a dedicated mouse model should be developed that allows conditional *FERMT2* knockout in neurons. This model would then be crossed with AD-like mouse models to assess behavioral and AD-associated phenotypes.

In conclusion, we propose that *FERMT2* underexpression through miRNAs and/or genetic regulation leads to synaptic dysfunction in an APP-dependent manner. Our hypothesis may thus call for new therapeutic approaches in AD targeting *FERMT2* and/or APP function.

Acknowledgements FE benefited from a doctoral grant co-funded by Hauts-de-France Regional Council and Institut Pasteur de Lille. The authors thank the BICeL and EquipEx ImagInEx HCS platforms of the Institut Pasteur de Lille and Alexandre Vandeputte for technical assistance. The authors thank Karine Blary at the IEMN Lille for the microfabrication work. This work was partly supported by the French RENATECH network. This study was funded by INSERM, Institut Pasteur de Lille, the Centres of Excellence in Neurodegeneration—ANR program (CoEN, GWAS in AD: focus on microRNA), the Canadian Institute of Health Research (CHIR), la Fondation Alzheimer (Syn-Alz), the EU Joint Programme—Neurodegenerative Diseases Research (JPND, 3DMiniBrain), and Fondation Vaincre Alzheimer (FR-17006p). This work was also funded by the Lille Métropole Communauté Urbaine and the French government's LABEX DIS-TALZ program (development of innovative strategies for a

transdisciplinary approach to Alzheimer's disease). This work was supported for MH by Academy of Finland (Grant Number 307866), Signé Jusélius Foundation, and the Strategic Neuroscience Funding of the University of Eastern Finland. The authors thank the vectorology platform Transbiomed for lentivirus production.

Author contributions J-CL and JC designed and supervised research. AF, FE, FC, and CB performed APP metabolism and *FERMT2*/APP interaction analyses. XH developed the in silico model for *FERMT2*/APP interaction. FE and DK performed and analyzed axon-growth experiments. AC, AF, JD, and JC developed Crispr/Cas9 model and/or performed subsequent analyses. CD, A-CV, AF, and BG-B designed and/or performed miRNA screening and/or statistical analyses. SH and MF performed and analyzed electrophysiology experiments. AF, TM, FD, and SD performed primary neuronal cultures. MM, MT, IP, and MH analyzed transcriptomic and/or proteomic data of *FERMT2* expression in brains. EB and SSH performed miR expression quantification in brains. FE, NM, DK, and JC participated in image acquisition and analyses of APP/*FERMT2* interaction and/or synapse density. FE, PA, JD, DK, J-CL, and JC wrote and/or revised the paper.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest SH and MF are full-time employees of E-Physiology SA. CD has been an employee of Janssen Pharmaceutica since her departure from the laboratory Inserm U1167 in 2016.

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

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

References

1. Checler F. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1995;65:1431–44.
2. Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 1997;20:154–9.
3. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297:353–6.
4. Morris GP, Clark IA, Vissel B. Questions concerning the role of amyloid- β in the definition, aetiology and diagnosis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2018;136:663–89.
5. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 2012;488:96–9.
6. Nicolas G, Charbonnier C, Wallon D, Quenez O, Bellenguez C, Grenier-Boley B, et al. SORL1 rare variants: a major risk factor for familial early-onset Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2016;21:831–6.

7. Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, et al. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:13461–6.
8. Raghavan N, Tosto G. Genetics of Alzheimer's disease: the importance of polygenic and epistatic components. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017;17:78.
9. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2009;63:287–303.
10. Jay TR, Hirsch AM, Broihier ML, Miller CM, Neilson LE, Ransohoff RM, et al. Disease progression-dependent effects of TREM2 deficiency in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2017;37:637–47.
11. Jansen IE, Savage JE, Watanabe K, Bryois J, Williams DM, Steinberg S, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat Genet*. 2019;51:404–13.
12. Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC, et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet*. 2019;51:414–30.
13. Dourlen P, Kilinc D, Malmanche N, Chapuis J, Lambert J-C. The new genetic landscape of Alzheimer's disease: from amyloid cascade to genetically driven synaptic failure hypothesis? *Acta Neuropathol*. 2019;138:221–36.
14. Chapuis J, Flaig A, Grenier-Boley B, Eysert F, Pottiez V, Deloison G, et al. Genome-wide, high-content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor *FERMT2* as a major modulator of APP metabolism. *Acta Neuropathol*. 2017;133:955–66.
15. Theodosiou M, Widmaier M, Böttcher RT, Rognoni E, Veelders M, Bharadwaj M, et al. Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *Elife*. 2016;5:e10130.
16. Dowling JJ, Gibbs E, Russell M, Goldman D, Minarcik J, Golden JA, et al. Kindlin-2 is an essential component of intercalated discs and is required for vertebrate cardiac structure and function. *Circ Res*. 2008;102:423–31.
17. Shen Z, Ye Y, Dong L, Vainionpää S, Mustonen H, Puolakkainen P, et al. Kindlin-2: a novel adhesion protein related to tumor invasion, lymph node metastasis, and patient outcome in gastric cancer. *Am J Surg*. 2012;203:222–9.
18. Zhan J, Zhu X, Guo Y, Wang YY, Wang YY, Qiang G, et al. Opposite role of kindlin-1 and kindlin-2 in lung cancers. *PLoS ONE*. 2012;7:1–12.
19. Sossey-Alaoui K, Pluskota E, Szpak D, Plow EF. The Kindlin2-p53-SerpinB2 signaling axis is required for cellular senescence in breast cancer. *Cell Death Dis*. 2019;10:539.
20. Blasiak A, Lee GU, Kilinc D. Neuron subpopulations with different elongation rates and DCC dynamics exhibit distinct responses to isolated Netrin-1 treatment. *ACS Chem Neurosci*. 2015;6:1578–90.
21. Kaech S, Banker G. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*. 2006;1:2406–15.
22. Smith PY, Delay C, Girard J, Papon M-A, Planel E, Sergeant N, et al. MicroRNA-132 loss is associated with tau exon 10 inclusion in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet*. 2011;20:4016–24.
23. Sevalle J, Amoyel A, Robert P, Fournié-Zaluski M-C, Roques B, Checler F. Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. *J Neurochem*. 2009;109:248–56.
24. Meijering E, Dzyubachyk O, Smal I. Methods for cell and particle tracking. *Methods Enzymol*. 2012;504:183–200.
25. Frandemiche ML, De Seranno S, Rush T, Borel E, Elie A, Arnal I, et al. Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-Beta oligomers. *J Neurosci*. 2014;34:6084–97.
26. Kilinc D, Vreulx A-C, Mendes T, Flaig A, Marques-Coelho D, Verschoore M, et al. Pyk2 overexpression in postsynaptic neurons blocks amyloid β 1-42-induced synaptotoxicity in microfluidic cocultures. *Brain Commun*. 2020. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa139>.
27. Delay C, Grenier-Boley B, Amoyel P, Dumont J, Lambert J-C. miRNA-dependent target regulation: functional characterization of single-nucleotide polymorphisms identified in genome-wide association studies of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2016;8:20.
28. Sannerud R, Declerck I, Peric A, Raemaekers T, Menendez G, Zhou L, et al. ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:E559–68.
29. Soldano A, Hassan BA. Beyond pathology: APP, brain development and Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2014;27:61–7.
30. Sosa LJ, Bergman J, Estrada-Bernal A, Glorioso TJ, Kittelson JM, Pfenninger KH. Amyloid precursor protein is an autonomous growth cone adhesion molecule engaged in contact guidance. *PLoS ONE*. 2013;8:e64521.
31. Ma Y-Q, Qin J, Wu C, Plow EF. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins. *J Cell Biol*. 2008;181:439–46.
32. Li H, Deng Y, Sun K, Yang H, Liu J, Wang M, et al. Structural basis of kindlin-mediated integrin recognition and activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703064114>.
33. Taylor AM, Dieterich DC, Ito HT, Kim SA, Schuman EM. Microfluidic local perfusion chambers for the visualization and manipulation of synapses. *Neuron*. 2010;66:57–68.
34. Gebhardt C, Mosienko V, Alenina N, Albrecht D. Priming of LTP in amygdala and hippocampus by prior paired pulse facilitation paradigm in mice lacking brain serotonin. *Hippocampus*. 2019;29:610–8.
35. Hotulainen P, Hoogenraad CC. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol*. 2010;189:619–29.
36. Weingarten J, Weingarten M, Wegner M, Volkmandt W. APP-A novel player within the presynaptic active zone proteome. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:43.
37. Barthet G, Mülle C. Presynaptic failure in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2020;194:101801.
38. Stahl R, Schilling S, Soba P, Rupp C, Hartmann T, Wagner K, et al. Shedding of APP limits its synaptogenic activity and cell adhesion properties. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:410.
39. Klevanski M, Herrmann U, Weyer SW, Fol R, Cartier N, Wolfer DP, et al. The APP intracellular domain is required for normal synaptic morphology, synaptic plasticity, and hippocampus-dependent behavior. *J Neurosci*. 2015;35:16018–33.
40. Nicolas G, Wallon D, Goupil C, Richard A-C, Pottier C, Dorval V, et al. Mutation in the 3' untranslated region of APP as a genetic determinant of cerebral amyloid angiopathy. *Eur J Hum Genet*. 2016;24:92–8.
41. Apostolova LG, Risacher SL, Duran T, Stage EC, Goukasian N, West JD, et al. Associations of the top 20 Alzheimer disease risk variants with brain amyloidosis. *JAMA Neurol*. 2018;75:328.
42. Sullivan SE, Liao M, Smith RV, White C, Lagomarsino VN, Xu J, et al. Candidate-based screening via gene modulation in human neurons and astrocytes implicates *FERMT2* in A β and TAU proteostasis. *Hum Mol Genet*. 2018. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy376>.
43. GTEx Consortium KG, Deluca DS, Segre AV, Sullivan TJ, Young TR, Gelfand ET, et al. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science*. 2015;348:648–60.
44. Dowling JJ, Vreede AP, Kim S, Golden J, Feldman EL. Kindlin-2 is required for myocyte elongation and is essential for myogenesis. *BMC Cell Biol*. 2008;9:36.

1 **Supplementary Methods**

2 **High-content miRNA screening**

3 The miRNA library (2,555 miRNA mimics, mirVana™ library, Ambion, Austin, TX) was screened in
4 HEK293 cells stably over-expressing mCherry-APP695^{wt}-YFP (**Supplementary Fig. 2**) according to a
5 previous protocol [1]. Briefly, each miRNA (50 nM) was first transferred to 384-well with D-PBS
6 containing 0.1 µl of Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies). Then approximately 3,000
7 HEK293-mCherry-APP695wt-YFP cells were distributed in each well and incubated for 3 d at 37°C.
8 After removal of the cell medium and Hoechst staining, cells were fixed using 10% formalin before
9 image acquisition using an InCell Analyser 6000 (GE Healthcare, Chicago, IL) high-resolution
10 automated confocal microscope.

11 A customized image analysis software (Columbus 2.7; PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France) was
12 used for the image analysis and quantification as reported previously [1]. The mean fluorescence
13 intensity of each signal was normalized with the fold change induced by the non-targeting miRNA in
14 the same plate. To evaluate the impact of each miRNA, an average of 1,000 cells were analyzed per
15 run (n = 3). For quality control, we used strictly standardized mean difference with β -score > 3 based
16 on two separate controls (siRNA-APP and miR-NT, **Supplementary Fig. 2**).

17 ***In silico* prediction of miRNA targets and functions**

18 Seven publicly-available algorithms were used for the prediction of miRNA-targeted genes in the
19 brain: DIANA-microT-CDS (v5.0, r21) [2], MiRanda (August 2010 release) [3], mirDB (v5.0) [4],
20 miRTarBase (v6.1) [5], rna22 (v2.0) [6], TargetMiner (May 2012 release) [7], and TargetScan (v7.1)
21 [8]. In order to minimize false-positive predictions, miRNA-targeted genes were defined as genes
22 predicted by at least 4 out of the 7 algorithms used (**Supplementary Table 2**). To predict the
23 function(s) of miRNAs that target these genes, pathway enrichment analysis was performed using
24 DIANA Tools mirPath (v3.0) [9]. Pathway analysis of targeted genes was performed using KEGG
25 PATHWAY Database.

26 **Human brain samples for FERMT2 expression (mRNA and protein)**

27 The neuropathological cohort consists of *post-mortem* temporal cortical brain samples from 71
28 individuals. A detailed description of cohort validation and sample and data processing are described
29 in [10]. Briefly, at autopsy, assessment of the extent of AD-related neurofibrillary pathology was
30 performed by immunostaining of paraffin sections with the AT8 antibody (Thermo Fisher Scientific,
31 RRID:AB_223647), detecting hyperphosphorylated tau [11]. The cohort was divided into seven
32 disease severity stages based on Braak staging: Braak stages 0-VI. 60 of the 71 samples underwent
33 microarray analysis and 36 proteomic analysis, with a total of 25 samples undergoing both microarray
34 and proteomic analysis. The study was approved by the Ethics Committee of Kuopio University
35 Hospital, University of Eastern Finland, the Finnish National Supervisory Authority, and the Finnish
36 Ministry of Social Affairs and Health (License number 362/06.01.03.01/2017)

37

38 **References:**

- 39 1. Chapuis J, Flaig A, Grenier-Boley B, Eysert F, Pottiez V, Deloison G, et al. Genome-wide,
40 high-content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 as a
41 major modulator of APP metabolism. *Acta Neuropathol.* 2017;133:955–966.

- 42 2. Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, et al.
43 DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis
44 workflows. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:W169–W173.
- 45 3. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets.
46 *PLoS Biol.* 2004;2:e363.
- 47 4. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional
48 annotations. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:D146–D152.
- 49 5. Hsu S-D, Lin F-M, Wu W-Y, Liang C, Huang W-C, Chan W-L, et al. miRTarBase: a database
50 curates experimentally validated microRNA–target interactions. *Nucleic Acids Res.*
51 2011;39:D163–D169.
- 52 6. Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang Y-S, Tam W-L, Thomson AM, et al. A pattern-based
53 method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding
54 heteroduplexes. *Cell.* 2006;126:1203–1217.
- 55 7. Bandyopadhyay S, Mitra R. TargetMiner: microRNA target prediction with systematic
56 identification of tissue-specific negative examples. *Bioinformatics.* 2009;25:2625–2631.
- 57 8. Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in
58 mammalian mRNAs. *Elife.* 2015;4.
- 59 9. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, et
60 al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic
61 Acids Res.* 2015;43:W460–W466.
- 62 10. Martinen M, Paananen J, Neme A, Mitra V, Takalo M, Natunen T, et al. A multiomic
63 approach to characterize the temporal sequence in Alzheimer’s disease-related pathology.
64 *Neurobiol Dis.* 2019;124:454–468.
- 65 11. Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K. Staging of Alzheimer
66 disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry.
67 *Acta Neuropathol.* 2006;112:389–404.

68

69

70

71 **Supplementary Table 1.**

72 Characteristics of human cohort used for miRNA quantification in human brain samples

Characteristics	Ctrl	AD
n	30	52
Male %	67.74	50.98
Mean age of death	74.86	78.34
Post-mortem delay (hours)	16.28	17.65
Braak score I/II/III/IV/V/VI	4/3/0/0/0/0	0/0/10/13/14/15

73

74

75 **Supplementary Table 2.** Variation of YFP and mCherry signals (Log2 of fold change) for the best
76 miRNA hits exhibiting the strongest variations. A β secretion was also quantified in medium. SD:
77 standard deviation. ND: Not detected.

miRNA	Refseq	YFP (Log2)		mCherry (Log2)		A β_{1-x}	
		Mean Fold_change	SD	Mean Fold_change	SD	Mean Fold_change	SD
hsa-miR-1343-3p	MIMAT0019776	-0,788	0,051	-1,061	0,133	ND	-
hsa-miR-16-1-3p	MIMAT0004489	1,018	0,067	1,242	0,051	5,218	1,596
hsa-miR-181b-3p	MIMAT0022692	-0,727	0,254	-1,250	0,402	0,940	0,236
hsa-miR-190a-3p	MIMAT0026482	-0,800	0,150	-1,075	0,172	1,261	0,046
hsa-miR-193a-3p	MIMAT0000459	1,353	0,209	1,153	0,054	13,186	0,159
hsa-miR-193b-3p	MIMAT0002819	1,662	0,104	1,292	0,129	3,975	0,113
hsa-miR-194-3p	MIMAT0004671	-1,091	0,239	-1,595	0,037	1,263	0,268
hsa-miR-200b-3p	MIMAT0000318	1,151	0,181	1,205	0,103	0,901	0,151
hsa-miR-2115-5p	MIMAT0011158	1,574	0,151	1,270	0,326	ND	-
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	1,238	0,328	1,083	0,192	0,559	0,007
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	1,391	0,361	1,180	0,260	4,392	0,286
hsa-miR-3160-3p	MIMAT0015034	1,675	0,285	1,457	0,228	2,549	0,434
hsa-miR-3160-5p	MIMAT0019212	1,465	0,169	1,509	0,163	ND	-
hsa-miR-3179	MIMAT0015056	0,805	0,386	1,101	0,069	0,761	0,078
hsa-miR-3188	MIMAT0015070	-0,779	0,064	-1,066	0,083	2,385	0,427
hsa-miR-32-3p	MIMAT0004505	-0,864	0,203	-1,249	0,082	0,496	0,042
hsa-miR-3529-5p	MIMAT0019828	-1,064	0,154	-0,932	0,050	-0,048	0,105
hsa-miR-3616-5p	MIMAT0017995	2,284	0,400	1,463	0,016	ND	-
hsa-miR-3663-3p	MIMAT0018085	0,969	0,470	1,166	0,153	ND	-
hsa-miR-3668	MIMAT0018091	-0,567	0,260	-0,976	0,082	ND	-
hsa-miR-3977	MIMAT0019362	1,285	0,793	0,967	0,668	ND	-
hsa-miR-4429	MIMAT0018944	1,172	0,233	1,050	0,193	ND	-
hsa-miR-4477a	MIMAT0019004	-0,354	0,172	-1,975	1,370	ND	-
hsa-miR-4773	MIMAT0019928	1,819	0,274	1,540	0,163	11,263	0,477
hsa-miR-488-5p	MIMAT0002804	-0,927	0,243	-1,137	0,071	0,120	0,077
hsa-miR-506-3p	MIMAT0002878	-0,988	0,310	-1,015	0,124	0,584	0,053
hsa-miR-511-3p	MIMAT0026606	-0,778	0,164	-1,077	0,204	ND	-
hsa-miR-513c-3p	MIMAT0022728	-0,833	0,041	-1,097	0,081	ND	-
hsa-miR-5193	MIMAT0021124	-0,991	0,042	-1,145	0,116	0,012	-0,110
hsa-miR-5579-5p	MIMAT0022269	-0,983	0,119	-0,953	0,325	ND	-
hsa-miR-5582-5p	MIMAT0022279	-0,709	0,061	-1,047	0,135	0,267	0,025
hsa-miR-582-5p	MIMAT0003247	0,865	0,058	1,043	0,443	2,714	0,004
hsa-miR-6783-3p	MIMAT0027467	-0,866	0,149	-1,141	0,085	0,414	0,290
hsa-miR-6884-5p	MIMAT0027668	-0,769	0,207	-1,042	0,178	0,592	0,088
hsa-miR-7151-3p	MIMAT0028213	1,772	0,197	1,545	0,070	5,990	0,109
hsa-miR-7160-3p	MIMAT0028231	0,904	0,116	1,208	0,084	5,140	0,542
hsa-miR-7160-5p	MIMAT0028230	1,120	0,257	1,134	0,167	0,414	0,290
hsa-miR-7-5p	MIMAT0000252	-0,819	0,014	-1,027	0,102	9,913	0,501
hsa-miR-761	MIMAT0010364	-0,994	0,246	-1,010	0,424	1,568	0,048
hsa-miR-888-3p	MIMAT0004917	1,197	0,508	1,514	0,195	ND	-
hsa-miR-892b	MIMAT0004918	1,084	0,319	1,015	0,460	ND	-

78
79

80 **Supplementary Table 3.** List of 180 genes targeted by 41 miRNAs that modulate APP metabolism
81 (see Supplementary Table 2 and [1] for the list of miRNAs). Software predicted the same targeted
82 genes are also reported.

miRNA	MIMAT	Gene_ID	Gene_name	Soft_DB
hsa-miR-1343-3p	MIMAT0019776	89796	NAV1	microt_cds,mirdb,mirtarbase,targetscan
hsa-miR-16-1-3p	MIMAT0004489	2247	FGF2	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		3895	KTN1	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		5935	RBM3	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		9662	CEP135	microt_cds,miranda,mirdb,rna22,targetscan
		10137	RBM12	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		10352	WARS2	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		51496	CTDSPL2	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		51719	CAB39	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-181b-3p	MIMAT0022692	55608	ANKRD10	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		867	CBL	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		2908	NR3C1	microt_cds,mirdb,rna22,targetminer,targetscan
		23291	FBXW11	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-190a-3p	MIMAT0026482	26054	SENP6	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		1316	KLF6	microt_cds,mirdb,mirtarbase,targetscan
		2908	NR3C1	microt_cds,mirdb,mirtarbase,targetscan
		5504	PPP1R2	microt_cds,mirdb,mirtarbase,targetscan
		6801	STRN	microt_cds,mirdb,mirtarbase,targetscan
		7994	KAT6A	microt_cds,mirdb,mirtarbase,targetscan
		8453	CUL2	microt_cds,mirdb,mirtarbase,targetscan
		51454	GULP1	microt_cds,mirdb,mirtarbase,targetscan
		54764	ZRANB1	microt_cds,mirdb,mirtarbase,targetscan
		57551	TAOK1	microt_cds,mirdb,mirtarbase,targetscan
hsa-miR-193a-3p	MIMAT0000459	129684	CNTNAP5	microt_cds,mirdb,mirtarbase,targetscan
		2843	GPR20	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		6477	SIAH1	microt_cds,miranda,mirdb,rna22,targetscan
		10220	GDF11	microt_cds,miranda,mirdb,mirtarbase,targetscan
		51496	CTDSPL2	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		51719	CAB39	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-193b-3p	MIMAT0002819	65108	MARCKSL1	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		2843	GPR20	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		6477	SIAH1	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		10220	GDF11	microt_cds,miranda,mirdb,mirtarbase,targetscan
		51496	CTDSPL2	microt_cds,miranda,mirdb,mirtarbase,targetminer,targetscan
		51719	CAB39	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		57190	SELENON	miranda,mirdb,mirtarbase,targetscan
hsa-miR-194-3p	MIMAT0004671	65108	MARCKSL1	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		5829	PXN	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		10057	ABCC5	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		10439	OLFM1	miranda,mirdb,targetminer,targetscan

		79183	TTPAL	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
		89796	NAV1	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		90161	HS6ST2	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		91452	ACBD5	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		143384	CACUL1	microt_cds,miranda,rna22,targetminer,targetscan
		146691	TOM1L2	mirdb,rna22,targetminer,targetscan
hsa-miR-200b-3p	MIMAT0000318	3930	LBR	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		4884	NPTX1	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		4908	NTF3	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		6405	SEMA3F	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		6477	SIAH1	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		7093	TLL2	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		7532	YWHAG	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		10777	ARPP21	microt_cds,miranda,mirdb,rna22,targetscan
		10979	FERMT2	microt_cds,miranda,mirtarbase,targetscan
		11183	MAP4K5	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		22841	RAB11FIP2	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		23328	SASH1	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		23362	PSD3	mirdb,mirtarbase,targetminer,targetscan
		51496	CTDSPL2	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		51719	CAB39	miranda,mirdb,mirtarbase,targetscan
		57826	RAP2C	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
284695	ZNF326	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan		
hsa-miR-2115-5p	MIMAT0011158	2196	FAT2	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		9228	DLGAP2	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		11108	PRDM4	microt_cds,miranda,rna22,targetscan
		22992	KDM2A	microt_cds,miranda,rna22,targetscan
		51060	TXNDC12	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		89797	NAV2	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		117177	RAB3IP	miranda,mirtarbase,targetminer,targetscan
		219899	TBCEL	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	405	ARNT	microt_cds,mirdb,mirtarbase,rna22,targetminer,targetscan
		4908	NTF3	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		6096	RORB	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		7532	YWHAG	microt_cds,miranda,mirdb,rna22,targetscan
		9019	MPZL1	microt_cds,miranda,rna22,targetscan
		10979	FERMT2	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		25874	MPC2	microt_cds,miranda,rna22,targetscan
		360023	ZBTB41	miranda,mirdb,rna22,targetscan
hsa-miR-222-3p	MIMAT0000279	405	ARNT	microt_cds,mirdb,rna22,targetminer,targetscan
		4908	NTF3	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		6096	RORB	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		7532	YWHAG	microt_cds,miranda,mirdb,mirtarbase,rna22,targetscan
		9019	MPZL1	microt_cds,miranda,rna22,targetscan

		10979	FERMT2	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		56977	STOX2	miranda,mirtarbase,rna22,targetscan
hsa-miR-3160-3p	MIMAT0015034	3213	HOXB3	microt_cds,miranda,rna22,targetscan
		10777	ARPP21	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		23087	TRIM35	miranda,mirdb,rna22,targetscan
		23299	BICD2	mirtarbase,rna22,targetminer,targetscan
		26468	LHX6	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		55219	TMEM57	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-3160-5p	MIMAT0019212	5087	PBX1	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
		23299	BICD2	microt_cds,rna22,targetminer,targetscan
		23328	SASH1	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
hsa-miR-3179	MIMAT0015056	3202	HOXA5	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		3219	HOXB9	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		5087	PBX1	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		6405	SEMA3F	miranda,mirtarbase,rna22,targetminer,targetscan
		6844	VAMP2	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		10509	SEMA4B	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		22992	KDM2A	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		57523	NYNRIN	microt_cds,miranda,mirdb,rna22,targetscan
		64855	FAM129B	miranda,mirtarbase,targetminer,targetscan
		80320	SP6	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		81566	CSRNP2	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		81605	URM1	microt_cds,miranda,mirdb,mirtarbase,targetminer,targetscan
		89797	NAV2	miranda,mirtarbase,targetminer,targetscan
		92126	DSEL	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		286046	XKR6	microt_cds,miranda,mirdb,rna22,targetminer,targetscan
hsa-miR-3188	MIMAT0015070	215	ABCD1	microt_cds,miranda,mirdb,rna22
		1910	EDNRB	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		5830	PEX5	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		7994	KAT6A	microt_cds,miranda,rna22,targetminer,targetscan
		8994	LIMD1	microt_cds,rna22,targetminer,targetscan
		11261	CHP1	microt_cds,mirdb,rna22,targetminer,targetscan
		25963	TMEM87A	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		51804	SIX4	miranda,mirdb,rna22,targetminer,targetscan
		56111	PCDHGA4	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		56112	PCDHGA3	microt_cds,miranda,mirdb,rna22,targetminer,targetscan
		56255	TMX4	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		57337	SENP7	microt_cds,miranda,mirdb,rna22,targetminer,targetscan
		57551	TAOK1	microt_cds,miranda,rna22,targetminer,targetscan
		79183	TTPAL	mirdb,rna22,targetminer,targetscan
		79668	PARP8	microt_cds,rna22,targetminer,targetscan
399664	MEX3D	microt_cds,miranda,rna22,targetscan		
hsa-miR-32-3p	MIMAT0004505	36	ACADSB	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		6648	SOD2	microt_cds,miranda,rna22,targetscan

		7994	KAT6A	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		10371	SEMA3A	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		23291	FBXW11	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		26054	SENP6	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		51454	GULP1	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		51804	SIX4	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		55432	YOD1	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		57337	SENP7	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		66008	TRAK2	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		79183	TTPAL	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		81034	SLC25A32	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		90161	HS6ST2	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		91452	ACBD5	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		116931	MED12L	microt_cds,miranda,mirtarbase,targetscan
		117178	SSX2IP	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		137970	UNC5D	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		346007	EYS	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
hsa-miR-3529-5p	MIMAT0019828	10371	SEMA3A	mirdb,rna22,targetminer,targetscan
		80267	EDEM3	mirdb,mirtarbase,rna22,targetminer,targetscan
		285636	C5orf51	microt_cds,mirtarbase,targetminer,targetscan
hsa-miR-3616-5p	MIMAT0017995	23362	PSD3	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		92126	DSEL	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		339745	SPOPL	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-3663-3p	MIMAT0018085	4826	NNAT	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		51496	CTDSPL2	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-3668	MIMAT0018091	577	ADGRB3	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		8453	CUL2	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		10971	YWHAQ	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		25963	TMEM87A	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-3977	MIMAT0019362	22841	RAB11FIP2	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-4429	MIMAT0018944	2045	EPHA7	microt_cds,rna22,targetminer,targetscan
		3664	IRF6	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		9053	MAP7	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		22841	RAB11FIP2	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		23328	SASH1	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		26036	ZNF451	mirtarbase,rna22,targetminer,targetscan
		80014	WWC2	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		117177	RAB3IP	microt_cds,rna22,targetminer,targetscan
		339745	SPOPL	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		388531	RG59BP	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-4477a	MIMAT0019004	23291	FBXW11	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		80267	EDEM3	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		399664	MEX3D	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-4773	MIMAT0019928	2334	AFF2	microt_cds,mirtarbase,targetminer,targetscan
		3358	HTR2C	microt_cds,mirdb,rna22,targetminer,targetscan

		4152	MBD1	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		9880	ZBTB39	microt_cds,mirdb,mirtarbase,targetminer,targetscan
		10180	RBM6	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		23328	SASH1	microt_cds,mirdb,mirtarbase,rna22,targetminer,targetscan
hsa-miR-488-5p	MIMAT0002804	36	ACADSB	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		1910	EDNRB	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		2908	NR3C1	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		3597	IL13RA1	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		10564	ARFGEF2	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-506-3p	MIMAT0002878	867	CBL	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		1316	KLF6	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		1910	EDNRB	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		2029	ENSA	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		2892	GRIA3	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer
		2908	NR3C1	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		3688	ITGB1	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer
		6648	SOD2	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		6744	SSFA2	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		8715	NOL4	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		8994	LIMD1	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		9697	TRAM2	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		10564	ARFGEF2	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		10788	IQGAP2	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		11261	CHP1	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		51804	SIX4	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		58533	SNX6	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		83871	RAB34	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		89796	NAV1	microt_cds,rna22,targetminer,targetscan
		137970	UNC5D	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
143384	CACUL1	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan		
hsa-miR-511-3p	MIMAT0026606	10371	SEMA3A	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
hsa-miR-513c-3p	MIMAT0022728	2908	NR3C1	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		7994	KAT6A	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		10484	SEC23A	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		64786	TBC1D15	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		127428	TCEANC2	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		137970	UNC5D	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-5193	MIMAT0021124	59271	EVA1C	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
		89796	NAV1	microt_cds,mirdb,mirtarbase,rna22,targetminer,targetscan
hsa-miR-5579-5p	MIMAT0022269	10371	SEMA3A	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		23429	RYBP	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-5582-5p	MIMAT0022279	867	CBL	microt_cds,mirdb,rna22,targetminer,targetscan
		2908	NR3C1	microt_cds,mirtarbase,targetminer,targetscan
		3688	ITGB1	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan

		5504	PPP1R2	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		10788	IQGAP2	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		11261	CHP1	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		23291	FBXW11	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		51804	SIX4	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		57658	CALCOCO1	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		137970	UNCSD	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		143384	CACUL1	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-582-5p	MIMAT0003247	2247	FGF2	microt_cds,miranda,mirtarbase,targetminer,targetscan
		10979	FERMT2	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		23299	BICD2	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		23362	PSD3	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		51060	TXNDC12	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		57826	RAP2C	microt_cds,miranda,mirtarbase,targetminer,targetscan
		80790	CMIP	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		81566	CSRNP2	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		151742	PPM1L	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		222171	PRR15	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		360023	ZBTB41	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-6783-3p	MIMAT0027467	867	CBL	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
		84448	ABLIM2	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
		89796	NAV1	microt_cds,mirdb,mirtarbase,rna22,targetscan
		148254	ZNF555	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
		376267	RAB15	microt_cds,mirtarbase,rna22,targetscan
hsa-miR-6884-5p	MIMAT0027668	414	ARSD	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
		11261	CHP1	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
		57551	TAOK1	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
		79668	PARP8	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
		89796	NAV1	microt_cds,mirdb,mirtarbase,rna22,targetscan
		90594	ZNF439	microt_cds,mirtarbase,rna22,targetscan
		129685	TAF8	microt_cds,mirtarbase,rna22,targetscan
		220074	LRTOMT	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
245972	ATP6V0D2	microt_cds,mirdb,mirtarbase,targetscan		
hsa-miR-7-5p	MIMAT0000252	142	PARP1	microt_cds,miranda,mirdb,mirtarbase,targetscan
		867	CBL	microt_cds,mirdb,rna22,targetminer,targetscan
		2029	ENSA	miranda,mirtarbase,rna22,targetminer,targetscan
		2768	GNA12	microt_cds,miranda,rna22,targetminer,targetscan
		6500	SKP1	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		6536	SLC6A9	microt_cds,miranda,mirdb,mirtarbase,targetscan
		8994	LIMD1	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		9697	TRAM2	microt_cds,mirtarbase,targetminer,targetscan
		11261	CHP1	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		23211	ZC3H4	microt_cds,miranda,mirdb,mirtarbase,targetscan
		54107	POLE3	microt_cds,miranda,mirtarbase,targetscan
		55432	YOD1	miranda,mirtarbase,targetminer,targetscan

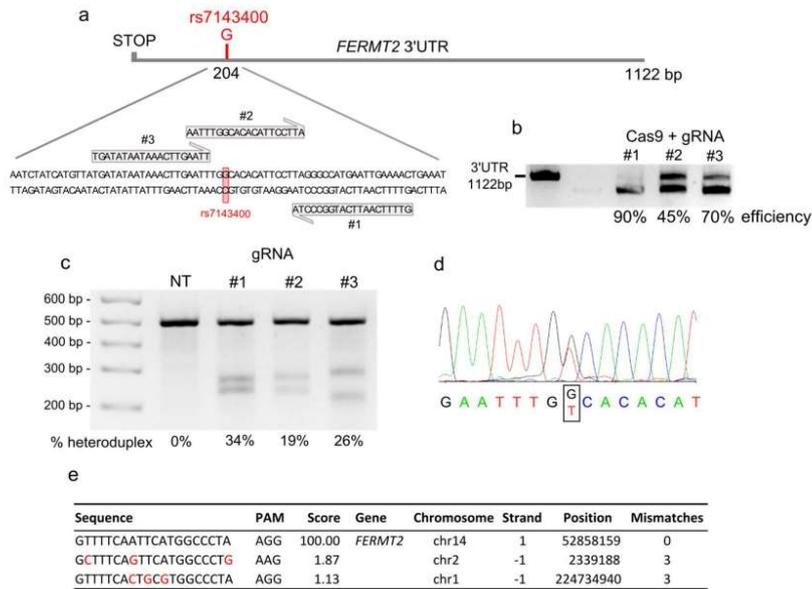
		55591	VEZT	microt_cds,miranda,rna22,targetscan
		56255	TMX4	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		89796	NAV1	miranda,mirtarbase,targetminer,targetscan
		91452	ACBD5	microt_cds,rna22,targetminer,targetscan
		129685	TAF8	microt_cds,miranda,mirtarbase,rna22,targetscan
		134353	LSM11	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
hsa-miR-7151-3p	MIMAT0028213	54751	FBLIM1	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
hsa-miR-7160-3p	MIMAT0028231	84957	RELT	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
hsa-miR-7160-5p	MIMAT0028230	4293	MAP3K9	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
		10350	ABCA9	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
		23299	BICD2	mirdb,mirtarbase,rna22,targetscan
		57002	YAE1D1	microt_cds,mirdb,rna22,targetscan
hsa-miR-761	MIMAT0010364	867	CBL	microt_cds,mirdb,targetminer,targetscan
		1106	CHD2	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		2909	ARHGAP35	microt_cds,mirdb,rna22,targetminer,targetscan
		5076	PAX2	microt_cds,rna22,targetminer,targetscan
		5332	PLCB4	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		5338	PLD2	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		9543	IGDCC3	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		9832	JAKMIP2	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		10057	ABCC5	microt_cds,miranda,mirdb,targetminer
		10564	ARFGEF2	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		11261	CHP1	microt_cds,rna22,targetminer,targetscan
		23035	PHLPP2	mirtarbase,rna22,targetminer,targetscan
		23429	RYBP	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		25963	TMEM87A	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		27244	SESN1	microt_cds,miranda,mirdb,rna22,targetminer,targetscan
		55591	VEZT	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		57614	KIAA1468	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		64786	TBC1D15	miranda,rna22,targetminer,targetscan
		80218	NAA50	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		89796	NAV1	microt_cds,rna22,targetminer,targetscan
		117178	SSX2IP	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		134353	LSM11	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		143384	CACUL1	microt_cds,rna22,targetminer,targetscan
196527	ANO6	miranda,mirdb,rna22,targetscan		
376267	RAB15	microt_cds,miranda,rna22,targetminer,targetscan		
hsa-miR-888-3p	MIMAT0004917	3093	UBE2K	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		3202	HOXA5	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		7270	TTF1	microt_cds,miranda,mirdb,targetscan
		7544	ZFY	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
hsa-miR-892b	MIMAT0004918	7544	ZFY	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		7782	SLC30A4	microt_cds,miranda,mirdb,rna22,targetscan
		11183	MAP4K5	miranda,mirdb,targetminer,targetscan
		23299	BICD2	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan

83

		51496	CTDSPL2	microt_cds,miranda,targetminer,targetscan
		51704	GPRC5B	miranda,mirdb,rna22,targetscan
		51780	KDM3B	microt_cds,miranda,rna22,targetscan

12

181



84

85 **Supplementary Fig. 1. CRISPR/Cas9 editing of the HEK293 cell line for rs7143400**

86 **a.** Localization of the predicted gRNAs in the vicinity of the rs7143400. **b.** Assessment of gRNA +
87 recombinant Cas9 complex efficiency for the cleavage using *FERMT2* 3'UTR cDNA. **c.** Assessment
88 of gRNA + Cas9 complex efficiency in HEK293 using T7 endonuclease-based heteroduplex cleavage
89 assay. HEK293 were transfected for 48 h with plasmids allowing Cas9 and gRNA (#1, #2 or #3)
90 expression. **d.** Sanger sequencing showing the edition of a HEK293 clone for the rs7143400. **e.** The
91 list of the potential off-targets predicted for the gRNA#1 (Score > 1 and maximum 3 mismatches). The
92 integrity of the *FERMT2* 3'UTR sequence and the potential off-target sites were validated by
93 sequencing.

94

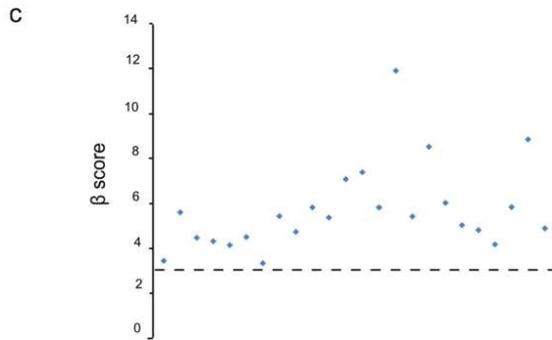
95



b

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

Strictly standardized mean difference (SSMD, denoted as β)



96

97

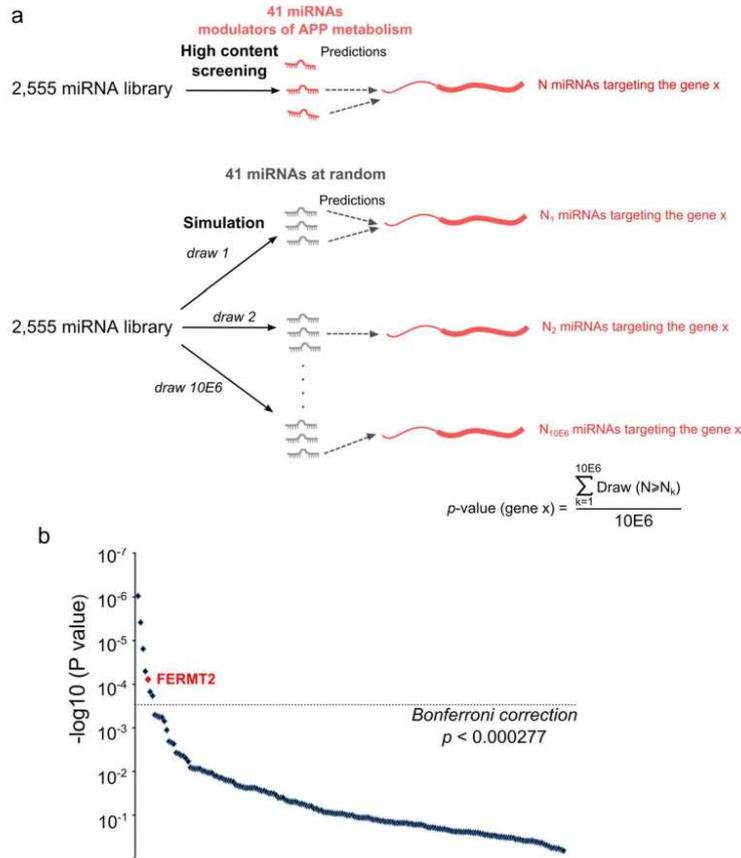
98 **Supplementary Fig. 2. Quality control for the high-content miRNA screening**

99 **a.** Well positions of miRNA and siRNA controls and the miRNA bank on the 384-well plate. The
100 layouts were adjusted to systematically decrease the edge bias by alternating the spatial position of the
101 controls so that they appear equally on each row and each available column. **b.** Formula used for to
102 calculate the SSMD, which is a measure of the strength of the difference between two controls
103 (PSEN1 and APP). μ and σ are the mean and standard deviation of the fluorescence intensity
104 respectively. **c.** Graph showing the distribution of β scores for each plate. Dashed line indicates the
105 quality threshold ($\beta = 3$).

106

107

108



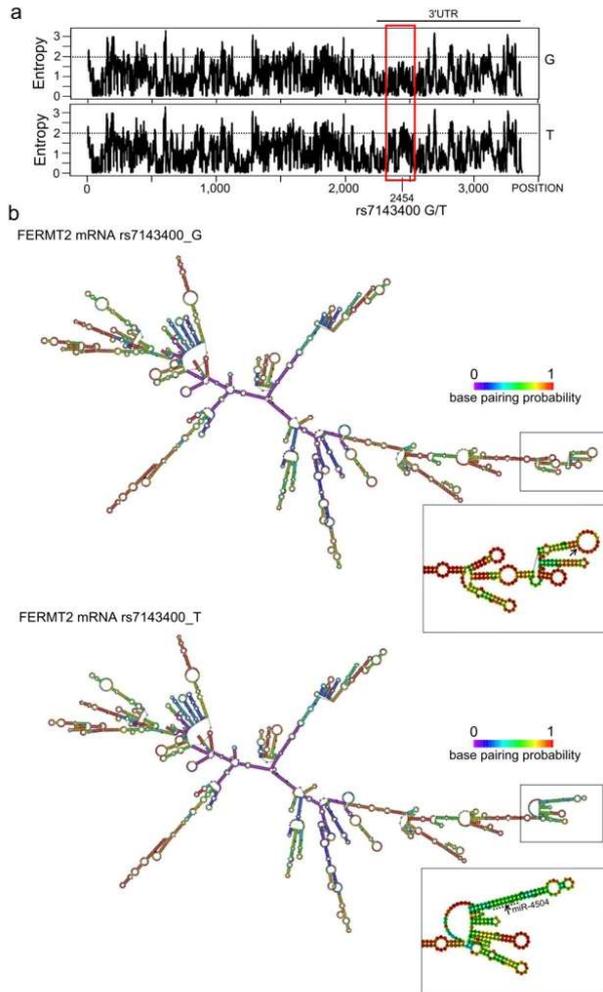
109

110

111 **Supplementary Fig. 3. Workflow to predict miRNA-targeted genes**

112 **a.** A graphical representation of the workflow used to attribute a p -value for each gene targeted by the
113 best 41 miRNAs that are also able to modulate APP metabolism according to our genome-wide high-
114 content siRNA screening (also see **Supplementary Table 2**). **b.** p -value distribution for the 180 genes
115 targeted by the 41 miRNAs identified by HCS (also see **Supplementary Table 3**). In red, genes
116 significantly enriched to be targeted by these 41 miRNAs after Bonferroni correction ($0.05 / 180 =$
117 2.77×10^{-4}) including *FERMT2*, a genetic risk factor of AD.

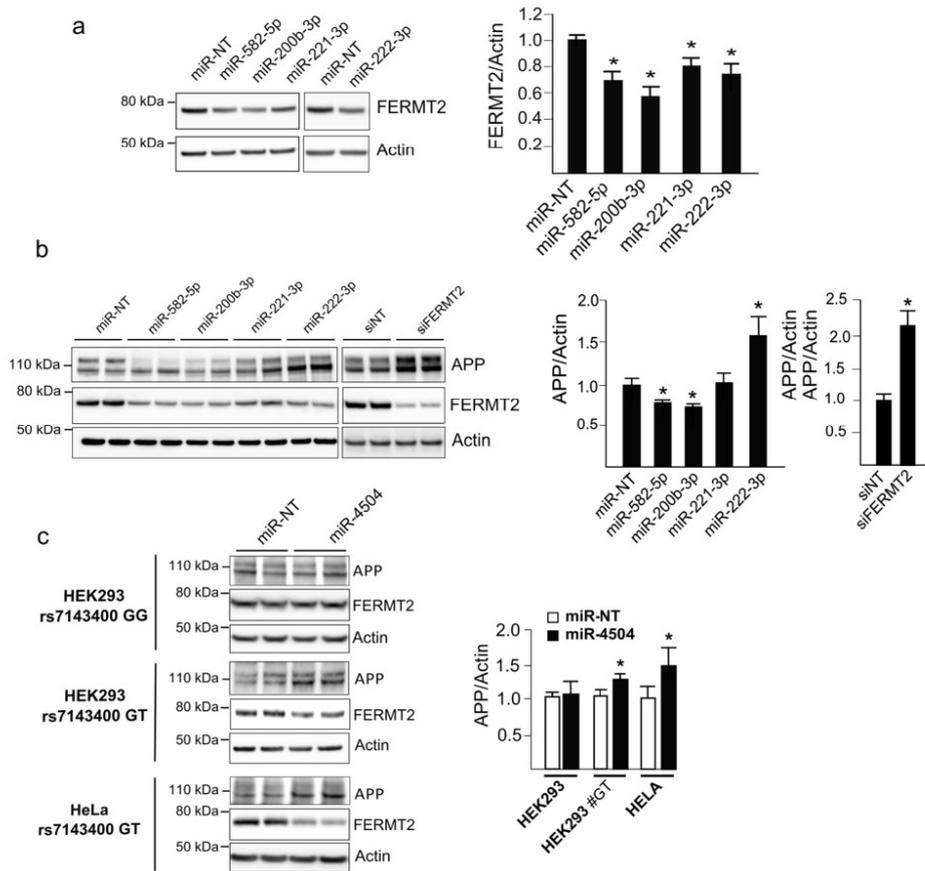
118



119

120 **Supplementary Fig. 4. Prediction of the impact of the rs7143400 allele on FERMT2 mRNA**
 121 **structure**

122 **a.** Comparison of the predicted entropy of FERMT2 mRNA structure according to the rs7143400
 123 allele using RNAfold web server (<http://ma.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>). The
 124 red box notes the increase of entropy within the 3'UTR in the vicinity of the rs7143400. **b.** Impact of
 125 the rs7143400 on the predicted FERMT2 mRNA structure. Zoomed areas show the modified structure
 126 of rs7143400_T relative to rs7143400_G, including the sequence targeted by miR-4504.
 127

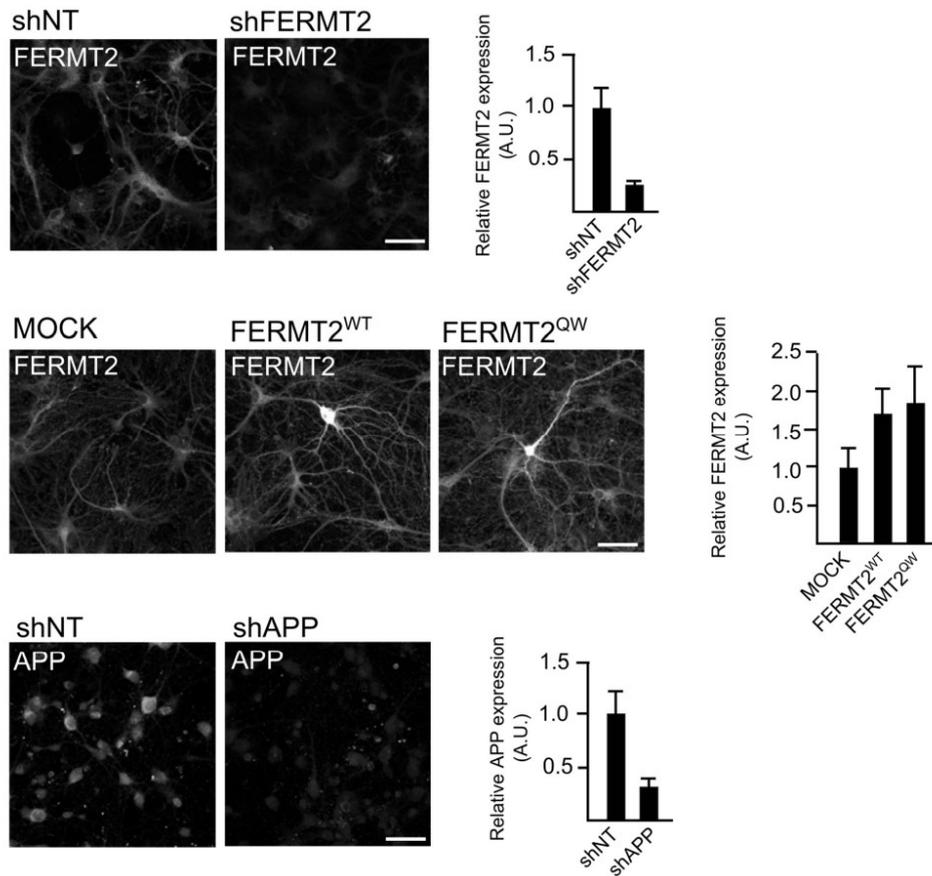


128

129

130 **Supplementary Fig. 5. Validation of the impact of miRNAs on endogenous FERMT2 and APP**
 131 **expression levels.**

132 **a.** Impact of miR-582-5p, miR-200b-3p, miR-221-3p and miR-222-3p on endogenous FERMT2 levels
 133 in hippocampi primary neuronal culture. FERMT2 expression levels were assessed by Western blot
 134 72h after miRNAs transfection. Of note, such analysis was not possible for miR-4504, since the
 135 sequence encompassing rs7143400 is not present in the rodent. **b.** Impact of miR-582-5p, miR-200b-
 136 3p, miR-221-3p and miR-222-3p on endogenous FERMT2 and APP levels in HEK293 cell line. **c.**
 137 Endogenous FERMT2 and APP expression levels were assessed by Western blot using cell lines
 138 carrying the rs7143400-T allele (or not) following transient transfection with a non-targeting miR
 139 (miR-NT) or miR-4504. Bar charts show mean \pm SD. Mann-Whitney test; * $p < 0.05$.



140

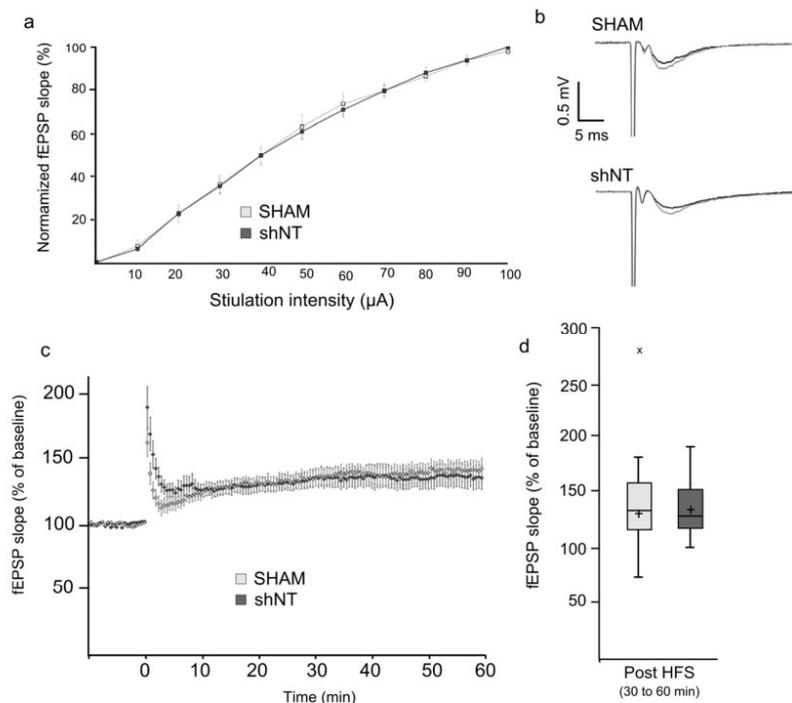
141 **Supplementary Fig. 6. Impact of lentiviral transduction on FERMT2 and APP expression levels.**

142 After transduction at DIV1 with the indicated lentivirus, expression levels of FERMT2 and APP were
 143 assessed by immunofluorescence using anti-FERMT2 or anti-APP antibodies, respectively. Scale bar=
 144 10 μ m. Bar charts show mean \pm SD.

145

146

147



148

149 **Supplementary Fig. 7. Lentivirus injection does not alter electrophysiology recordings**

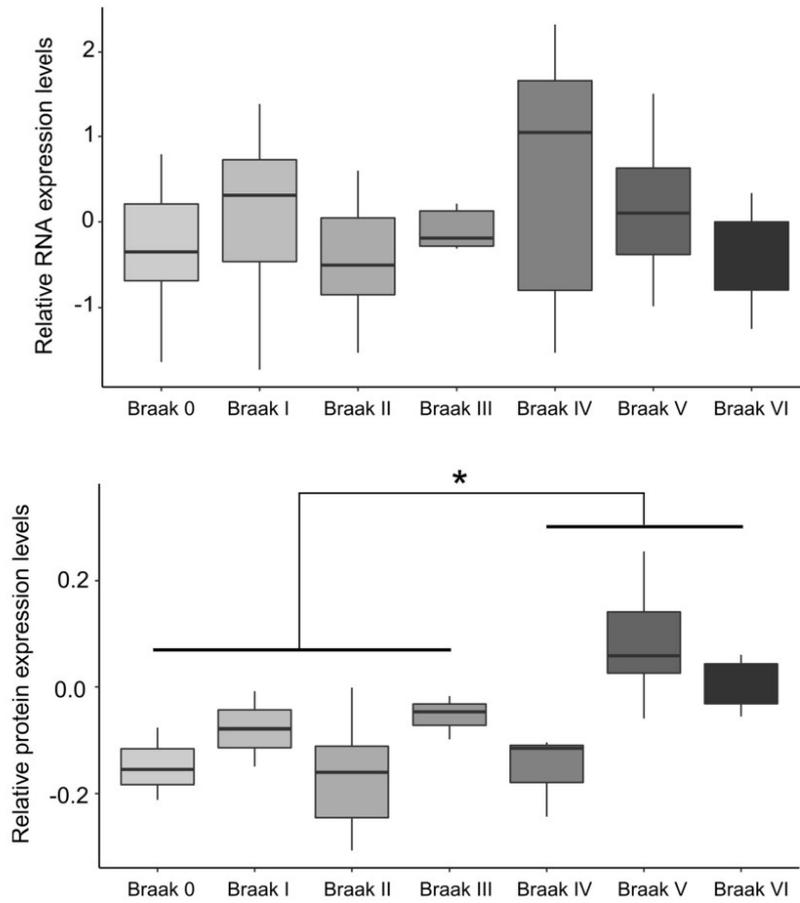
150 **a.** Normalized average slope of fEPSP evoked in hippocampal slices from animals injected with the
151 indicated lentivirus or surgery procedures group (SHAM). N=5 animals/10 slices. **b.** Examples of
152 recorded fEPSPs during baseline (black) and post LTP induction 40-60 min (grey). **c.** Time course of
153 the average slope of elicited field responses following LTP induction by a tetanic stimulation protocol
154 at hippocampal CA1 synapses from 5 mice after viral injection. Time-point 0 represents the delivery
155 of tetanic stimulation. Slopes of each fEPSP were normalized to baseline and plotted against time. **d.**
156 Box plots of the average slope response during 30-60 min post LTP induction. N = 5 mice; 2 slices per
157 animal. × indicates an outlier.

158

159

160

161



162

163 **Supplementary Fig. 8. Quantification of FERMT2 expression at the mRNA and protein levels in**
164 **human brain samples**

165 FERMT2 protein level is significantly increased in post-mortem brains from patients at higher Braak
166 stages. Statistics for global distribution, Kruskal-Wallis ANOVA (p -value = 0.0022), followed by
167 Mann-Whitney U test, * p -value = 0.0008.

168

DISCUSSION ET CONCLUSION

Mes travaux de thèse ont intégré différentes approches *in vitro* permettant (i) de caractériser les fonctions de gènes identifiés par les études d'association pangénomiques, et (ii) de préciser les mécanismes moléculaires reliant les variants de ces gènes au risque de développer la MA.

La perte synaptique étant un événement précoce dans le développement de la MA, et l'un des marqueurs pathologiques les mieux corrélés au déclin cognitif, notre hypothèse était qu'un certain nombre de déterminants génétiques pouvaient être associés au risque de développer la maladie en raison de leur implication dans le maintien de l'intégrité synaptique.

Analyser l'impact des gènes identifiés par les études GWAS sur les synapses par une approche HCS

L'approche de criblage HCS que nous avons développée a permis d'évaluer l'effet de la sous-expression des gènes associés au risque de développer la MA sur la densité synaptique de cultures de neurones de rat. Néanmoins, l'utilisation de cultures primaires hippocampiques comme modèle d'étude limite la quantité de matériel biologique accessible, et la transposition à l'humain de résultats obtenus à partir de modèles murins n'est pas toujours évidente. Les criblages HCS reposant sur des cultures de neurones issus d'iPSCs représenteraient des modèles d'étude plus pertinents dans le cadre des maladies neurodégénératives humaines, mais comportent de nombreuses difficultés (335). La différenciation et la maturation de neurones dérivés d'iPSCs sont relativement longues et coûteuses comparées à l'utilisation des cultures primaires de rongeurs. De plus, les cultures neuronales humaines ont également tendance à migrer et à se regrouper en amas, ce qui complique grandement l'acquisition et l'analyse des images, en particulier pour l'étude de phénotypes fins comme celui de la co-localisation de marqueurs synaptiques. Des chercheurs essaient actuellement d'établir des protocoles spécifiques qui pallieraient à ces difficultés. En utilisant des matrices extracellulaires spécifiques, et des conditions de culture à faible teneur en oxygène, il serait notamment possible de réduire le regroupement de neurones généralement observé après une culture prolongée (424). Très récemment, des chercheurs sont parvenus à développer un modèle de criblage de la densité de Synapsine dans des neurones humains dérivés d'iPSCs, mais la mesure d'un marquage uniquement pré-synaptique possède une sensibilité limitée et ne saurait refléter l'ensemble des synapses matures et fonctionnelles (369). L'analyse de la co-localisation de deux marqueurs pré- et post-synaptiques permet une évaluation plus robuste de la densité synaptique, et les limitations techniques font qu'une telle mesure par criblage HCS n'a pu actuellement être réalisée que dans des cultures primaires de neurones murins (368,425–427). Ces études étaient cependant basées sur des modèles de culture en plaque 96-puits, et nous sommes, à notre connaissance, les seuls à être parvenus à miniaturiser un tel

essai à un format 384-puits, nous permettant ainsi d'évaluer l'effet d'un nombre quatre fois plus grand de molécules dans une même plaque de criblage.

Afin de diminuer le risque de faux positifs et de faux négatifs, les criblages HCS sont généralement répliqués un certain nombre de fois. Cela permet également d'estimer la variabilité de l'effet d'un composé entre différentes expériences. La plupart des criblages ne sont cependant réalisés que deux fois en raison du coût élevé de ce type d'expérimentation (428). Dans l'HCS que nous avons réalisé, l'effet de chaque shARN a été évalué en quadruplicat technique et à deux MOI (MOI2 et MOI4), et le criblage a été réalisé trois fois à partir de trois cultures de neurones indépendantes. L'important nombre de réplicats dont nous disposons pour la mesure de l'effet de chaque shARN a ainsi permis de renforcer la fiabilité des résultats obtenus. De plus, le contrôle positif utilisé pour l'HCS, c'est-à-dire le shARN dirigé contre la Synaptophysine, montrait des effets suffisamment forts et consistants pour obtenir des scores de validation satisfaisants.

Cette première partie de mes travaux a ainsi permis (i) de mettre en place un nouveau protocole de criblage *in vitro* de l'impact de modulateurs de la densité synaptique et (ii) de sélectionner 9 gènes dont la variation d'expression modifierait le risque de MA par un effet potentiel au niveau synaptique. De manière intéressante, l'étude bibliographique de la fonction des protéines codées par ces gènes apporte des éléments en faveur de cette hypothèse (**Tableau 1**).

Gène et protéine	Fonctions de la protéine	Implication dans la physiologie neuronale et la MA	Références
USP6NL : Ubiquitin Specific Peptidase 6 N-terminal like	- Activatrice de Rab5, permet l'inhibition de la voie d'endocytose médiée par la clathrine - Activatrice des voies Wnt/ β -catenin régulant la neurogénèse et la plasticité synaptique	- On retrouve une hyperactivation de la protéine Rab5 dans les cerveaux des patients atteints de MA - L'activation des voies Wnt/ β -catenin entraîne une diminution de la production de peptides A β et de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau dans les cerveaux des patients atteints de MA - L'expression d'un mutant de la protéine USP6NL dans une lignée cellulaire N2A réduit la production de peptides A β	(429-433)
PSMC3 : Proteasome 26S Subunit ATPase 3	- Fait partie du complexe du protéasome 26S qui permet l'élimination des protéines malconformées ou endommagées	- On retrouve une diminution de l'activité du protéasome dans les cerveaux des patients atteints de MA - PSMC3 interagirait avec la protéine Tau phosphorylée dans les cerveaux des patients atteints de MA	(434,435)
PLCG2 : Phospholipase C gamma 2	- Hydrolyse le PIP2 en IP3 et DAG. L'IP3 se lie au réticulum endoplasmique et entraîne une augmentation du calcium cytoplasmique.	Le variant rare non-synonyme P522R : - augmente légèrement l'activité de la protéine PLCy2 - diminue le risque de développer la MA de 32% - est corrélé avec une augmentation de la concentration en protéine Tau totale dans le LCR des patients atteints de MA.	(259,296,374)

CSNK1G1 : Caséine Kinase 1 Gamma 1	- Protéine kinase sélective des sérines/thréonines	- Interagit avec la protéine Tau hyperphosphorylée, et facilite la formation de DNF - Est impliquée dans la régulation de la phosphorylation et de l'activité des NMDAR - L'expression d'un mutant de la protéine homologue chez la drosophile entraînent un déficit de mémoire	(436-440)
CYB561 : Cytochrome B 561	- Impliqué dans la synthèse des cathécolamines, notamment de la dopamine	- La protéine homologue de CYB561 chez la drosophile joue un rôle dans la formation de la mémoire en régulant l'activité d'une enzyme requise pour l'alpha-amidation des neuropeptides	(441,442)
SNX1 : Sorting Nexin 1	- Fait partie du complexe des rétromères jouant un rôle majeur dans : (i) le transport rétrograde des protéines des endosomes vers le réseau trans-golgien, et (ii) le recyclage des protéines des endosomes à la surface cellulaire	- Le complexe des rétromères est impliqué dans de nombreux processus neuronaux, dont la plasticité synaptique - SNX1 joue un rôle dans le transport du récepteur au glutamate métabotropique mGluR1 - La surexpression de SNX1 dans un modèle de neuroblastome N2A favorise la croissance des neurites	(426,443,444)
ICA1L : Islet Cell Autoantigen 1 Like	- Important paralogue de la protéine ICA1	- Chez la Drosophile, la modulation de l'expression d'ICA1 altère le taux synaptique des récepteurs glutamatergiques ionotropiques (iGluRs) - Dans les cultures primaires hippocampiques de rats, ICA1 perturbe le recrutement des récepteurs AMPAR et la maturation synaptique	(445-447)
OPLAH : 5-oxoprolinase	- Prend place dans la voie de libération du glutamate à partir du glutathion en catalysant la conversion de la 5-oxo-L-proline en L-glutamate	- L'inhibition d'OPLAH entraîne une diminution du niveau de glutamate dans des neurones primaires de rats - Chez l'homme les déficiences enzymatiques en OPLAH sont associées avec des symptômes neurologiques, psychiatriques, et cognitifs	(448-451)
NCK2 : Non-Catalytic Region of Tyrosine Kinase Adaptor Protein 2	- Protéine adaptatrice impliquée dans la régulation des récepteurs tyrosine kinases.	- L'inhibition de NCK2 dans des cultures primaires de neurones entraîne la perturbation de la croissance des axones et des dendrites - L'abolition de son interaction avec la protéine PAK3 conduit à une augmentation des potentiels post-synaptiques excitateurs et de la transmission synaptique - L'abolition de son interaction avec une des sous-unité du récepteur au glutamate conduit à une réduction de l'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs	(452-457)

Tableau 1 : Implication potentielle des gènes impactant la densité synaptique identifiés par HCS dans la physiologie neuronale et la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, notre approche nous a permis de mettre en évidence la fonction synaptique de plusieurs gènes associés à la MA. Pour autant, il reste de nombreux autres gènes identifiés par les études GWAS dont le rôle dans la pathologie reste à élucider. Les approches de criblage HCS basées sur l'interférence ARN représentent une technique de choix pour sélectionner des gènes impactant un phénotype particulier, mais comportent un risque important de résultats faussement négatifs. Le fait qu'un gène ne soit pas sélectionné lors d'un criblage ne signifie pas qu'il n'impacte pas la fonction cellulaire

étudiée. Son effet peut simplement ne pas avoir été mis en évidence en raison d'un manque d'efficacité du shARN ou d'une trop grande toxicité induite par l'inhibition du gène.

Les méthodes de criblage HCS nécessitent également de sélectionner au préalable un phénotype cellulaire d'étude représentatif de la pathologie. Toutefois, les maladies complexes telles que la MA résultent généralement de la dérégulation de multiples voies biologiques, et l'étude d'un seul phénotype ne pourrait récapituler la maladie dans son ensemble. Nous avons choisi de baser la sélection de nos gènes d'intérêt sur la mesure de la densité synaptique, mais l'HCS est une approche multiparamétrique, et bien d'autres informations provenant de notre criblage pourraient être exploitées à l'avenir. Les images et les données obtenues pourraient permettre d'évaluer facilement l'impact des facteurs de risques de la MA sur d'autres phénotypes tels que la morphologie du réseau neuronal, la densité et l'intensité des marqueurs pré-synaptiques et post-synaptiques, ou le pourcentage d'assignement entre marqueurs pré- et post- synaptiques. Ce pourcentage d'assignement est notamment modulé par l'exposition de neurones à des concentrations physiologiques d'oligomères A β (291), et des travaux sont actuellement en cours au laboratoire pour évaluer l'effet des gènes modulant le plus fortement ce paramètre sur la toxicité induite par le peptide amyloïde.

Notre modèle de neurones cultivés en plaque 384-puits sous-exprimant l'ensemble des facteurs de risque génétique de la MA pourrait également être facilement adapté à l'étude d'autres phénotypes classiquement associés à la maladie, tels que la sécrétion d'A β mesurable par Alpha-LISA, ou la phosphorylation de Tau mise en évidence par immunofluorescence. Multiplier les criblages basés sur la mesure de phénotypes différents pourrait ainsi permettre de mettre en évidence de nouvelles convergences biologiques. L'effet des gènes à risque de MA sur l'activité électrique neuronale pourrait également être mesurée par HCS à travers l'utilisation d'indicateurs fluorescents calciques (458). La mise en place d'une telle mesure nécessiterait cependant l'adaptation du modèle à l'acquisition d'images de cellules vivantes. Plutôt que de chercher à complexifier notre criblage au risque de compromettre sa faisabilité, nous avons fait le choix d'évaluer l'effet des 9 gènes précédemment sélectionnés sur l'activité électrique neuronale à travers des analyses complémentaires à moyen-débit par la technique MEA en plaque 96-puits. J'ai alors pu notamment confirmer que la sous expression du gène *PLCG2* était associé à une baisse de l'activité électrique des neurones.

D'autres travaux de l'équipe avaient en parallèle identifié par une autre approche HCS, le facteur de risque génétique *FERMT2* comme un autre modulateur important du métabolisme de l'APP et de l'activité synaptique (278).

Convergences des mécanismes impliquant *PLCG2* et *FERMT2* dans la modulation des fonctions synaptiques

Nos résultats ont permis de proposer la kinase GSK3 β comme une importante cible de PLCG2. En effet, nous avons pu observer que la sous-expression de *PLCG2* dans des cultures mixtes de neurones et d'astrocytes humains entraînait une augmentation du niveau de GSK3 β total ainsi que de sa forme active. De plus, cette sous-expression de *PLCG2* était associée à une augmentation de la forme active de PYK2 et une réduction de la forme active d'AKT, deux kinases connues pour réguler positivement et négativement l'activation de GSK3 β (**Figure 26**). De manière intéressante, une étude a montré que la sous-expression de *Fermt2* chez la souris conduisait également à l'activation de GSK3 β (459). L'impact de la sous-expression des gènes *PLCG2* et *FERMT2* sur GSK3 β pourrait expliquer les phénotypes caractéristiques de la MA que nous avons observés. En effet, une augmentation de l'activité de GSK3 β favoriserait la production de peptides amyloïdes en induisant l'expression de la β -sécrétase par l'intermédiaire de la voie NF κ B, et en modulant l'activité de la γ -sécrétase (460). De plus, GSK3 β est une des principales kinases phosphorylant la protéine Tau (180) et est également connue pour jouer un important rôle dans la morphologie et la plasticité synaptique (461). L'activation de GSK3 β module notamment la taille des synapses en favorisant la dégradation de la β -caténine, et favorise l'induction de la LTD via l'internalisation des récepteurs NMDAR.

FERMT2 est une protéine adaptatrice impliquée dans le recrutement de plusieurs partenaires du complexe d'adhésion focale. Les travaux menés au laboratoire ont montré qu'elle interagissait directement avec l'APP et pourrait ainsi moduler la densité et l'activité synaptique à travers la régulation de la forme et de la stabilité des épines dendritiques (288). De manière intéressante, une partie des gènes identifiés par les études GWAS, dont *SRC*, *CASS4*, *CD2AP*, et *PTK2B*, participent également au complexe d'adhésion focale, principalement en aval des intégrines (269) (**Figure 26**). D'autres facteurs de risques génétiques pourraient être impliqués dans la dysfonction synaptique associée à la MA en modulant des voies dépendantes de PLCG2, notamment le gène *DGKQ*, qui code l'isoforme θ de la diacylglycérol kinase (DGK) connue pour son implication dans la transmission synaptique (311). Cette enzyme catalyse la conversion du DAG produit par PLCG2 en acide phosphatidique, un métabolite influençant la morphologie dendritique par une voie de signalisation dépendante de l'activation de PYK2 et GSK3 β (462).

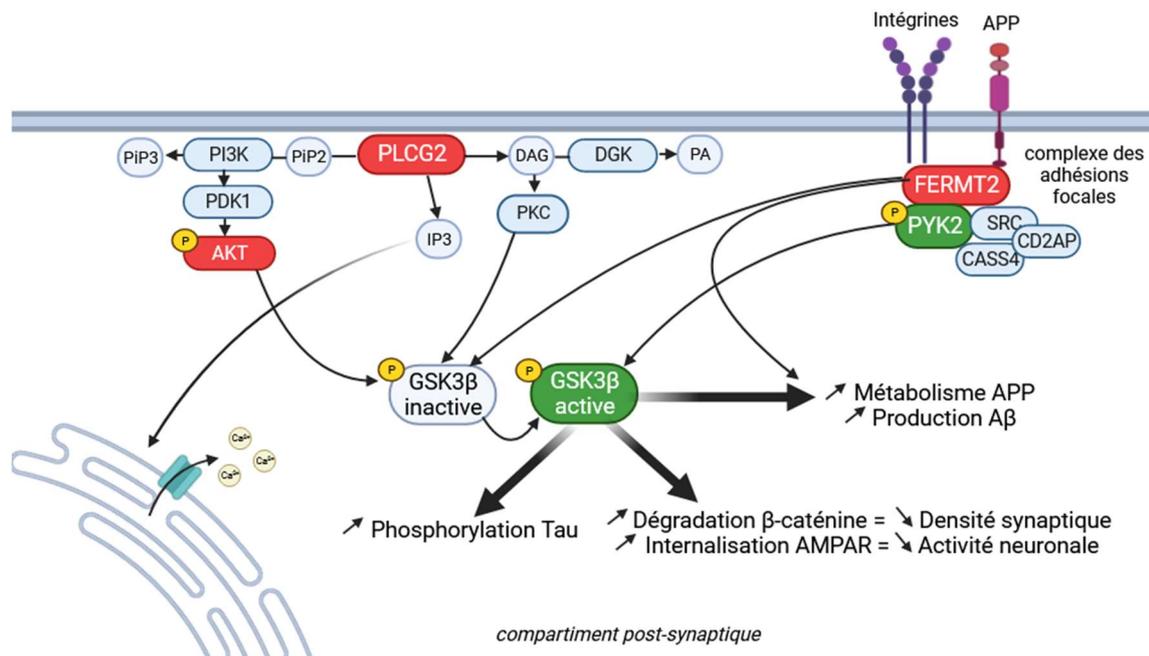


Figure 26 : Les voies biologiques impactées par PLCG2 et FERMT2 convergent vers GSK3β et regroupent plusieurs autres facteurs de risques génétiques de la maladie d'Alzheimer. La sous-expression de *PLCG2* entraîne l'activation de la GSK3β à travers la diminution de la forme active phosphorylée d'AKT et l'augmentation de la forme active phosphorylée de PYK2. La sous-expression de *FERMT2* conduit également à une activation de la GSK3β. GSK3β semble jouer un rôle central dans la MA, en favorisant la phosphorylation de Tau, la production d'Aβ, ainsi que la perte de densité synaptique et la diminution de l'activité neuronale. Ces voies impliquent également d'autres facteurs de risques génétiques de la MA tels que *SRC*, *CASS4*, et *CD2AP*, retrouvés dans le complexe des adhésions focales, et *DGKQ* qui métabolise le DAG produit par *PLCG2* en acide phosphatidique (PA).

Préciser les mécanismes moléculaires reliant les effets des variants des gènes *PLCG2* et *FERMT2* au niveau de la synapse et sur le risque de développer la maladie d'Alzheimer

Dans le but d'identifier et de caractériser les variants fonctionnels des gènes *PLCG2* et *FERMT2* associés au risque de développer la MA par les études d'association pangénomiques, plusieurs approches ont été utilisées. L'impact des variants non-sens Q816X et R953X du gène *PLCG2* a été mimé par l'induction de la sous-expression du gène dans le gyrus denté de souris et dans un modèle de neurones humains induits issus d'iPSCs. Nous avons ainsi pu attribuer un rôle délétère à la sous-expression de *PLCG2* sur la production de peptides amyloïdes, la phosphorylation de Tau, ainsi que la structure et la fonction synaptique. Pour autant, ce modèle se base sur l'hypothèse que les variants non-sens Q816X et R953X de *PLCG2* entraînent une diminution de l'expression de la protéine correspondante, sans avoir évalué la contribution potentielle de la troncation de la protéine sur son activité ou dans la modulation de l'interaction avec ses partenaires. Pour caractériser précisément les mécanismes reliant d'une part les variants non-sens Q816X et R953X délétères et d'autre part le

variant hypermorphique P522R protecteur de *PLCG2* à la MA, il serait nécessaire de développer des modèles cellulaires porteurs des différents allèles pour les variants génétiques d'intérêt par technique d'édition du génome.

L'effet du variant rs7143400, localisé dans la région non codante 3'UTR du gène *FERMT2*, sur la fixation du micro-ARN 4504 et l'expression du gène a pu être validé en générant des lignées cellulaires isogéniques ne différant que par les allèles de ce variant, par technique CRISPR/Cas9. Notre étude avait cependant pour limite d'être basée sur un modèle de lignée cellulaire HEK293, qui ne permettait pas d'évaluer les conséquences du variant sur des phénotypes neuronaux comme la morphologie des dendrites, le nombre de synapses, ou l'activité électrique neuronale. Pour caractériser l'impact des variants fonctionnels des gènes *FERMT2* et *PLCG2* sur de tels phénotypes, il sera donc nécessaire d'adapter notre stratégie CRISPR/Cas9 à un modèle cellulaire d'iPSCs, plus pertinent dans le cadre de l'étude des maladies neurodégénératives.

Effets spécifiques vs pléiotropes des variants des gènes *FERMT2* et *PLCG2* ?

L'étude du variant de *FERMT2* par CRISPR/Cas9 a permis de mettre en évidence le rôle du rs7143400 dans la modulation de l'expression de la protéine par un mécanisme dépendant du miR-4504. Ce micro-ARN étant particulièrement exprimé au niveau neuronal, cela suggère que l'effet du variant de *FERMT2* sur le niveau d'expression de ce gène interviendrait principalement dans les neurones. Dans le cas des mécanismes pouvant expliquer la fonctionnalité des variants du gène *PLCG2*, ils pourraient intervenir dans tous les types cellulaires exprimant ce gène. *PLCG2* était décrit comme principalement exprimé au niveau de la microglie, et l'intérêt majeur de mes travaux a été de montrer que les variants de ce gène pourraient également moduler les fonctions de *PLCG2* au niveau des neurones et/ou des astrocytes. En utilisant différents protocoles d'induction, il serait possible de différencier les cultures d'iPSCs en culture purement astrocytaire ou purement neuronale, ce qui permettrait de déterminer le type cellulaire responsable des effets observés (463,464).

Impact de l'exposition aux peptides amyloïdes sur les effets de *FERMT2* et *PLCG2*

De manière intéressante, les études d'association des endophénotypes de la MA ont établi un lien entre l'effet protecteur du variant P522R de *PLCG2* et un déclin cognitif plus lent, ainsi qu'une réduction des concentrations de Tau et de phospho-Tau dans le LCR (296). Cet effet semble notamment être en aval de la pathologie amyloïde, et représente un argument en faveur d'un rôle de *PLCG2* dans la synaptotoxicité médiée par l'A β . De plus, il a été démontré que l'A β ₁₋₄₀ agrégé diminuait l'activité de la PLC au niveau du cortex cérébral de souris (465), suggérant un possible effet potentialisateur des peptides amyloïdes sur l'impact délétère de la sous-expression de *PLCG2*. La sous-

expression de *FERMT2* exerce quant à elle un effet négatif sur les synapses par un mécanisme dépendant de l'APP, suggérant que le métabolisme de cette protéine, et donc la production de peptides amyloïdes, pourrait moduler les effets du variant de *FERMT2* dans la physiopathologie de la MA.

Dans ce contexte, il serait intéressant de caractériser l'impact des variants de *FERMT2* et de *PLCG2* sur les phénotypes de la MA et sur la connectivité synaptique, dans des cultures de neurones et d'astrocytes humains exposés aux peptides A β . Pour ce faire, différentes approches pourraient être envisagées : (i) l'exposition de cultures neuronales humaines à des peptides A β synthétiques ajoutés directement dans le milieu de culture, (ii) l'utilisation de milieu conditionné provenant de lignées cellulaires CHO sur-exprimant une version mutée de la protéine APP sécrétant ces peptides, ou (iii) l'utilisation de modèle de microfluidiques permettant directement la co-culture des astrocytes/neurones humains avec les lignées CHO sur-exprimant l'APP muté (291).

Identifier les voies biologiques dépendantes de *PLCG2* et *FERMT2*

Nos études suggèrent que *PLCG2* et *FERMT2* influenceraient le risque de développer la MA en modulant la densité et les fonctions synaptiques par l'intermédiaire de l'activation de GSK3 β (**Figure 26**). Identifier avec précision l'ensemble des acteurs et des voies biologiques dépendantes de *PLCG2* et *FERMT2* pourrait permettre de proposer de nouveaux mécanismes physiopathologiques de la MA ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Pour ce faire, les modèles cellulaires porteurs des variants génétiques de *FERMT2* et de *PLCG2* pourraient faire l'objet d'analyses transcriptomiques et phospho-protéomiques approfondies, par des techniques de single-cell RNAseq, et de LC-MS/MS. On peut supposer que les voies expliquant le lien entre ces gènes et la MA convergeraient, au moins en partie, avec des voies biologiques impliquant d'autres facteurs de risques génétiques de la MA.

La signalisation GSK3 β ayant été significativement associée à plusieurs caractéristiques neuropathologiques de la MA, son inhibition est vite apparue comme une approche thérapeutique potentielle. L'administration chez la souris de Tideglusib, un inhibiteur de GSK3 β , entraîne notamment une diminution du niveau de phosphorylation de la protéine Tau et du dépôt d'A β , et améliore les fonctions mnésiques (165). Cependant, malgré ces résultats encourageants dans des modèles animaux, le fait que GSK3 β soit exprimée de manière ubiquitaire et soit impliquée dans de nombreux autres processus cellulaires soulève des inquiétudes en matière de toxicité. Les premiers essais cliniques de phase I des inhibiteurs de GSK3 β ont montré un nombre d'effets secondaires importants et ont dû être interrompus précocement (166). De la même manière, le rôle pléiotropique des gènes *PLCG2* et *FERMT2* fait qu'ils ne représentent pas de bonnes cibles thérapeutiques. En effet, les mutations gain-de-fonction de *PLCG2* sont connues pour engendrer de graves désordres immunitaires,

et la surexpression de *FERMT2* est impliquée dans la progression de différents types de cancers (466,467). Pour espérer développer de nouveaux traitements sans effets secondaires majeurs, il est alors nécessaire d'identifier les autres acteurs de ces voies biologiques, pour pouvoir agir en aval de *FERMT2*, *PLCG2*, et *GSK3β*.

Développer un nouveau modèle HCS pour le criblage pharmacologique

La modulation de *FERMT2* et *PLCG2* semble impacter différentes voies cellulaires, dont celle de *GSK3β*, et conduit à l'expression de nombreux phénotypes en lien avec la MA. Les neurones dérivés d'iPSCs qui sous-expriment *PLCG2*, en récapitulant les principales lésions neuropathologiques associées à la MA, dont l'augmentation de la production des peptides amyloïdes, l'hyperphosphorylation de Tau, ainsi que les altérations structuro-fonctionnelles des synapses, constitueraient un modèle cellulaire de choix pour l'identification de nouveaux composés à visée thérapeutique. Des cultures neuronales issues d'iPSCs porteuses des mutations non-sens de *PLCG2* pourraient notamment être utilisées pour réaliser le criblage de banques de molécules. Dans une approche de repositionnement thérapeutique, le criblage de médicaments déjà approuvés par les autorités de santé permettraient de limiter l'étude aux composés dont la biodisponibilité et la sécurité a déjà été validée.

Afin d'étayer davantage l'impact potentiel de certains candidats-médicaments, l'approche HCS pourrait être complétée en testant les associations avec la réduction du risque de développer la maladie dans de grandes cohortes de patients tels que l'UK Biobank (n=400.000), l'European Alzheimer's & Dementia Biobank (EADB, n=100.000) ou the Copenhagen Hospital Biobank (CHB, n=400.000). Ces vastes études comprennent de nombreuses données cliniques et biologiques, ainsi que des informations sur la prise de médicaments par les patients, qui nous permettront d'étudier si l'utilisation des candidats-médicaments sélectionnés par criblage HCS est associée à une diminution du risque de MA dans ces populations.

Pour finir, les effets bénéfiques des molécules identifiées par ces approches pourront être validés dans des modèles d'études complémentaires. En utilisant des méthodologies similaires à celles développées dans notre analyse du gène *PLCG2* dans des neurones dérivés d'iPSC, l'impact du candidat-médicament sélectionné pourra être évalué sur le métabolisme de l'APP, la phosphorylation de Tau ainsi que sur la densité et la fonction synaptique dans des modèles de microfluidiques couplés à des MEA.

BIBLIOGRAPHIE

1. Georges J, Bintener C, Miller O. Dementia in Europe Yearbook 2019: Estimating the prevalence of dementia in Europe [Internet]. Alzheimer Europe; 2020 janv [cité 1 sept 2023] p. 1-108. Disponible sur: <https://www.alzheimer-europe.org/resources/publications/dementia-europe-yearbook-2019-estimating-prevalence-dementia-europe>
2. Gustavsson A, Norton N, Fast T, Frölich L, Georges J, Holzapfel D, et al. Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum. *Alzheimers Dement*. févr 2023;19(2):658-70.
3. Vermunt L, Sikkes SAM, van den Hout A, Handels R, Bos I, van der Flier WM, et al. Duration of preclinical, prodromal, and dementia stages of Alzheimer's disease in relation to age, sex, and APOE genotype. *Alzheimers Dement*. juill 2019;15(7):888-98.
4. GBD 2016 Dementia Collaborators. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. janv 2019;18(1):88-106.
5. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 17 oct 2020;396(10258):1204-22.
6. 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. avr 2023;19(4):1598-695.
7. Brodaty H, Donkin M. Family caregivers of people with dementia. *Dialogues Clin Neurosci*. 2009;11(2):217-28.
8. Eid A, Mhatre I, Richardson JR. Gene-environment interactions in Alzheimer's disease: A potential path to precision medicine. *Pharmacol Ther*. juill 2019;199:173-87.
9. Toepper M. Dissociating Normal Aging from Alzheimer's Disease: A View from Cognitive Neuroscience. *JAD*. 21 mars 2017;57(2):331-52.
10. Cupples LA, Farrer LA, Sadovnick AD, Relkin N, Whitehouse P, Green RC. Estimating risk curves for first-degree relatives of patients with Alzheimer's disease: the REVEAL study. *Genet Med*. 2004;6(4):192-6.
11. Li R, Cui J, Shen Y. Brain sex matters: estrogen in cognition and Alzheimer's disease. *Mol Cell Endocrinol*. 25 mai 2014;389(1-2):13-21.
12. Leszek J, Mikhaylenko EV, Belousov DM, Koutsouraki E, Szczechowiak K, Kobusiak-Prokopowicz M, et al. The Links between Cardiovascular Diseases and Alzheimer's Disease. *Curr Neuropharmacol*. 2021;19(2):152-69.
13. Skoog I, Gustafson D. Update on hypertension and Alzheimer's disease. *Neurol Res*. sept 2006;28(6):605-11.
14. Hjelm C, Broström A, Dahl A, Johansson B, Fredrikson M, Strömberg A. Factors associated with increased risk for dementia in individuals age 80 years or older with congestive heart failure. *J Cardiovasc Nurs*. 2014;29(1):82-90.
15. Tolppanen AM, Ngandu T, Kåreholt I, Laatikainen T, Rusanen M, Soininen H, et al. Midlife and late-life body mass index and late-life dementia: results from a prospective population-based cohort. *J Alzheimers Dis*. 2014;38(1):201-9.
16. Sun JH, Yu JT, Tan L. The role of cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2015;51(3):947-65.
17. Xuan K, Zhao T, Qu G, Liu H, Chen X, Sun Y. The efficacy of statins in the treatment of Alzheimer's disease: a meta-analysis of randomized controlled trial. *Neurol Sci*. juin 2020;41(6):1391-404.
18. Li X, Song D, Leng SX. Link between type 2 diabetes and Alzheimer's disease: from epidemiology to mechanism and treatment. *Clin Interv Aging*. 2015;10:549-60.
19. Lesuis SL, Maurin H, Borghgraef P, Lucassen PJ, Van Leuven F, Krugers HJ. Positive and negative early life experiences differentially modulate long term survival and amyloid protein levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *Oncotarget*. 28 juin 2016;7(26):39118-35.
20. Silva MVF, Loures C de MG, Alves LCV, de Souza LC, Borges KBG, Carvalho M das G. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J Biomed Sci*. 9 mai 2019;26(1):33.

21. Hamer M, Chida Y. Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence. *Psychol Med.* janv 2009;39(1):3-11.
22. Scarmeas N, Stern Y, Mayeux R, Manly JJ, Schupf N, Luchsinger JA. Mediterranean diet and mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* févr 2009;66(2):216-25.
23. Jonaitis E, La Rue A, Mueller KD, Kosciak RL, Hermann B, Sager MA. Cognitive activities and cognitive performance in middle-aged adults at risk for Alzheimer's disease. *Psychol Aging.* déc 2013;28(4):1004-14.
24. Kivipelto M, Solomon A, Ahtiluoto S, Ngandu T, Lehtisalo J, Antikainen R, et al. The Finnish Geriatric Intervention Study to Prevent Cognitive Impairment and Disability (FINGER): study design and progress. *Alzheimers Dement.* nov 2013;9(6):657-65.
25. Sender E. Sciences et Avenir. 2014 [cité 17 oct 2023]. Alzheimer : réduire les risques est désormais possible. Disponible sur: https://www.sciencesetavenir.fr/sante/alzheimer-reduire-les-risques-est-desormais-possible_27876
26. Atri A. The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *Med Clin North Am.* mars 2019;103(2):263-93.
27. Jellinger KA. Recent update on the heterogeneity of the Alzheimer's disease spectrum. *J Neural Transm (Vienna).* janv 2022;129(1):1-24.
28. Polsinelli AJ, Apostolova LG. Atypical Alzheimer Disease Variants. *Continuum (Minneap Minn).* 1 juin 2022;28(3):676-701.
29. D'Onofrio G, Sancarlo D, Panza F, Copetti M, Cascavilla L, Paris F, et al. Neuropsychiatric symptoms and functional status in Alzheimer's disease and vascular dementia patients. *Curr Alzheimer Res.* juill 2012;9(6):759-71.
30. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, et al. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol.* févr 2013;12(2):207-16.
31. Dubois B, Hampel H, Feldman HH, Scheltens P, Aisen P, Andrieu S, et al. Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimers Dement.* mars 2016;12(3):292-323.
32. Martin E, Velayudhan L. Neuropsychiatric Symptoms in Mild Cognitive Impairment: A Literature Review. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2020;49(2):146-55.
33. Mitchell AJ, Shiri-Feshki M. Rate of progression of mild cognitive impairment to dementia--meta-analysis of 41 robust inception cohort studies. *Acta Psychiatr Scand.* avr 2009;119(4):252-65.
34. Kaufer DI. Neurobehavioral assessment. *Continuum (Minneap Minn).* juin 2015;21(3 Behavioral Neurology and Neuropsychiatry):597-612.
35. Hampel H, Au R, Mattke S, van der Flier WM, Aisen P, Apostolova L, et al. Designing the next-generation clinical care pathway for Alzheimer's disease. *Nat Aging.* août 2022;2(8):692-703.
36. Wright AEH, Harrell HE. Physical Examination in the Evaluation of Dementia. *Med Clin North Am.* mai 2022;106(3):471-82.
37. Jack CR. Advances in Alzheimer's disease research over the past two decades. *Lancet Neurol.* oct 2022;21(10):866-9.
38. Jack CR, Bennett DA, Blennow K, Carrillo MC, Dunn B, Haeberlein SB, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* avr 2018;14(4):535-62.
39. Dubois B, Villain N, Frisoni GB, Rabinovici GD, Sabbagh M, Cappa S, et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: recommendations of the International Working Group. *Lancet Neurol.* juin 2021;20(6):484-96.
40. Knopman DS, Jack CR, Lundt ES, Weigand SD, Vemuri P, Lowe VJ, et al. Evolution of neurodegeneration-imaging biomarkers from clinically normal to dementia in the Alzheimer disease spectrum. *Neurobiol Aging.* oct 2016;46:32-42.

41. Laforce R, Tosun D, Ghosh P, Lehmann M, Madison CM, Weiner MW, et al. Parallel ICA of FDG-PET and PiB-PET in three conditions with underlying Alzheimer's pathology. *Neuroimage Clin.* 19 mars 2014;4:508-16.
42. Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol.* mars 2004;55(3):306-19.
43. Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, Chételat G, Holtzman DM, Hyman BT, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers.* 13 mai 2021;7(1):33.
44. Roberts RO, Aakre JA, Kremers WK, Vassilaki M, Knopman DS, Mielke MM, et al. Prevalence and Outcomes of Amyloid Positivity Among Persons Without Dementia in a Longitudinal, Population-Based Setting. *JAMA Neurol.* 1 août 2018;75(8):970-9.
45. Jagust WJ, Landau SM, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Temporal Dynamics of β -Amyloid Accumulation in Aging and Alzheimer Disease. *Neurology.* 2 mars 2021;96(9):e1347-57.
46. Jack CR, Therneau TM, Weigand SD, Wiste HJ, Knopman DS, Vemuri P, et al. Prevalence of Biologically vs Clinically Defined Alzheimer Spectrum Entities Using the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Research Framework. *JAMA Neurol.* 15 juill 2019;76(10):1174-83.
47. Xia CF, Arteaga J, Chen G, Gangadharmath U, Gomez LF, Kasi D, et al. [18 F]T807, a novel tau positron emission tomography imaging agent for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* nov 2013;9(6):666-76.
48. Pascoal TA, Therriault J, Benedet AL, Savard M, Lussier FZ, Chamoun M, et al. 18F-MK-6240 PET for early and late detection of neurofibrillary tangles. *Brain.* 1 sept 2020;143(9):2818-30.
49. van Oostveen WM, de Lange ECM. Imaging Techniques in Alzheimer's Disease: A Review of Applications in Early Diagnosis and Longitudinal Monitoring. *Int J Mol Sci.* 20 févr 2021;22(4):2110.
50. Zetterberg H, Bendlin BB. Biomarkers for Alzheimer's disease-preparing for a new era of disease-modifying therapies. *Mol Psychiatry.* janv 2021;26(1):296-308.
51. Molinuevo JL, Ayton S, Batrla R, Bednar MM, Bittner T, Cummings J, et al. Current state of Alzheimer's fluid biomarkers. *Acta Neuropathol.* déc 2018;136(6):821-53.
52. Hansson O, Zetterberg H, Buchhave P, Andreasson U, Londos E, Minthon L, et al. Prediction of Alzheimer's disease using the CSF A β 42/A β 40 ratio in patients with mild cognitive impairment. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2007;23(5):316-20.
53. Mattsson N, Zetterberg H, Hansson O, Andreasen N, Parnetti L, Jonsson M, et al. CSF biomarkers and incipient Alzheimer disease in patients with mild cognitive impairment. *JAMA.* 22 juill 2009;302(4):385-93.
54. Janelidze S, Stomrud E, Smith R, Palmqvist S, Mattsson N, Airey DC, et al. Cerebrospinal fluid p-tau217 performs better than p-tau181 as a biomarker of Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 3 avr 2020;11(1):1683.
55. Kern S, Syrjanen JA, Blennow K, Zetterberg H, Skoog I, Waern M, et al. Association of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein With Risk of Mild Cognitive Impairment Among Individuals Without Cognitive Impairment. *JAMA Neurol.* 1 févr 2019;76(2):187-93.
56. Tarawneh R, D'Angelo G, Crimmins D, Herries E, Griest T, Fagan AM, et al. Diagnostic and Prognostic Utility of the Synaptic Marker Neurogranin in Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 1 mai 2016;73(5):561-71.
57. Janelidze S, Teunissen CE, Zetterberg H, Allué JA, Sarasa L, Eichenlaub U, et al. Head-to-Head Comparison of 8 Plasma Amyloid- β 42/40 Assays in Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 1 nov 2021;78(11):1375-82.
58. West T, Kirmess KM, Meyer MR, Holubasch MS, Knapik SS, Hu Y, et al. A blood-based diagnostic test incorporating plasma A β 42/40 ratio, ApoE proteotype, and age accurately identifies brain amyloid status: findings from a multi cohort validity analysis. *Mol Neurodegener.* 1 mai 2021;16(1):30.
59. Janelidze S, Mattsson N, Palmqvist S, Smith R, Beach TG, Serrano GE, et al. Plasma P-tau181 in Alzheimer's disease: relationship to other biomarkers, differential diagnosis, neuropathology and longitudinal progression to Alzheimer's dementia. *Nat Med.* mars 2020;26(3):379-86.

60. Guo Y, Huang YY, Shen XN, Chen SD, Hu H, Wang ZT, et al. Characterization of Alzheimer's tau biomarker discordance using plasma, CSF, and PET. *Alzheimer's Research & Therapy*. 4 mai 2021;13(1):93.
61. Thal DR, Rüb U, Orantes M, Braak H. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*. 25 juin 2002;58(12):1791-800.
62. Sengoku R. Aging and Alzheimer's disease pathology. *Neuropathology*. 2020;40(1):22-9.
63. Candela S, Giubilei F, Orzi F. Heterogeneous pathologies associated with dementia in Parkinsonism share a prion-like spreading mechanism. *Arch Ital Biol*. déc 2013;151(4):169-78.
64. Nixon RA. Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease. *FASEB J*. juill 2017;31(7):2729-43.
65. Sheppard O, Coleman M. Alzheimer's Disease: Etiology, Neuropathology and Pathogenesis. In: Huang X, éditeur. *Alzheimer's Disease: Drug Discovery* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2020 [cité 25 sept 2023]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK566126/>
66. Hefter D, Ludewig S, Draguhn A, Korte M. Amyloid, APP, and Electrical Activity of the Brain. *Neuroscientist*. juin 2020;26(3):231-51.
67. Pfundstein G, Nikonenko AG, Sytnyk V. Amyloid precursor protein (APP) and amyloid β (A β) interact with cell adhesion molecules: Implications in Alzheimer's disease and normal physiology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [Internet]. 2022 [cité 10 sept 2023];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.969547>
68. Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, et al. The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci*. 18 juill 2007;27(29):7817-26.
69. Rice HC, de Malmazet D, Schreurs A, Frere S, Van Molle I, Volkov AN, et al. Secreted amyloid- β precursor protein functions as a GABABR1a ligand to modulate synaptic transmission. *Science*. 11 janv 2019;363(6423):eaao4827.
70. Hick M, Herrmann U, Weyer SW, Mallm JP, Tschäpe JA, Borgers M, et al. Acute function of secreted amyloid precursor protein fragment APPs α in synaptic plasticity. *Acta Neuropathol*. janv 2015;129(1):21-37.
71. Tharp WG, Sarkar IN. Origins of amyloid- β . *BMC Genomics*. 30 avr 2013;14:290.
72. Zimbone S, Monaco I, Gianì F, Pandini G, Copani AG, Giuffrida ML, et al. Amyloid Beta monomers regulate cyclic adenosine monophosphate response element binding protein functions by activating type-1 insulin-like growth factor receptors in neuronal cells. *Aging Cell*. 2018;17(1):e12684.
73. Andrade-Guerrero J, Santiago-Balmaseda A, Jeronimo-Aguilar P, Vargas-Rodríguez I, Cadena-Suárez AR, Sánchez-Garibay C, et al. Alzheimer's Disease: An Updated Overview of Its Genetics. *Int J Mol Sci*. 13 févr 2023;24(4):3754.
74. Rossor MN, Fox NC, Mummery CJ, Schott JM, Warren JD. The diagnosis of young-onset dementia. *Lancet Neurol*. août 2010;9(8):793-806.
75. Head E, Lott IT, Wilcock DM, Lemere CA. Aging in Down Syndrome and the Development of Alzheimer's Disease Neuropathology. *Curr Alzheimer Res*. 2016;13(1):18-29.
76. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, et al. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. janv 2006;38(1):24-6.
77. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet*. août 1992;1(5):345-7.
78. Di Fede G, Catania M, Morbin M, Rossi G, Suardi S, Mazzoleni G, et al. A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science*. 13 mars 2009;323(5920):1473-7.

79. Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Eckman C, et al. An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science*. 27 mai 1994;264(5163):1336-40.
80. Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1 oct 2012;2(10):a006296.
81. Sun L, Zhou R, Yang G, Shi Y. Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A β 42 and A β 40 peptides by γ -secretase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24 janv 2017;114(4):E476-85.
82. Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. avr 1997;20(4):154-9.
83. Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*. 18 sept 1993;342(8873):697-9.
84. Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, et al. apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest*. déc 2008;118(12):4002-13.
85. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, et al. The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol Psychiatry*. oct 2021;26(10):5481-503.
86. Bellenguez C, Küçükali F, Jansen IE, Kleindam L, Moreno-Grau S, Amin N, et al. New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nat Genet*. avr 2022;54(4):412-36.
87. Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*. déc 2013;45(12):1452-8.
88. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. juin 2016;8(6):595-608.
89. Bateman RJ, Munsell LY, Morris JC, Swarm R, Yarasheski KE, Holtzman DM. Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat Med*. juill 2006;12(7):856-61.
90. Engelhardt B, Carare RO, Bechmann I, Flügel A, Laman JD, Weller RO. Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. sept 2016;132(3):317-38.
91. Agrawal N, Skelton AA. Structure and Function of Alzheimer's Amyloid β Proteins from Monomer to Fibrils: A Mini Review. *Protein J*. août 2019;38(4):425-34.
92. Iannuzzi C, Irace G, Sirangelo I. Differential effects of glycation on protein aggregation and amyloid formation. *Front Mol Biosci*. 2014;1:9.
93. Kaye R, Lasagna-Reeves CA. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J Alzheimers Dis*. 2013;33 Suppl 1:S67-78.
94. Li S, Selkoe DJ. A mechanistic hypothesis for the impairment of synaptic plasticity by soluble A β oligomers from Alzheimer's brain. *J Neurochem*. sept 2020;154(6):583-97.
95. Dresser L, Hunter P, Yendybayeva F, Hargreaves AL, Howard JAL, Evans GJO, et al. Amyloid- β oligomerization monitored by single-molecule stepwise photobleaching. *Methods (San Diego, Calif)*. sept 2021;193:80.
96. Lu JX, Qiang W, Yau WM, Schwieters CD, Meredith SC, Tycko R. Molecular structure of β -amyloid fibrils in Alzheimer's disease brain tissue. *Cell*. 12 sept 2013;154(6):1257-68.
97. Young LJ, Kaminski Schierle GS, Kaminski CF. Imaging A β (1-42) fibril elongation reveals strongly polarised growth and growth incompetent states. *Phys Chem Chem Phys*. 25 oct 2017;19(41):27987-96.
98. Charidimou A, Gang Q, Werring DJ. Sporadic cerebral amyloid angiopathy revisited: recent insights into pathophysiology and clinical spectrum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. févr 2012;83(2):124-37.
99. Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, et al. Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10 mars 2009;106(10):4012-7.

100. Condello C, Yuan P, Schain A, Grutzendler J. Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques. *Nat Commun.* 29 janv 2015;6:6176.
101. Cai W, Wu T, Chen N. The Amyloid-Beta Clearance: From Molecular Targets to Glial and Neural Cells. *Biomolecules.* 7 févr 2023;13(2):313.
102. Qin Q, Teng Z, Liu C, Li Q, Yin Y, Tang Y. TREM2, microglia, and Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev.* avr 2021;195:111438.
103. Arranz AM, De Strooper B. The role of astroglia in Alzheimer's disease: pathophysiology and clinical implications. *Lancet Neurol.* avr 2019;18(4):406-14.
104. Van Eldik LJ, Carrillo MC, Cole PE, Feuerbach D, Greenberg BD, Hendrix JA, et al. The roles of inflammation and immune mechanisms in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y).* 30 mai 2016;2(2):99-109.
105. Imbimbo BP, Ippati S, Watling M, Imbimbo C. Role of monomeric amyloid- β in cognitive performance in Alzheimer's disease: Insights from clinical trials with secretase inhibitors and monoclonal antibodies. *Pharmacol Res.* janv 2023;187:106631.
106. Walsh DM, Selkoe DJ. Amyloid β -protein and beyond: the path forward in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol.* avr 2020;61:116-24.
107. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature.* 1 sept 2016;537(7618):50-6.
108. van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, et al. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine.* 5 janv 2023;388(1):9-21.
109. Frisoni GB, Altomare D, Thal DR, Ribaldi F, van der Kant R, Ossenkoppele R, et al. The probabilistic model of Alzheimer disease: the amyloid hypothesis revised. *Nat Rev Neurosci.* janv 2022;23(1):53-66.
110. Budd Haeberlein S, Aisen PS, Barkhof F, Chalkias S, Chen T, Cohen S, et al. Two Randomized Phase 3 Studies of Aducanumab in Early Alzheimer's Disease. *J Prev Alzheimers Dis.* 2022;9(2):197-210.
111. Sims JR, Zimmer JA, Evans CD, Lu M, Ardayfio P, Sparks J, et al. Donanemab in Early Symptomatic Alzheimer Disease: The TRAILBLAZER-ALZ 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 8 août 2023;330(6):512-27.
112. Cummings J, Lee G, Ritter A, Sabbagh M, Zhong K. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Alzheimers Dement (N Y).* 2019;5:272-93.
113. Goedert M, Jakes R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J.* déc 1990;9(13):4225-30.
114. Hyman BT, Augustinack JC, Ingelsson M. Transcriptional and conformational changes of the tau molecule in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 3 janv 2005;1739(2-3):150-7.
115. Strang KH, Golde TE, Giasson BI. MAPT mutations, tauopathy, and mechanisms of neurodegeneration. *Lab Invest.* juill 2019;99(7):912-28.
116. Kühn R, Mahajan A, Canoll P, Hargus G. Human Induced Pluripotent Stem Cell Models of Frontotemporal Dementia With Tau Pathology. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:766773.
117. Muralidar S, Ambi SV, Sekaran S, Thirumalai D, Palaniappan B. Role of tau protein in Alzheimer's disease: The prime pathological player. *Int J Biol Macromol.* 15 nov 2020;163:1599-617.
118. Vossel KA, Zhang K, Brodbeck J, Daub AC, Sharma P, Finkbeiner S, et al. Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport. *Science.* 8 oct 2010;330(6001):198.
119. Guo T, Zhang D, Zeng Y, Huang TY, Xu H, Zhao Y. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 16 juill 2020;15(1):40.

120. Ahmed T, Van der Jeugd A, Blum D, Galas MC, D’Hooge R, Buee L, et al. Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion. *Neurobiol Aging*. nov 2014;35(11):2474-8.
121. Sexton C, Snyder H, Beher D, Boxer AL, Brannely P, Brion JP, et al. Current directions in tau research: Highlights from Tau 2020. *Alzheimers Dement*. mai 2022;18(5):988-1007.
122. Scholz T, Mandelkow E. Transport and diffusion of Tau protein in neurons. *Cell Mol Life Sci*. août 2014;71(16):3139-50.
123. León-Espinosa G, García E, García-Escudero V, Hernández F, Defelipe J, Avila J. Changes in tau phosphorylation in hibernating rodents. *J Neurosci Res*. juill 2013;91(7):954-62.
124. Köpke E, Tung YC, Shaikh S, Alonso AC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 15 nov 1993;268(32):24374-84.
125. Tapia-Rojas C, Cabezas-Opazo F, Deaton CA, Vergara EH, Johnson GVW, Quintanilla RA. It’s all about tau. *Prog Neurobiol*. avr 2019;175:54-76.
126. Danis C, Dupré E, Hanouille X, Landrieu I, Lasorsa A, Neves JF, et al. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Insights into Tau Structure in Solution: Impact of Post-translational Modifications. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1184:35-45.
127. Mair W, Muntel J, Tepper K, Tang S, Biernat J, Seeley WW, et al. FLEXITau: Quantifying Post-translational Modifications of Tau Protein in Vitro and in Human Disease. *Anal Chem*. 5 avr 2016;88(7):3704-14.
128. Stern JL, Lessard DV, Hoepflich GJ, Morfini GA, Berger CL. Phosphoregulation of Tau modulates inhibition of kinesin-1 motility. *MBoC*. 15 avr 2017;28(8):1079-87.
129. Thal DR, Tomé SO. The central role of tau in Alzheimer’s disease: From neurofibrillary tangle maturation to the induction of cell death. *Brain Res Bull*. nov 2022;190:204-17.
130. Fan X, Xia L, Zhou Z, Qiu Y, Zhao C, Yin X, et al. Tau Acts in Concert With Kinase/Phosphatase Underlying Synaptic Dysfunction. *Front Aging Neurosci*. 2022;14:908881.
131. Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci*. oct 2005;22(8):1942-50.
132. Xia Y, Prokop S, Giasson BI. “Don’t Phos Over Tau”: recent developments in clinical biomarkers and therapies targeting tau phosphorylation in Alzheimer’s disease and other tauopathies. *Molecular Neurodegeneration*. 5 juin 2021;16(1):37.
133. Kontaxi C, Piccardo P, Gill AC. Lysine-Directed Post-translational Modifications of Tau Protein in Alzheimer’s Disease and Related Tauopathies. *Front Mol Biosci*. 2017;4:56.
134. Min SW, Chen X, Tracy TE, Li Y, Zhou Y, Wang C, et al. Critical role of acetylation in tau-mediated neurodegeneration and cognitive deficits. *Nat Med*. oct 2015;21(10):1154-62.
135. Tracy T, Claiborn KC, Gan L. Regulation of Tau Homeostasis and Toxicity by Acetylation. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1184:47-55.
136. Cripps D, Thomas SN, Jeng Y, Yang F, Davies P, Yang AJ. Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation. *J Biol Chem*. 21 avr 2006;281(16):10825-38.
137. Keck S, Nitsch R, Grune T, Ullrich O. Proteasome inhibition by paired helical filament-tau in brains of patients with Alzheimer’s disease. *J Neurochem*. avr 2003;85(1):115-22.
138. Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer’s disease. *Nat Med*. août 1996;2(8):871-5.

139. Losev Y, Paul A, Frenkel-Pinter M, Abu-Hussein M, Khalaila I, Gazit E, et al. Novel model of secreted human tau protein reveals the impact of the abnormal N-glycosylation of tau on its aggregation propensity. *Sci Rep.* 19 févr 2019;9(1):2254.
140. Ma J, Hart GW. Analysis of Protein O-GlcNAcylation by Mass Spectrometry. *Curr Protoc Protein Sci.* 2 févr 2017;87:24.10.1-24.10.16.
141. Liu F, Shi J, Tanimukai H, Gu J, Gu J, Grundke-Iqbal I, et al. Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain.* juill 2009;132(Pt 7):1820-32.
142. Guo T, Noble W, Hanger DP. Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol.* 2017;133(5):665-704.
143. Gu JL, Liu F. Tau in Alzheimer's Disease: Pathological Alterations and an Attractive Therapeutic Target. *Curr Med Sci.* déc 2020;40(6):1009-21.
144. Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, et al. Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19 août 2003;100(17):10032-7.
145. Rissman RA, Poon WW, Blurton-Jones M, Oddo S, Torp R, Vitek MP, et al. Caspase-cleavage of tau is an early event in Alzheimer disease tangle pathology. *J Clin Invest.* juill 2004;114(1):121-30.
146. Ferreira A, Bigio EH. Calpain-Mediated Tau Cleavage: A Mechanism Leading to Neurodegeneration Shared by Multiple Tauopathies. *Mol Med.* 2011;17(7-8):676-85.
147. Zhang Z, Song M, Liu X, Kang SS, Kwon IS, Duong DM, et al. Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. *Nat Med.* nov 2014;20(11):1254-62.
148. Avila J, Jiménez JS, Sayas CL, Bolós M, Zabala JC, Rivas G, et al. Tau Structures. *Frontiers in Aging Neuroscience [Internet].* 2016 [cité 11 sept 2023];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2016.00262>
149. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem.* 5 mai 1986;261(13):6084-9.
150. Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *J Alzheimers Dis.* 2013;33 Suppl 1:S123-139.
151. Park SA, Ahn SI, Gallo JM. Tau mis-splicing in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *BMB Rep.* août 2016;49(8):405-13.
152. Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K. Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol.* nov 2011;70(11):960-9.
153. Frost B, Jacks RL, Diamond MI. Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem.* 8 mai 2009;284(19):12845-52.
154. Narasimhan S, Guo JL, Changoalkar L, Stieber A, McBride JD, Silva LV, et al. Pathological Tau Strains from Human Brains Recapitulate the Diversity of Tauopathies in Nontransgenic Mouse Brain. *J Neurosci.* 22 nov 2017;37(47):11406-23.
155. Jia L, Qiu Q, Zhang H, Chu L, Du Y, Zhang J, et al. Concordance between the assessment of A β 42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral blood neuronal-derived exosomes and cerebrospinal fluid. *Alzheimers Dement.* août 2019;15(8):1071-80.
156. Wu JW, Hussaini SA, Bastille IM, Rodriguez GA, Mrejeru A, Rilett K, et al. Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. *Nat Neurosci.* août 2016;19(8):1085-92.
157. Wu JW, Herman M, Liu L, Simoes S, Acker CM, Figueroa H, et al. Small misfolded Tau species are internalized via bulk endocytosis and anterogradely and retrogradely transported in neurons. *J Biol Chem.* 18 janv 2013;288(3):1856-70.
158. Eckert A, Nisbet R, Grimm A, Götz J. March separate, strike together--role of phosphorylated TAU in mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* août 2014;1842(8):1258-66.

159. Dickstein DL, Brautigam H, Stockton SD, Schmeidler J, Hof PR. Changes in dendritic complexity and spine morphology in transgenic mice expressing human wild-type tau. *Brain Struct Funct.* mars 2010;214(2-3):161-79.
160. McInnes J, Wierda K, Snellinx A, Bounti L, Wang YC, Stancu IC, et al. Synaptogyrin-3 Mediates Presynaptic Dysfunction Induced by Tau. *Neuron.* 21 févr 2018;97(4):823-835.e8.
161. Wang L, Jiang Q, Chu J, Lin L, Li XG, Chai GS, et al. Expression of Tau40 induces activation of cultured rat microglial cells. *PLoS One.* 2013;8(10):e76057.
162. Pita-Almenar JD, Zou S, Colbert CM, Eskin A. Relationship between increase in astrocytic GLT-1 glutamate transport and late-LTP. *Learn Mem.* déc 2012;19(12):615-26.
163. Ke YD, Suchowerska AK, van der Hoven J, De Silva DM, Wu CW, van Eersel J, et al. Lessons from Tau-Deficient Mice. *Int J Alzheimers Dis.* 2012;2012:873270.
164. New Data Presented at AD/PD™ 2023 Show Biogen's BIIB080 (MAPT ASO) Substantially Reduced Tau Protein Levels in Patients with Early-stage Alzheimer's Disease | Biogen [Internet]. [cité 11 sept 2023]. Disponible sur: <https://investors.biogen.com/news-releases/news-release-details/new-data-presented-adpdtm-2023-show-biogens-biib080-mapt-aso>
165. Serenó L, Coma M, Rodríguez M, Sánchez-Ferrer P, Sánchez MB, Gich I, et al. A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiol Dis.* sept 2009;35(3):359-67.
166. Bhat RV, Andersson U, Andersson S, Knerr L, Bauer U, Sundgren-Andersson AK. The Conundrum of GSK3 Inhibitors: Is it the Dawn of a New Beginning? *J Alzheimers Dis.* 2018;64(s1):S547-54.
167. Ryves WJ, Harwood AJ. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem Biophys Res Commun.* 26 janv 2001;280(3):720-5.
168. Haussmann R, Noppes F, Brandt MD, Bauer M, Donix M. Minireview: Lithium: a therapeutic option in Alzheimer's disease and its prodromal stages? *Neuroscience Letters.* 24 août 2021;760:136044.
169. van Dyck CH, Nygaard HB, Chen K, Donohue MC, Raman R, Rissman RA, et al. Effect of AZD0530 on Cerebral Metabolic Decline in Alzheimer Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* 1 oct 2019;76(10):1219-29.
170. Dubois B, López-Arrieta J, Lipschitz S, Triantafyllos D, Spiru L, Moroz S, et al. Masitinib for mild-to-moderate Alzheimer's disease: results from a randomized, placebo-controlled, phase 3, clinical trial. *Alzheimers Res Ther.* 28 févr 2023;15:39.
171. Jadhav S, Avila J, Schöll M, Kovacs GG, Kövari E, Skrabana R, et al. A walk through tau therapeutic strategies. *Acta Neuropathol Commun.* 15 févr 2019;7(1):22.
172. Soeda Y, Takashima A. New Insights Into Drug Discovery Targeting Tau Protein. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:590896.
173. Mullard A. Failure of first anti-tau antibody in Alzheimer disease highlights risks of history repeating. *Nat Rev Drug Discov.* janv 2021;20(1):3-5.
174. Rayman JB. Focusing on oligomeric tau as a therapeutic target in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Expert Opin Ther Targets.* 2023;27(4-5):269-79.
175. Novak P, Kovacech B, Katina S, Schmidt R, Scheltens P, Kontsekova E, et al. ADAMANT: a placebo-controlled randomized phase 2 study of AADvac1, an active immunotherapy against pathological tau in Alzheimer's disease. *Nat Aging.* juin 2021;1(6):521-34.
176. AC Immune Announces Interim Phase 1b/2a Data Showing that its ACI-35.030 Anti-pTau Alzheimer's Vaccine Generates a Potent Immune Response | AC Immune SA [Internet]. [cité 13 oct 2023]. Disponible sur: <https://ir.acimmune.com/news-releases/news-release-details/ac-immune-announces-interim-phase-1b2a-data-showing-its-aci>
177. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron.* 31 juill 2003;39(3):409-21.

178. Choi SH, Kim YH, Hebisch M, Sliwinski C, Lee S, D'Avanzo C, et al. A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature*. 13 nov 2014;515(7526):274-8.
179. De Felice FG, Wu D, Lambert MP, Fernandez SJ, Velasco PT, Lacor PN, et al. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol Aging*. sept 2008;29(9):1334-47.
180. Sayas CL, Ávila J. GSK-3 and Tau: A Key Duet in Alzheimer's Disease. *Cells*. 24 mars 2021;10(4):721.
181. Alvarez A, Toro R, Cáceres A, Maccioni RB. Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents beta-amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett*. 15 oct 1999;459(3):421-6.
182. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*. 4 oct 1996;274(5284):99-102.
183. Meftah S, Gan J. Alzheimer's disease as a synaptopathy: Evidence for dysfunction of synapses during disease progression. *Front Synaptic Neurosci*. 2023;15:1129036.
184. Cuestas Torres DM, Cardenas FP. Synaptic plasticity in Alzheimer's disease and healthy aging. *Rev Neurosci*. 28 avr 2020;31(3):245-68.
185. Köhr G. NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res*. 1 nov 2006;326(2):439-46.
186. Kim K, Lakhanpal G, Lu HE, Khan M, Suzuki A, Hayashi MK, et al. A Temporary Gating of Actin Remodeling during Synaptic Plasticity Consists of the Interplay between the Kinase and Structural Functions of CaMKII. *Neuron*. 19 août 2015;87(4):813-26.
187. Barone E, Mosser S, Fraering PC. Inactivation of brain Cofilin-1 by age, Alzheimer's disease and γ -secretase. *Biochim Biophys Acta*. déc 2014;1842(12 Pt A):2500-9.
188. Benarroch EE. Glutamatergic synaptic plasticity and dysfunction in Alzheimer disease: Emerging mechanisms. *Neurology*. 17 juill 2018;91(3):125-32.
189. Tashiro A, Yuste R. Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. *Mol Cell Neurosci*. juill 2004;26(3):429-40.
190. Mateos-Aparicio P, Rodríguez-Moreno A. Calcium Dynamics and Synaptic Plasticity. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1131:965-84.
191. Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci*. juill 2003;26(7):360-8.
192. Jaworski T, Banach-Kasper E, Galec K. GSK-3 β at the Intersection of Neuronal Plasticity and Neurodegeneration. *Neural Plast*. 2019;2019:4209475.
193. Muller D, Toni N, Buchs PA. Spine changes associated with long-term potentiation. *Hippocampus*. 2000;10(5):596-604.
194. Zhou Q, Homma KJ, Poo M ming. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*. 2 déc 2004;44(5):749-57.
195. Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci*. nov 2001;4(11):1086-92.
196. Colom-Cadena M, Spires-Jones T, Zetterberg H, Blennow K, Caggiano A, DeKosky ST, et al. The clinical promise of biomarkers of synapse damage or loss in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 2 mars 2020;12:21.
197. DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*. mai 1990;27(5):457-64.
198. Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*. oct 1991;30(4):572-80.

199. Scheff SW, Price DA. Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: Neocortex and hippocampus. *Journal of Alzheimer's Disease*. 1 janv 2006;9(s3):101-15.
200. Blennow K, Bogdanovic N, Alafuzoff I, Ekman R, Davidsson P. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: relation to severity of dementia, but not to senile plaques, neurofibrillary tangles, or the ApoE4 allele. *J Neural Transm (Vienna)*. 1996;103(5):603-18.
201. Sze CI, Troncoso JC, Kawas C, Mouton P, Price DL, Martin LJ. Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. août 1997;56(8):933-44.
202. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 25 oct 2002;298(5594):789-91.
203. Davies CA, Mann DMA, Sumpter PQ, Yates PO. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*. 1 avr 1987;78(2):151-64.
204. Masliah E, Mallory M, Alford M, DeTeresa R, Hansen LA, McKeel DW, et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*. 9 janv 2001;56(1):127-9.
205. Mishizen-Eberz AJ, Rissman RA, Carter TL, Ikonovic MD, Wolfe BB, Armstrong DM. Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Dis*. févr 2004;15(1):80-92.
206. Pereira JB, Janelidze S, Ossenkoppele R, Kvartsberg H, Brinkmalm A, Mattsson-Carlgen N, et al. Untangling the association of amyloid- β and tau with synaptic and axonal loss in Alzheimer's disease. *Brain*. 12 févr 2021;144(1):310-24.
207. Lleó A, Núñez-Llaves R, Alcolea D, Chiva C, Balateu-Pañós D, Colom-Cadena M, et al. Changes in Synaptic Proteins Precede Neurodegeneration Markers in Preclinical Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid. *Mol Cell Proteomics*. mars 2019;18(3):546-60.
208. Scheff SW, Price DA. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol Aging*. déc 2003;24(8):1029-46.
209. Neuman KM, Molina-Campos E, Musial TF, Price AL, Oh KJ, Wolke ML, et al. Evidence for Alzheimer's disease-linked synapse loss and compensation in mouse and human hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Brain Struct Funct*. nov 2015;220(6):3143-65.
210. Bi D, Wen L, Wu Z, Shen Y. GABAergic dysfunction in excitatory and inhibitory (E/I) imbalance drives the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. sept 2020;16(9):1312-29.
211. Govindpani K, Turner C, Waldvogel HJ, Faull RLM, Kwakowsky A. Impaired Expression of GABA Signaling Components in the Alzheimer's Disease Middle Temporal Gyrus. *Int J Mol Sci*. 18 nov 2020;21(22):8704.
212. Spires TL, Meyer-Luehmann M, Stern EA, McLean PJ, Skoch J, Nguyen PT, et al. Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci*. 3 août 2005;25(31):7278-87.
213. Sasaguri H, Nilsson P, Hashimoto S, Nagata K, Saito T, De Strooper B, et al. APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies. *EMBO J*. 1 sept 2017;36(17):2473-87.
214. Saito T, Matsuba Y, Mihira N, Takano J, Nilsson P, Itohara S, et al. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. mai 2014;17(5):661-3.
215. Stephen TL, Tamagnini F, Piegsa J, Sung K, Harvey J, Oliver-Evans A, et al. Imbalance in the response of pre- and post-synaptic components to amyloidopathy. *Sci Rep*. 16 oct 2019;9(1):14837.
216. Spires-Jones TL, Meyer-Luehmann M, Osetek JD, Jones PB, Stern EA, Bacskai BJ, et al. Impaired Spine Stability Underlies Plaque-Related Spine Loss in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Am J Pathol*. oct 2007;171(4):1304-11.

217. Targa Dias Anastacio H, Matosin N, Ooi L. Neuronal hyperexcitability in Alzheimer's disease: what are the drivers behind this aberrant phenotype? *Transl Psychiatry*. 22 juin 2022;12(1):1-14.
218. Spoletti E, Krashia P, La Barbera L, Nobili A, Lupascu CA, Giacalone E, et al. Early derailment of firing properties in CA1 pyramidal cells of the ventral hippocampus in an Alzheimer's disease mouse model. *Exp Neurol*. avr 2022;350:113969.
219. Arroyo-García LE, Isla AG, Andrade-Talavera Y, Balleza-Tapia H, Loera-Valencia R, Alvarez-Jimenez L, et al. Impaired spike-gamma coupling of area CA3 fast-spiking interneurons as the earliest functional impairment in the AppNL-G-F mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2021;26(10):5557-67.
220. Müller UC, Deller T, Korte M. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci*. mai 2017;18(5):281-98.
221. Weyer SW, Zagrebelsky M, Herrmann U, Hick M, Ganss L, Gobbert J, et al. Comparative analysis of single and combined APP/APLP knockouts reveals reduced spine density in APP-KO mice that is prevented by APP α expression. *Acta Neuropathol Commun*. 31 mars 2014;2:36.
222. Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Clemente AS, Velasco PT, Wood M, et al. Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 24 janv 2007;27(4):796-807.
223. Pickett EK, Koffie RM, Wegmann S, Henstridge CM, Herrmann AG, Colom-Cadena M, et al. Non-Fibrillar Oligomeric Amyloid- β within Synapses. *J Alzheimers Dis*. 30 mai 2016;53(3):787-800.
224. Guntupalli S, Widagdo J, Anggono V. Amyloid- β -Induced Dysregulation of AMPA Receptor Trafficking. *Neural Plast*. 2016;2016:3204519.
225. Pei YA, Davies J, Zhang M, Zhang HT. The Role of Synaptic Dysfunction in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2020;76(1):49-62.
226. O'Riordan KJ, Hu NW, Rowan MJ. A β Facilitates LTD at Schaffer Collateral Synapses Preferentially in the Left Hippocampus. *Cell Rep*. 20 févr 2018;22(8):2053-65.
227. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, et al. APP processing and synaptic function. *Neuron*. 27 mars 2003;37(6):925-37.
228. Roselli F, Tirard M, Lu J, Hutzler P, Lamberti P, Livrea P, et al. Soluble beta-amyloid1-40 induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses. *J Neurosci*. 30 nov 2005;25(48):11061-70.
229. Heredia L, Helguera P, de Olmos S, Kedikian G, Solá Vigo F, LaFerla F, et al. Phosphorylation of actin-depolymerizing factor/cofilin by LIM-kinase mediates amyloid beta-induced degeneration: a potential mechanism of neuronal dystrophy in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 14 juin 2006;26(24):6533-42.
230. Menkes-Caspi N, Yamin HG, Kellner V, Spires-Jones TL, Cohen D, Stern EA. Pathological tau disrupts ongoing network activity. *Neuron*. 4 mars 2015;85(5):959-66.
231. Jackson JS, Johnson JD, Meftah S, Murray TK, Ahmed Z, Fasiolo M, et al. Differential aberrant structural synaptic plasticity in axons and dendrites ahead of their degeneration in tauopathy [Internet]. *bioRxiv*; 2020 [cité 17 août 2023]. p. 2020.04.29.067629. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.29.067629v1>
232. Coleman PD, Yao PJ. Synaptic slaughter in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. déc 2003;24(8):1023-7.
233. Tai HC, Wang BY, Serrano-Pozo A, Frosch MP, Spires-Jones TL, Hyman BT. Frequent and symmetric deposition of misfolded tau oligomers within presynaptic and postsynaptic terminals in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*. 21 oct 2014;2(1):146.
234. Kopeikina KJ, Carlson GA, Pitstick R, Ludvigson AE, Peters A, Luebke JI, et al. Tau accumulation causes mitochondrial distribution deficits in neurons in a mouse model of tauopathy and in human Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol*. oct 2011;179(4):2071-82.

235. Usenovic M, Niroomand S, Drolet RE, Yao L, Gaspar RC, Hatcher NG, et al. Internalized Tau Oligomers Cause Neurodegeneration by Inducing Accumulation of Pathogenic Tau in Human Neurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *J Neurosci*. 21 oct 2015;35(42):14234-50.
236. Fá M, Puzzo D, Piacentini R, Staniszewski A, Zhang H, Baltrons MA, et al. Extracellular Tau Oligomers Produce An Immediate Impairment of LTP and Memory. *Sci Rep*. 20 janv 2016;6:19393.
237. Miyamoto T, Stein L, Thomas R, Djukic B, Taneja P, Knox J, et al. Phosphorylation of tau at Y18, but not tau-fyn binding, is required for tau to modulate NMDA receptor-dependent excitotoxicity in primary neuronal culture. *Mol Neurodegener*. 19 mai 2017;12(1):41.
238. Bhaskar K, Yen SH, Lee G. Disease-related modifications in tau affect the interaction between Fyn and Tau. *J Biol Chem*. 21 oct 2005;280(42):35119-25.
239. Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, et al. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron*. 22 déc 2010;68(6):1067-81.
240. Teravskis PJ, Oxnard BR, Miller EC, Kemper L, Ashe KH, Liao D. Phosphorylation in two discrete tau domains regulates a stepwise process leading to postsynaptic dysfunction. *J Physiol*. mai 2021;599(9):2483-98.
241. Hill E, Karikari TK, Moffat KG, Richardson MJE, Wall MJ. Introduction of Tau Oligomers into Cortical Neurons Alters Action Potential Dynamics and Disrupts Synaptic Transmission and Plasticity. *eNeuro*. 2019;6(5):ENEURO.0166-19.2019.
242. Wu M, Zhang M, Yin X, Chen K, Hu Z, Zhou Q, et al. The role of pathological tau in synaptic dysfunction in Alzheimer's diseases. *Transl Neurodegener*. 10 nov 2021;10(1):45.
243. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Archives of General Psychiatry*. févr 2006;63(2):168-74.
244. Green RC, Cupples LA, Go R, Benke KS, Edeki T, Griffith PA, et al. Risk of dementia among white and African American relatives of patients with Alzheimer disease. *JAMA*. 16 janv 2002;287(3):329-36.
245. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, et al. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. sept 1993;90(17):8098-102.
246. Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet*. juin 1994;7(2):180-4.
247. Tam V, Patel N, Turcotte M, Bossé Y, Paré G, Meyre D. Benefits and limitations of genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*. août 2019;20(8):467-84.
248. Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*. oct 2009;41(10):1094-9.
249. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. oct 2009;41(10):1088-93.
250. Marioni RE, Harris SE, Zhang Q, McRae AF, Hagenaars SP, Hill WD, et al. GWAS on family history of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry*. 18 mai 2018;8(1):1-7.
251. Jansen IE, Savage JE, Watanabe K, Bryois J, Williams DM, Steinberg S, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat Genet*. mars 2019;51(3):404-13.
252. Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC, et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet*. mars 2019;51(3):414-30.
253. Wightman DP, Jansen IE, Savage JE, Shadrin AA, Bahrami S, Holland D, et al. A genome-wide association study with 1,126,563 individuals identifies new risk loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*. sept 2021;53(9):1276-82.

254. Andrews SJ, Renton AE, Fulton-Howard B, Podlesny-Drabiniok A, Marcora E, Goate AM. The complex genetic architecture of Alzheimer's disease: novel insights and future directions. *eBioMedicine*. 10 mars 2023;90:104511.
255. Gallagher MD, Chen-Plotkin AS. The Post-GWAS Era: From Association to Function. *Am J Hum Genet*. 3 mai 2018;102(5):717-30.
256. Hirschhorn JN. Genomewide association studies--illuminating biologic pathways. *N Engl J Med*. 23 avr 2009;360(17):1699-701.
257. Lambert JC, Ramirez A, Grenier-Boley B, Bellenguez C. Step by step: towards a better understanding of the genetic architecture of Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2 mai 2023;
258. Shademan B, Biray Avci C, Nikanfar M, Nourazarian A. Application of Next-Generation Sequencing in Neurodegenerative Diseases: Opportunities and Challenges. *Neuromolecular Med*. juin 2021;23(2):225-35.
259. Sims R, van der Lee SJ, Naj AC, Bellenguez C, Badarinarayan N, Jakobsdottir J, et al. Rare coding variants in *PLCG2*, *ABI3*, and *TREM2* implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Genet*. sept 2017;49(9):1373-84.
260. Bellenguez C, Charbonnier C, Grenier-Boley B, Quenez O, Le Guennec K, Nicolas G, et al. Contribution to Alzheimer's disease risk of rare variants in *TREM2*, *SORL1*, and *ABCA7* in 1779 cases and 1273 controls. *Neurobiol Aging*. nov 2017;59:220.e1-220.e9.
261. Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E, et al. *TREM2* variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 10 janv 2013;368(2):117-27.
262. Pottier C, Hannequin D, Coutant S, Rovelet-Lecrux A, Wallon D, Rousseau S, et al. High frequency of potentially pathogenic *SORL1* mutations in autosomal dominant early-onset Alzheimer disease. *Mol Psychiatry*. sept 2012;17(9):875-9.
263. Steinberg S, Stefansson H, Jonsson T, Johannsdottir H, Ingason A, Helgason H, et al. Loss-of-function variants in *ABCA7* confer risk of Alzheimer's disease. *Nat Genet*. mai 2015;47(5):445-7.
264. Bis JC, Jian X, Kunkle BW, Chen Y, Hamilton-Nelson KL, Bush WS, et al. Whole exome sequencing study identifies novel rare and common Alzheimer's-Associated variants involved in immune response and transcriptional regulation. *Mol Psychiatry*. août 2020;25(8):1859-75.
265. Holstege H, Hulsman M, Charbonnier C, Grenier-Boley B, Quenez O, Grozeva D, et al. Exome sequencing identifies rare damaging variants in *ATP8B4* and *ABCA1* as risk factors for Alzheimer's disease. *Nat Genet*. déc 2022;54(12):1786-94.
266. Jones L, Holmans PA, Hamshere ML, Harold D, Moskva V, Ivanov D, et al. Genetic evidence implicates the immune system and cholesterol metabolism in the aetiology of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 15 nov 2010;5(11):e13950.
267. Lambert JC, Grenier-Boley B, Chouraki V, Heath S, Zelenika D, Fievet N, et al. Implication of the immune system in Alzheimer's disease: evidence from genome-wide pathway analysis. *J Alzheimers Dis*. 2010;20(4):1107-18.
268. Bellenguez C, Grenier-Boley B, Lambert JC. Genetics of Alzheimer's disease: where we are, and where we are going. *Current Opinion in Neurobiology*. 1 avr 2020;61:40-8.
269. Dourlen P, Kilinc D, Malmanche N, Chapuis J, Lambert JC. The new genetic landscape of Alzheimer's disease: from amyloid cascade to genetically driven synaptic failure hypothesis? *Acta Neuropathologica*. 2019;138(2):221-36.
270. Prox J, Bernreuther C, Altmeyen H, Grendel J, Glatzel M, D'Hooge R, et al. Postnatal Disruption of the Disintegrin/Metalloproteinase *ADAM10* in Brain Causes Epileptic Seizures, Learning Deficits, Altered Spine Morphology, and Defective Synaptic Functions. *J Neurosci*. 7 août 2013;33(32):12915-28.
271. Kuhn PH, Colombo AV, Schusser B, Drey Mueller D, Wetzel S, Schepers U, et al. Systematic substrate identification indicates a central role for the metalloprotease *ADAM10* in axon targeting and synapse function. *De Strooper B, éditeur. eLife*. 23 janv 2016;5:e12748.
272. Fazzari P, Snellinx A, Sabanov V, Ahmed T, Serneels L, Gartner A, et al. Cell autonomous regulation of hippocampal circuitry via *Aph1b-γ-secretase/neuregulin 1* signalling. *Elife*. 2 juin 2014;3:e02196.

273. Yin RH, Yu JT, Tan L. The Role of SORL1 in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2015;51(3):909-18.
274. Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, et al. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20 sept 2005;102(38):13461-6.
275. Rohe M, Hartl D, Fjorback AN, Klose J, Willnow TE. SORLA-Mediated Trafficking of TrkB Enhances the Response of Neurons to BDNF. *PLOS ONE.* 19 août 2013;8(8):e72164.
276. Huang TY, Zhao Y, Jiang L lin, Li X, Liu Y, Sun Y, et al. SORLA attenuates EphA4 signaling and amyloid β -induced neurodegeneration. *Journal of Experimental Medicine.* 7 nov 2017;214(12):3669-85.
277. Chapuis J, Flaig A, Grenier-Boley B, Eysert F, Pottiez V, Deloison G, et al. Genome-wide, high-content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 as a major modulator of APP metabolism. *Acta Neuropathol.* juin 2017;133(6):955-66.
278. Eysert F, Coulon A, Boscher E, Vreulx AC, Flaig A, Mendes T, et al. Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 (Kindlin-2) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner. *Mol Psychiatry.* oct 2021;26(10):5592-607.
279. Chapuis J, Hansmannel F, Gistelinc M, Mounier A, Van Cauwenberghe C, Kolen KV, et al. Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol Psychiatry.* nov 2013;18(11):1225-34.
280. Sartori M, Mendes T, Desai S, Lasorsa A, Herledan A, Malmanche N, et al. BIN1 recovers tauopathy-induced long-term memory deficits in mice and interacts with Tau through Thr348 phosphorylation. *Acta Neuropathol.* oct 2019;138(4):631-52.
281. Miyagawa T, Ebinuma I, Morohashi Y, Hori Y, Young Chang M, Hattori H, et al. BIN1 regulates BACE1 intracellular trafficking and amyloid- β production. *Hum Mol Genet.* 15 juill 2016;25(14):2948-58.
282. De Rossi P, Nomura T, Andrew RJ, Masse NY, Sampathkumar V, Musial TF, et al. Neuronal BIN1 Regulates Presynaptic Neurotransmitter Release and Memory Consolidation. *Cell Rep.* 10 mars 2020;30(10):3520-3535.e7.
283. Schürmann B, Bermingham DP, Kopeikina KJ, Myczek K, Yoon S, Horan KE, et al. A novel role for the late-onset Alzheimer's disease (LOAD)-associated protein Bin1 in regulating postsynaptic trafficking and glutamatergic signaling. *Mol Psychiatry.* sept 2020;25(9):2000-16.
284. Voskobiynk Y, Roth JR, Cochran JN, Rush T, Carullo NV, Mesina JS, et al. Alzheimer's disease risk gene BIN1 induces Tau-dependent network hyperexcitability. *Elife.* 13 juill 2020;9:e57354.
285. Dourlen P. Identification of Tau Toxicity Modifiers in the Drosophila Eye. *Methods Mol Biol.* 2017;1523:375-89.
286. Dourlen P, Fernandez-Gomez FJ, Dupont C, Grenier-Boley B, Bellenguez C, Obriot H, et al. Functional screening of Alzheimer risk loci identifies PTK2B as an in vivo modulator and early marker of Tau pathology. *Mol Psychiatry.* juin 2017;22(6):874-83.
287. Spence EF, Soderling SH. Actin Out: Regulation of the Synaptic Cytoskeleton. *J Biol Chem.* 27 nov 2015;290(48):28613-22.
288. Hotulainen P, Hoogenraad CC. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol.* 17 mai 2010;189(4):619-29.
289. Lai-Cheong JE, Parsons M, McGrath JA. The role of kindlins in cell biology and relevance to human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* mai 2010;42(5):595-603.
290. de Pins B, Mendes T, Giralto A, Girault JA. The Non-receptor Tyrosine Kinase Pyk2 in Brain Function and Neurological and Psychiatric Diseases. *Front Synaptic Neurosci.* 2021;13:749001.
291. Kilinc D, Vreulx AC, Mendes T, Flaig A, Marques-Coelho D, Verschoore M, et al. Pyk2 overexpression in postsynaptic neurons blocks amyloid β 1-42-induced synaptotoxicity in microfluidic co-cultures. *Brain Commun.* 2020;2(2):fcaa139.

292. Rajendran L, Paolicelli RC. Microglia-Mediated Synapse Loss in Alzheimer's Disease. *J Neurosci*. 21 mars 2018;38(12):2911-9.
293. Wang Y, Cella M, Mallinson K, Ulrich JD, Young KL, Robinette ML, et al. TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell*. 12 mars 2015;160(6):1061-71.
294. Filipello F, Morini R, Corradini I, Zerbi V, Canzi A, Michalski B, et al. The Microglial Innate Immune Receptor TREM2 Is Required for Synapse Elimination and Normal Brain Connectivity. *Immunity*. 15 mai 2018;48(5):979-991.e8.
295. Maguire E, Menzies GE, Phillips T, Sasner M, Williams HM, Czubala MA, et al. PIP2 depletion and altered endocytosis caused by expression of Alzheimer's disease-protective variant PLCy2 R522. *EMBO J*. 1 sept 2021;40(17):e105603.
296. Kleineidam L, Chouraki V, Próchnicki T, van der Lee SJ, Madrid-Márquez L, Wagner-Thelen H, et al. PLCG2 protective variant p.P522R modulates tau pathology and disease progression in patients with mild cognitive impairment. *Acta Neuropathol*. juin 2020;139(6):1025-44.
297. Tsai AP, Dong C, Lin PBC, Messenger EJ, Casali BT, Moutinho M, et al. PLCG2 is associated with the inflammatory response and is induced by amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Genome Med*. 18 févr 2022;14:17.
298. Takalo M, Wittrahm R, Wefers B, Parhizkar S, Jokivarsi K, Kuulasmaa T, et al. The Alzheimer's disease-associated protective Plcy2-P522R variant promotes immune functions. *Mol Neurodegener*. 11 sept 2020;15(1):52.
299. Solomon S, Sampathkumar NK, Carre I, Mondal M, Chennell G, Vernon AC, et al. Heterozygous expression of the Alzheimer's disease-protective PLCy2 P522R variant enhances A β clearance while preserving synapses. *Cell Mol Life Sci*. 27 juill 2022;79(8):453.
300. Spit M, Rieser E, Walczak H. Linear ubiquitination at a glance. *J Cell Sci*. 18 janv 2019;132(2):jcs208512.
301. Decourt B, Lahiri DK, Sabbagh MN. Targeting Tumor Necrosis Factor Alpha for Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2017;14(4):412-25.
302. Mahley RW, Huang Y. Apolipoprotein E Sets the Stage: Response to Injury Triggers Neuropathology, Including Alzheimer's Disease. *Neuron*. 6 déc 2012;76(5):871-85.
303. Serrano-Pozo A, Das S, Hyman BT. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches. *Lancet Neurol*. janv 2021;20(1):68-80.
304. Zhou X, Fu AK, Ip NY. APOE signaling in neurodegenerative diseases: an integrative approach targeting APOE coding and noncoding variants for disease intervention. *Curr Opin Neurobiol*. août 2021;69:58-67.
305. Dumanis SB, DiBattista AM, Miessau M, Moussa CEH, Rebeck GW. APOE genotype affects the presynaptic compartment of glutamatergic nerve terminals. *J Neurochem*. janv 2013;124(1):4-14.
306. Chen Y, Durakoglugil MS, Xian X, Herz J. ApoE4 reduces glutamate receptor function and synaptic plasticity by selectively impairing ApoE receptor recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 juin 2010;107(26):12011-6.
307. Qiao F, Gao XP, Yuan L, Cai HY, Qi JS. Apolipoprotein E4 impairs in vivo hippocampal long-term synaptic plasticity by reducing the phosphorylation of CaMKII α and CREB. *J Alzheimers Dis*. 2014;41(4):1165-76.
308. Foster EM, Dangla-Valls A, Lovestone S, Ribe EM, Buckley NJ. Clusterin in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Genetics, and Lessons From Other Pathologies. *Front Neurosci*. 2019;13:164.
309. Chen F, Swartzlander DB, Ghosh A, Fryer JD, Wang B, Zheng H. Clusterin secreted from astrocyte promotes excitatory synaptic transmission and ameliorates Alzheimer's disease neuropathology. *Mol Neurodegener*. 31 janv 2021;16(1):5.
310. Tu-Sekine B, Raben DM. Regulation of DGK-theta. *J Cell Physiol*. sept 2009;220(3):548-52.
311. Nurrish S, Ségalat L, Kaplan JM. Serotonin inhibition of synaptic transmission: Galpha(0) decreases the abundance of UNC-13 at release sites. *Neuron*. sept 1999;24(1):231-42.

312. Goldschmidt HL, Tu-Sekine B, Volk L, Anggono V, Huganir RL, Raben DM. DGK θ Catalytic Activity Is Required for Efficient Recycling of Presynaptic Vesicles at Excitatory Synapses. *Cell Reports*. janv 2016;14(2):200-7.
313. Ubelmann F, Burrenha T, Salavessa L, Gomes R, Ferreira C, Moreno N, et al. Bin1 and CD2AP polarise the endocytic generation of beta-amyloid. *EMBO Rep*. janv 2017;18(1):102-22.
314. Harrison BJ, Venkat G, Lamb JL, Hutson TH, Drury C, Rau KK, et al. The Adaptor Protein CD2AP Is a Coordinator of Neurotrophin Signaling-Mediated Axon Arbor Plasticity. *J Neurosci*. 13 avr 2016;36(15):4259-75.
315. Ojelade SA, Lee TV, Giagtzoglou N, Yu L, Ugur B, Li Y, et al. cindr, the Drosophila Homolog of the CD2AP Alzheimer's Disease Risk Gene, Is Required for Synaptic Transmission and Proteostasis. *Cell Rep*. 13 août 2019;28(7):1799-1813.e5.
316. Tao QQ, Chen YC, Wu ZY. The role of CD2AP in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Aging Dis*. août 2019;10(4):901-7.
317. Xiao Q, Gil SC, Yan P, Wang Y, Han S, Gonzales E, et al. Role of phosphatidylinositol clathrin assembly lymphoid-myeloid leukemia (PICALM) in intracellular amyloid precursor protein (APP) processing and amyloid plaque pathogenesis. *J Biol Chem*. 15 juin 2012;287(25):21279-89.
318. Kanatsu K, Morohashi Y, Suzuki M, Kuroda H, Watanabe T, Tomita T, et al. Decreased CALM expression reduces A β 42 to total A β ratio through clathrin-mediated endocytosis of γ -secretase. *Nat Commun*. 28 févr 2014;5:3386.
319. Schjeide BMM, Schnack C, Lambert JC, Lill CM, Kirchheiner J, Tumani H, et al. The role of clusterin, complement receptor 1, and phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein in Alzheimer disease risk and cerebrospinal fluid biomarker levels. *Arch Gen Psychiatry*. févr 2011;68(2):207-13.
320. Petralia RS, Wang YX, Indig FE, Bushlin I, Wu F, Mattson MP, et al. Reduction of AP180 and CALM produces defects in synaptic vesicle size and density. *Neuromolecular Med*. mars 2013;15(1):49-60.
321. Yu Y, Niccoli T, Ren Z, Woodling NS, Aleyakpo B, Szabadkai G, et al. PICALM rescues glutamatergic neurotransmission, behavioural function and survival in a Drosophila model of A β 42 toxicity. *Hum Mol Genet*. 11 août 2020;29(14):2420-34.
322. Guo C, Ma YY. Calcium Permeable-AMPA Receptors and Excitotoxicity in Neurological Disorders. *Front Neural Circuits*. 17 août 2021;15:711564.
323. Azarnia Tehran D, Kochlamazashvili G, Pampaloni NP, Sposini S, Shergill JK, Lehmann M, et al. Selective endocytosis of Ca²⁺-permeable AMPARs by the Alzheimer's disease risk factor CALM bidirectionally controls synaptic plasticity. *Sci Adv*. 8(21):eabl5032.
324. Bushlin I, Petralia RS, Wu F, Harel A, Mughal MR, Mattson MP, et al. Clathrin Assembly Protein AP180 and CALM Differentially Control Axogenesis and Dendrite Outgrowth in Embryonic Hippocampal Neurons. *J Neurosci*. 8 oct 2008;28(41):10257-71.
325. Dourlen P, Chapuis J, Lambert JC. Using High-Throughput Animal or Cell-Based Models to Functionally Characterize GWAS Signals. *Curr Genet Med Rep*. 2018;6(3):107-15.
326. Sin O, Michels H, Nollen EAA. Genetic screens in *Caenorhabditis elegans* models for neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*. oct 2014;1842(10):1951-9.
327. Khabirova E, Moloney A, Marciniak SJ, Williams J, Lomas DA, Oliver SG, et al. The TRiC/CCT chaperone is implicated in Alzheimer's disease based on patient GWAS and an RNAi screen in A β -expressing *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2014;9(7):e102985.
328. Mukherjee S, Russell JC, Carr DT, Burgess JD, Allen M, Serie DJ, et al. Systems biology approach to late-onset Alzheimer's disease genome-wide association study identifies novel candidate genes validated using brain expression data and *Caenorhabditis elegans* experiments. *Alzheimers Dement*. oct 2017;13(10):1133-42.
329. Kraemer BC, Burgess JK, Chen JH, Thomas JH, Schellenberg GD. Molecular pathways that influence human tau-induced pathology in *Caenorhabditis elegans*. *Hum Mol Genet*. 1 mai 2006;15(9):1483-96.

330. Belfiori-Carrasco LF, Marcora MS, Bocai NI, Ceriani MF, Morelli L, Castaño EM. A Novel Genetic Screen Identifies Modifiers of Age-Dependent Amyloid β Toxicity in the Drosophila Brain. *Front Aging Neurosci.* 2017;9:61.
331. Butzlaff M, Hannan SB, Karsten P, Lenz S, Ng J, Voßfeldt H, et al. Impaired retrograde transport by the Dynein/Dynactin complex contributes to Tau-induced toxicity. *Hum Mol Genet.* 1 juill 2015;24(13):3623-37.
332. Taylor DL. Past, present, and future of high content screening and the field of cellomics. *Methods Mol Biol.* 2007;356:3-18.
333. Pegoraro G, Misteli T. High-Throughput Imaging for the Discovery of Cellular Mechanisms of Disease. *Trends Genet.* sept 2017;33(9):604-15.
334. Horvath P, Aulner N, Bickle M, Davies AM, Nery ED, Ebner D, et al. Screening out irrelevant cell-based models of disease. *Nat Rev Drug Discov.* nov 2016;15(11):751-69.
335. Little D, Ketteler R, Gissen P, Devine MJ. Using stem cell-derived neurons in drug screening for neurological diseases. *Neurobiol Aging.* juin 2019;78:130-41.
336. Sandy P, Ventura A, Jacks T. Mammalian RNAi: a practical guide. *Biotechniques.* août 2005;39(2):215-24.
337. Root DE, Hacohen N, Hahn WC, Lander ES, Sabatini DM. Genome-scale loss-of-function screening with a lentiviral RNAi library. *Nat Methods.* sept 2006;3(9):715-9.
338. Conrad C, Gerlich DW. Automated microscopy for high-content RNAi screening. *J Cell Biol.* 22 févr 2010;188(4):453-61.
339. Lim S, Kim D, Kim DJ, Kim YK. Image-Based Analysis of Intracellular Tau Aggregation by Using Tau-BiFC Cell Model. *Methods Mol Biol.* 2017;1523:341-7.
340. Caicedo JC, Cooper S, Heigwer F, Warchal S, Qiu P, Molnar C, et al. Data-analysis strategies for image-based cell profiling. *Nat Methods.* 31 août 2017;14(9):849-63.
341. Campeau E, Gobeil S. RNA interference in mammals: behind the screen. *Brief Funct Genomics.* juill 2011;10(4):215-26.
342. Mohr SE, Perrimon N. RNAi screening: new approaches, understandings, and organisms. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2012;3(2):145-58.
343. Bray MA, Carpenter A, Imaging Platform, Broad Institute of MIT and Harvard. Advanced Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening and Analysis. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, Arkin M, Auld D, Austin C, et al., éditeurs. *Assay Guidance Manual [Internet].* Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [cité 3 nov 2022]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK126174/>
344. Zhang XD. Novel analytic criteria and effective plate designs for quality control in genome-scale RNAi screens. *J Biomol Screen.* juin 2008;13(5):363-77.
345. Espeseth AS, Huang Q, Gates A, Xu M, Yu Y, Simon AJ, et al. A genome wide analysis of ubiquitin ligases in APP processing identifies a novel regulator of BACE1 mRNA levels. *Mol Cell Neurosci.* nov 2006;33(3):227-35.
346. Udayar V, Buggia-Prévoit V, Guerreiro RL, Siegel G, Rambabu N, Soohoo AL, et al. A paired RNAi and RabGAP overexpression screen identifies Rab11 as a regulator of β -amyloid production. *Cell Rep.* 26 déc 2013;5(6):1536-51.
347. Kondo T, Imamura K, Funayama M, Tsukita K, Miyake M, Ohta A, et al. iPSC-Based Compound Screening and In Vitro Trials Identify a Synergistic Anti-amyloid β Combination for Alzheimer's Disease. *Cell Rep.* 21 nov 2017;21(8):2304-12.
348. Brownjohn PW, Smith J, Portelius E, Serneels L, Kvartsberg H, De Strooper B, et al. Phenotypic Screening Identifies Modulators of Amyloid Precursor Protein Processing in Human Stem Cell Models of Alzheimer's Disease. *Stem Cell Reports.* 11 avr 2017;8(4):870-82.
349. Cavallini A, Brewerton S, Bell A, Sargent S, Glover S, Hardy C, et al. An unbiased approach to identifying tau kinases that phosphorylate tau at sites associated with Alzheimer disease. *J Biol Chem.* 9 août 2013;288(32):23331-47.

350. Azorsa DO, Robeson RH, Frost D, hoovet BM, Brautigam GR, Dickey C, et al. High-content siRNA screening of the kinome identifies kinases involved in Alzheimer's disease-related tau hyperphosphorylation. *BMC Genomics*. 12 janv 2010;11(1):25.
351. Pickhardt M, Tassoni M, Denner P, Kurkowsky B, Kitanovic A, Möhl C, et al. Screening of a neuronal cell model of tau pathology for therapeutic compounds. *Neurobiol Aging*. avr 2019;76:24-34.
352. Medda X, Mertens L, Versweyveld S, Diels A, Barnham L, Bretteville A, et al. Development of a Scalable, High-Throughput-Compatible Assay to Detect Tau Aggregates Using iPSC-Derived Cortical Neurons Maintained in a Three-Dimensional Culture Format. *SLAS Discovery*. 1 sept 2016;21(8):804-15.
353. Wang C, Ward ME, Chen R, Liu K, Tracy TE, Chen X, et al. Scalable Production of iPSC-Derived Human Neurons to Identify Tau-Lowering Compounds by High-Content Screening. *Stem Cell Reports*. 10 oct 2017;9(4):1221-33.
354. Cheng C, Reis SA, Adams ET, Fass DM, Angus SP, Stuhlmiller TJ, et al. High-content image-based analysis and proteomic profiling identifies Tau phosphorylation inhibitors in a human iPSC-derived glutamatergic neuronal model of tauopathy. *Sci Rep*. 23 août 2021;11(1):17029.
355. Kant R van der, Langness VF, Herrera CM, Williams DA, Fong LK, Leestemaker Y, et al. Cholesterol Metabolism Is a Druggable Axis that Independently Regulates Tau and Amyloid- β in iPSC-Derived Alzheimer's Disease Neurons. *Cell Stem Cell*. 7 mars 2019;24(3):363-375.e9.
356. Verstraelen P, Van Dyck M, Verschuuren M, Kashikar ND, Nuydens R, Timmermans JP, et al. Image-Based Profiling of Synaptic Connectivity in Primary Neuronal Cell Culture. *Frontiers in Neuroscience* [Internet]. 2018 [cité 10 mai 2023];12. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2018.00389>
357. Dravid A, Raos B, Svirskis D, O'Carroll SJ. Optimised techniques for high-throughput screening of differentiated SH-SY5Y cells and application for neurite outgrowth assays. *Sci Rep*. 14 déc 2021;11(1):23935.
358. Schikora J, Kiwatrowski N, Förster N, Selbach L, Ostendorf F, Pallapies F, et al. A Propagated Skeleton Approach to High Throughput Screening of Neurite Outgrowth for In Vitro Parkinson's Disease Modelling. *Cells*. 17 avr 2021;10(4):931.
359. Yamada S, Uchimura E, Ueda T, Nomura T, Fujita S, Matsumoto K, et al. Identification of twinfilin-2 as a factor involved in neurite outgrowth by RNAi-based screen. *Biochem Biophys Res Commun*. 30 nov 2007;363(4):926-30.
360. Loh SHY, Francescut L, Lingor P, Bähr M, Nicotera P. Identification of new kinase clusters required for neurite outgrowth and retraction by a loss-of-function RNA interference screen. *Cell Death Differ*. févr 2008;15(2):283-98.
361. Chen YF, Wu CH, Chen LH, Lee HW, Lee JC, Yeh TK, et al. Discovery of Potential Neuroprotective Agents against Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy. *J Med Chem*. 24 mars 2022;65(6):4767-82.
362. Hu M, Schurdak ME, Puttfarcken PS, El Kouhen R, Gopalakrishnan M, Li J. High content screen microscopy analysis of A beta 1-42-induced neurite outgrowth reduction in rat primary cortical neurons: neuroprotective effects of alpha 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor ligands. *Brain Res*. 2 juin 2007;1151:227-35.
363. Sherman SP, Bang AG. High-throughput screen for compounds that modulate neurite growth of human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Dis Model Mech*. 2 févr 2018;11(2):dmm031906.
364. Lickfett S, Menacho C, Zink A, Telugu NS, Beller M, Diecke S, et al. High-content analysis of neuronal morphology in human iPSC-derived neurons. *STAR Protoc*. 16 sept 2022;3(3):101567.
365. Li S, Zhang L, Huang R, Xu T, Parham F, Behl M, et al. Evaluation of chemical compounds that inhibit neurite outgrowth using GFP-labeled iPSC-derived human neurons. *Neurotoxicology*. mars 2021;83:137-45.
366. Ryan KR, Sirenko O, Parham F, Hsieh JH, Cromwell EF, Tice RR, et al. Neurite outgrowth in human induced pluripotent stem cell-derived neurons as a high-throughput screen for developmental neurotoxicity or neurotoxicity. *Neurotoxicology*. mars 2016;53:271-81.
367. Paradis S, Harrar DB, Lin Y, Koon AC, Hauser JL, Griffith EC, et al. An RNAi-based Approach Identifies New Molecules Required for Glutamatergic and GABAergic Synapse Development. *Neuron*. 18 janv 2007;53(2):217-32.

368. Nieland TJF, Logan DJ, Saulnier J, Lam D, Johnson C, Root DE, et al. High Content Image Analysis Identifies Novel Regulators of Synaptogenesis in a High-Throughput RNAi Screen of Primary Neurons. *PLOS ONE*. 14 mars 2014;9(3):e91744.
369. Berryer MH, Rizki G, Nathanson A, Klein JA, Trendafilova D, Susco SG, et al. High-content synaptic phenotyping in human cellular models reveals a role for BET proteins in synapse assembly. *Elife*. 21 avr 2023;12:e80168.
370. Galano-Frutos JJ, García-Cebollada H, Sancho J. Molecular dynamics simulations for genetic interpretation in protein coding regions: where we are, where to go and when. *Brief Bioinform*. 18 janv 2021;22(1):3-19.
371. PolyPhen-2: prediction of functional effects of human nsSNPs [Internet]. [cité 1 oct 2023]. Disponible sur: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
372. SIFT - Predict effects of nonsynonymous / missense variants [Internet]. [cité 1 oct 2023]. Disponible sur: <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>
373. Kleinberger G, Yamanishi Y, Suárez-Calvet M, Czirr E, Lohmann E, Cuyvers E, et al. TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Sci Transl Med*. 2 juill 2014;6(243):243ra86.
374. Magno L, Lessard CB, Martins M, Lang V, Cruz P, Asi Y, et al. Alzheimer's disease phospholipase C-gamma-2 (PLCG2) protective variant is a functional hypermorph. *Alzheimers Res Ther*. 2 févr 2019;11(1):16.
375. Nishizaki SS, Boyle AP. Mining the Unknown: Assigning Function to Noncoding Single Nucleotide Polymorphisms. *Trends Genet*. janv 2017;33(1):34-45.
376. Genome.gov [Internet]. [cité 30 août 2023]. HapMap. Disponible sur: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/hapmap>
377. Genome.gov [Internet]. [cité 30 août 2023]. 1000 Genomes Project. Disponible sur: <https://www.genome.gov/27528684/1000-genomes-project>
378. NHLBI Trans-Omics for Precision Medicine WGS-About TOPMed [Internet]. [cité 15 oct 2023]. Disponible sur: <https://topmed.nhlbi.nih.gov/>
379. ENCODE [Internet]. [cité 1 oct 2023]. Disponible sur: <https://www.encodeproject.org/>
380. Nature [Internet]. 2017 [cité 1 oct 2023]. The FANTOM5 Project. Disponible sur: <https://www.nature.com/collections/jcxddjndxy>
381. Bernstein BE, Stamatoyannopoulos JA, Costello JF, Ren B, Milosavljevic A, Meissner A, et al. The NIH Roadmap Epigenomics Mapping Consortium. *Nat Biotechnol*. oct 2010;28(10):1045-8.
382. McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, et al. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biology*. 6 juin 2016;17(1):122.
383. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 1 sept 2010;38(16):e164.
384. Ward LD, Kellis M. HaploReg v4: systematic mining of putative causal variants, cell types, regulators and target genes for human complex traits and disease. *Nucleic Acids Res*. 4 janv 2016;44(Database issue):D877-81.
385. Ritchie GRS, Dunham I, Zeggini E, Flicek P. Functional annotation of noncoding sequence variants. *Nat Methods*. mars 2014;11(3):294-6.
386. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Research*. 8 janv 2019;47(D1):D886-94.
387. Zhou J, Troyanskaya OG. Predicting effects of noncoding variants with deep learning-based sequence model. *Nat Methods*. oct 2015;12(10):931-4.

388. Park JS, Lee J, Jung ES, Kim MH, Kim IB, Son H, et al. Brain somatic mutations observed in Alzheimer's disease associated with aging and dysregulation of tau phosphorylation. *Nat Commun.* 12 juill 2019;10(1):3090.
389. Cano-Gamez E, Trynka G. From GWAS to Function: Using Functional Genomics to Identify the Mechanisms Underlying Complex Diseases. *Frontiers in Genetics* [Internet]. 2020 [cité 1 oct 2023];11. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.00424>
390. Battle A, Khan Z, Wang SH, Mitrano A, Ford MJ, Pritchard JK, et al. Genomic variation. Impact of regulatory variation from RNA to protein. *Science.* 6 févr 2015;347(6222):664-7.
391. van der Sijde MR, Ng A, Fu J. Systems genetics: From GWAS to disease pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.* 1 oct 2014;1842(10):1903-9.
392. Lonsdale J, Thomas J, Salvatore M, Phillips R, Lo E, Shad S, et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet.* juin 2013;45(6):580-5.
393. Greenwood AK, Montgomery KS, Kauer N, Woo KH, Leanza ZJ, Poehlman WL, et al. The AD Knowledge Portal: A Repository for Multi-Omic Data on Alzheimer's Disease and Aging. *Curr Protoc Hum Genet.* déc 2020;108(1):e105.
394. Rao S, Yao Y, Bauer DE. Editing GWAS: experimental approaches to dissect and exploit disease-associated genetic variation. *Genome Med.* 10 mars 2021;13(1):41.
395. Femminella GD, Ferrara N, Rengo G. The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. *Front Physiol.* 2015;6:40.
396. Wang WX, Huang Q, Hu Y, Stromberg AJ, Nelson PT. Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex: white matter versus gray matter. *Acta Neuropathol.* févr 2011;121(2):193-205.
397. Liu CJ, Fu X, Xia M, Zhang Q, Gu Z, Guo AY. miRNASNP-v3: a comprehensive database for SNPs and disease-related variations in miRNAs and miRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 8 janv 2021;49(D1):D1276-81.
398. Deveci M, Catalyürek UV, Toland AE. mrSNP: software to detect SNP effects on microRNA binding. *BMC Bioinformatics.* 15 mars 2014;15:73.
399. Delay C, Grenier-Boley B, Amouyel P, Dumont J, Lambert JC. miRNA-dependent target regulation: functional characterization of single-nucleotide polymorphisms identified in genome-wide association studies of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 24 mai 2016;8(1):20.
400. Schipper M, Posthuma D. Demystifying non-coding GWAS variants: an overview of computational tools and methods. *Hum Mol Genet.* 20 oct 2022;31(R1):R73-83.
401. Zheng Y, VanDusen NJ. Massively Parallel Reporter Assays for High-Throughput In Vivo Analysis of Cis-Regulatory Elements. *J Cardiovasc Dev Dis.* 29 mars 2023;10(4):144.
402. Cooper YA, Teyssier N, Dräger NM, Guo Q, Davis JE, Sattler SM, et al. Functional regulatory variants implicate distinct transcriptional networks in dementia. *Science.* 19 août 2022;377(6608):eabi8654.
403. Shen SQ, Myers CA, Hughes AEO, Byrne LC, Flannery JG, Corbo JC. Massively parallel cis-regulatory analysis in the mammalian central nervous system. *Genome Res.* févr 2016;26(2):238-55.
404. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* nov 2013;8(11):2281-308.
405. Zhao Z, Li C, Tong F, Deng J, Huang G, Sang Y. Review of applications of CRISPR-Cas9 gene-editing technology in cancer research. *Biological Procedures Online.* 15 juill 2021;23(1):14.
406. Lu L, Yu X, Cai Y, Sun M, Yang H. Application of CRISPR/Cas9 in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 21 déc 2021;15:803894.
407. Paquet D, Kwart D, Chen A, Sproul A, Jacob S, Teo S, et al. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature.* 5 mai 2016;533(7601):125-9.

408. Kwart D, Gregg A, Sheckel C, Murphy EA, Paquet D, Duffield M, et al. A Large Panel of Isogenic APP and PSEN1 Mutant Human iPSC Neurons Reveals Shared Endosomal Abnormalities Mediated by APP β -CTFs, Not A β . *Neuron*. 23 oct 2019;104(2):256-270.e5.
409. Ortiz-Virumbrales M, Moreno CL, Kruglikov I, Marazuela P, Sproul A, Jacob S, et al. CRISPR/Cas9-Correctable mutation-related molecular and physiological phenotypes in iPSC-derived Alzheimer's PSEN2 N141I neurons. *Acta Neuropathol Commun*. 27 oct 2017;5(1):77.
410. Oksanen M, Petersen AJ, Naumenko N, Puttonen K, Lehtonen Š, Gubert Olivé M, et al. PSEN1 Mutant iPSC-Derived Model Reveals Severe Astrocyte Pathology in Alzheimer's Disease. *Stem Cell Reports*. déc 2017;9(6):1885-97.
411. Oikari LE, Pandit R, Stewart R, Cuní-López C, Quek H, Sutharsan R, et al. Altered Brain Endothelial Cell Phenotype from a Familial Alzheimer Mutation and Its Potential Implications for Amyloid Clearance and Drug Delivery. *Stem Cell Reports*. mai 2020;14(5):924-39.
412. Wadhvani AR, Affaneh A, Van Gulden S, Kessler JA. Neuronal Apolipoprotein E4 Increases Cell Death and Phosphorylated Tau Release in Alzheimer Disease. *Ann Neurol*. mai 2019;85(5):726-39.
413. Lin YT, Seo J, Gao F, Feldman HM, Wen HL, Penney J, et al. APOE4 causes widespread molecular and cellular alterations associated with Alzheimer's disease phenotypes in human iPSC-derived brain cell types. *Neuron*. 27 juin 2018;98(6):1141-1154.e7.
414. Liu Z, Chao J, Wang C, Sun G, Roeth D, Liu W, et al. Astrocytic response mediated by the CLU risk allele inhibits OPC proliferation and myelination in a human iPSC model. *Cell Rep*. 29 août 2023;42(8):112841.
415. Cosker K, Mallach A, Limaye J, Piers TM, Staddon J, Neame SJ, et al. Microglial signalling pathway deficits associated with the patient derived R47H TREM2 variants linked to AD indicate inability to activate inflammasome. *Sci Rep*. 25 juin 2021;11(1):13316.
416. Lagomarsino VN, Pearse RV, Liu L, Hsieh YC, Fernandez MA, Vinton EA, et al. Stem cell-derived neurons reflect features of protein networks, neuropathology, and cognitive outcome of their aged human donors. *Neuron*. 3 nov 2021;109(21):3402-3420.e9.
417. Sahlgren Bendtsen KM, Hall VJ. The Breakthroughs and Caveats of Using Human Pluripotent Stem Cells in Modeling Alzheimer's Disease. *Cells*. 27 janv 2023;12(3):420.
418. Wang Y, Liang G, Liang S, Mund R, Shi Y, Wei H. Dantrolene Ameliorates Impaired Neurogenesis and Synaptogenesis in Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Patients with Alzheimer's Disease. *Anesthesiology*. mai 2020;132(5):1062-79.
419. Lee JH, Yoo G, Choi J, Park SH, Shin H, Prasad R, et al. Cell-line dependency in cerebral organoid induction: cautionary observations in Alzheimer's disease patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol Brain*. 16 mai 2022;15(1):46.
420. Guttikonda SR, Sikkema L, Tchieu J, Saurat N, Walsh RM, Harschnitz O, et al. Fully defined human pluripotent stem cell-derived microglia and tri-culture system model C3 production in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. mars 2021;24(3):343-54.
421. Cenini G, Hebisch M, Iefremova V, Flitsch LJ, Breitzkreuz Y, Tanzi RE, et al. Dissecting Alzheimer's disease pathogenesis in human 2D and 3D models. *Mol Cell Neurosci*. janv 2021;110:103568.
422. Brewer GJ, Boehler MD, Pearson RA, DeMaris AA, Ide AN, Wheeler BC. Neuron network activity scales exponentially with synapse density. *J Neural Eng*. déc 2008;6(1):014001.
423. BIN1 regulates electrical activity and network synchronization in hiPSC-derived neurons | bioRxiv [Internet]. [cité 23 oct 2023]. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.01.18.476601v1>
424. Sharlow ER, Llaneza DC, Grever WE, Mingledorff GA, Mendelson AJ, Bloom GS, et al. High content screening miniaturization and single cell imaging of mature human feeder layer-free iPSC-derived neurons. *SLAS Discov*. 21 oct 2022;S2472-5552(22)13703-2.

425. van Deijk ALF, Broersen LM, Verkuyl JM, Smit AB, Verheijen MHG. High Content Analysis of Hippocampal Neuron-Astrocyte Co-cultures Shows a Positive Effect of Fortasyn Connect on Neuronal Survival and Postsynaptic Maturation. *Front Neurosci.* 4 août 2017;11:440.
426. Sharma R, Gulia R, Bhattacharyya S. A Critical Role for Sorting Nexin 1 in the Trafficking of Metabotropic Glutamate Receptors. *J Neurosci.* 3 oct 2018;38(40):8605-20.
427. Harrill JA, Chen H, Streifel KM, Yang D, Mundy WR, Lein PJ. Ontogeny of biochemical, morphological and functional parameters of synaptogenesis in primary cultures of rat hippocampal and cortical neurons. *Mol Brain.* 15 févr 2015;8:10.
428. Malo N, Hanley JA, Cerquozzi S, Pelletier J, Nadon R. Statistical practice in high-throughput screening data analysis. *Nat Biotechnol.* févr 2006;24(2):167-75.
429. Lanzetti L, Rybin V, Malabarba MG, Christoforidis S, Scita G, Zerial M, et al. The Eps8 protein coordinates EGF receptor signalling through Rac and trafficking through Rab5. *Nature.* 16 nov 2000;408(6810):374-7.
430. Xu W, Fang F, Ding J, Wu C. Dysregulation of Rab5-mediated endocytic pathways in Alzheimer's disease. *Traffic.* avr 2018;19(4):253-62.
431. Park HB, Kim JW, Baek KH. Regulation of Wnt Signaling through Ubiquitination and Deubiquitination in Cancers. *Int J Mol Sci.* 30 mai 2020;21(11):3904.
432. Jia L, Piña-Crespo J, Li Y. Restoring Wnt/ β -catenin signaling is a promising therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Mol Brain.* 4 déc 2019;12(1):104.
433. Ehehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol.* 6 janv 2003;160(1):113-23.
434. Fernández-Cruz I, Reynaud E. Proteasome Subunits Involved in Neurodegenerative Diseases. *Arch Med Res.* janv 2021;52(1):1-14.
435. Drummond E, Pires G, MacMurray C, Askenazi M, Nayak S, Bourdon M, et al. Phosphorylated tau interactome in the human Alzheimer's disease brain. *Brain.* 1 sept 2020;143(9):2803-17.
436. Vielhaber E, Virshup DM. Casein kinase I: from obscurity to center stage. *IUBMB Life.* févr 2001;51(2):73-8.
437. Kuret J, Johnson GS, Cha D, Christenson ER, DeMaggio AJ, Hoekstra MF. Casein kinase 1 is tightly associated with paired-helical filaments isolated from Alzheimer's disease brain. *J Neurochem.* déc 1997;69(6):2506-15.
438. Li DP, Zhou JJ, Pan HL. Endogenous casein kinase-1 modulates NMDA receptor activity of hypothalamic presympathetic neurons and sympathetic outflow in hypertension. *J Physiol.* 1 oct 2015;593(19):4439-52.
439. Chergui K, Svenningsson P, Greengard P. Physiological role for casein kinase 1 in glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci.* 13 juill 2005;25(28):6601-9.
440. Tan Y, Yu D, Pletting J, Davis RL. Gilgamesh is required for rutabaga-independent olfactory learning in *Drosophila*. *Neuron.* 9 sept 2010;67(5):810-20.
441. Iliadi KG, Avivi A, Iliadi NN, Knight D, Korol AB, Nevo E, et al. nemy encodes a cytochrome b561 that is required for *Drosophila* learning and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 déc 2008;105(50):19986-91.
442. Knight D, Iliadi KG, Iliadi N, Wilk R, Hu J, Krause HM, et al. Distinct Regulation of Transmitter Release at the *Drosophila* NMJ by Different Isoforms of nemy. *PLoS One.* 3 août 2015;10(8):e0132548.
443. Trousdale C, Kim K. Retromer: Structure, function, and roles in mammalian disease. *Eur J Cell Biol.* nov 2015;94(11):513-21.
444. Fukaya M, Fukushima D, Hara Y, Sakagami H. EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for Arf6, interacts with sorting nexin-1 and regulates neurite outgrowth. *J Neurochem.* avr 2014;129(1):21-36.

445. Mallik B, Dwivedi MK, Mushtaq Z, Kumari M, Verma PK, Kumar V. Regulation of neuromuscular junction organization by Rab2 and its effector ICA69 in *Drosophila*. *Development*. 1 juin 2017;144(11):2032-44.
446. Cao M, Xu J, Shen C, Kam C, Haganir RL, Xia J. PICK1-ICA69 heteromeric BAR domain complex regulates synaptic targeting and surface expression of AMPA receptors. *J Neurosci*. 21 nov 2007;27(47):12945-56.
447. Xu J, Kam C, Luo J hong, Xia J. PICK1 Mediates Synaptic Recruitment of AMPA Receptors at Neurexin-Induced Postsynaptic Sites. *J Neurosci*. 12 nov 2014;34(46):15415-24.
448. Van der Werf P, Orlowski M, Meister A. Enzymatic conversion of 5-oxo-L-proline (L-pyrrolidone carboxylate) to L-glutamate coupled with cleavage of adenosine triphosphate to adenosine diphosphate, a reaction in the -glutamyl cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1971;68(12):2982-5.
449. Koga M, Serritella AV, Messmer MM, Hayashi-Takagi A, Hester LD, Snyder SH, et al. Glutathione is a Physiologic Reservoir of Neuronal Glutamate. *Biochem Biophys Res Commun*. 17 juin 2011;409(4):596-602.
450. Ristoff E, Larsson A. Patients with genetic defects in the gamma-glutamyl cycle. *Chem Biol Interact*. 24 avr 1998;111-112:113-21.
451. Li X, Ding Y, Liu Y, Ma Y, Song J, Wang Q, et al. Five Chinese patients with 5-oxoprolinuria due to glutathione synthetase and 5-oxoprolinase deficiencies. *Brain Dev*. nov 2015;37(10):952-9.
452. Guan S, Chen M, Woodley D, Li W. Nck β Adapter Controls Neuritogenesis by Maintaining the Cellular Paxillin Level. *Mol Cell Biol*. sept 2007;27(17):6001-11.
453. Thévenot E, Moreau AW, Rousseau V, Combeau G, Domenichini F, Jacquet C, et al. p21-Activated kinase 3 (PAK3) protein regulates synaptic transmission through its interaction with the Nck2/Grb4 protein adaptor. *J Biol Chem*. 18 nov 2011;286(46):40044-59.
454. Levy AD, Xiao X, Shaw JE, Sudarsana Devi SP, Katrancha SM, Bennett AM, et al. Noonan Syndrome-Associated SHP2 Dephosphorylates GluN2B to Regulate NMDA Receptor Function. *Cell Rep*. 7 août 2018;24(6):1523-35.
455. Round JE, Sun H. The adaptor protein Nck2 mediates Slit1-induced changes in cortical neuron morphology. *Mol Cell Neurosci*. août 2011;47(4):265-73.
456. Labelle-Côté M, Larose L. Une protéine uNick en son genre. *Med Sci (Paris)*. 1 août 2011;27(8-9):746-52.
457. Goicoechea SM, Tu Y, Hua Y, Chen K, Shen TL, Guan JL, et al. Nck-2 interacts with focal adhesion kinase and modulates cell motility. *Int J Biochem Cell Biol*. juill 2002;34(7):791-805.
458. Sterin I, Santos AC, Park S. Neuronal Activity Reporters as Drug Screening Platforms. *Micromachines (Basel)*. 9 sept 2022;13(9):1500.
459. Zhu K, Lai Y, Cao H, Bai X, Liu C, Yan Q, et al. Kindlin-2 modulates MafA and β -catenin expression to regulate β -cell function and mass in mice. *Nat Commun*. 24 janv 2020;11(1):484.
460. Uemura K, Kuzuya A, Shimozono Y, Aoyagi N, Ando K, Shimohama S, et al. GSK3 β Activity Modifies the Localization and Function of Presenilin 1*. *Journal of Biological Chemistry*. 25 mai 2007;282(21):15823-32.
461. Lauretti E, Dincer O, Praticò D. Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1 mai 2020;1867(5):118664.
462. Sayas CL, Ariaens A, Ponsioen B, Moolenaar WH. GSK-3 is activated by the tyrosine kinase Pyk2 during LPA1-mediated neurite retraction. *Mol Biol Cell*. avr 2006;17(4):1834-44.
463. Hulme AJ, Maksour S, St-Clair Glover M, Miellet S, Dottori M. Making neurons, made easy: The use of Neurogenin-2 in neuronal differentiation. *Stem Cell Reports*. 30 déc 2021;17(1):14-34.
464. Leventoux N, Morimoto S, Imaizumi K, Sato Y, Takahashi S, Mashima K, et al. Human Astrocytes Model Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells*. 13 déc 2020;9(12):2680.

465. Zambrzycka A, Strosznajder RP, Strosznajder JB. Aggregated beta amyloid peptide 1-40 decreases Ca²⁺- and cholinergic receptor-mediated phosphoinositide degradation by alteration of membrane and cytosolic phospholipase C in brain cortex. *Neurochem Res.* févr 2000;25(2):189-96.
466. Ma L, Tian Y, Qian T, Li W, Liu C, Chu B, et al. Kindlin-2 promotes Src-mediated tyrosine phosphorylation of androgen receptor and contributes to breast cancer progression. *Cell Death Dis.* 20 mai 2022;13(5):482.
467. Xia W, Gao Z, Jiang X, Jiang L, Qin Y, Zhang D, et al. Alzheimer's risk factor FERMT2 promotes the progression of colorectal carcinoma via Wnt/ β -catenin signaling pathway and contributes to the negative correlation between Alzheimer and cancer. *PLoS One.* 2022;17(12):e0278774.