



UNIVERSITÉ DE LILLE – ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE ET SANTÉ

THÈSE D'UNIVERSITÉ

**Chloé NAJDEK**

---

**CARACTÉRISATION DES MÉCANISMES RESPONSABLES D'UNE  
PERTE DE FONCTION DE KINDLINE-2 DANS LE PROCESSUS  
PHYSIOPATHOLOGIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER**

---

Thèse soutenue publiquement le 17 décembre 2024

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

Devant le jury composé de :

Dr Magalie LECOURTOIS<sup>1</sup>  
Dr Pascal KIENLEN-CAMPARD<sup>2</sup>  
Dr Caroline MYSIOREK<sup>3</sup>  
Dr Julien CHAPUIS<sup>4</sup>  
Dr Jean-Charles LAMBERT<sup>4</sup>

Rapportrice  
Rapporteur  
Examinatrice et Présidente du jury  
Directeur de thèse  
Directeur d'équipe

<sup>1</sup> Université de Rouen <sup>2</sup> Université catholique de Louvain <sup>3</sup> Université d'Artois <sup>4</sup> Université de Lille

# REMERCIEMENTS

En premier lieu, je souhaite exprimer ma gratitude à l'**INSERM** et la **Région Hauts-de-France** pour le financement de ce travail de thèse.

Merci aux **Docteurs Magalie Lecourtois, Pascal Kienlen-Campard** et **Caroline Mysiorek** d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse, et pour me faire l'honneur de participer à cette soutenance.

Merci aux **Docteurs Sophie Halliez** et **Frédéric Checler** pour leur suivi attentif de mon projet de thèse durant ces 4 années, ainsi que pour leurs précieux conseils lors des comités de suivi de thèse.

Merci au **Docteur Philippe Amouyel** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, d'abord pour mon stage de Licence 3, puis pour les six années qui ont suivi. Je vous exprime toute ma gratitude pour cette opportunité et pour la confiance que vous m'avez témoignée.

Merci au **Docteur Jean-Charles Lambert** pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, où j'ai vécu une expérience des plus enrichissantes, tant sur le plan scientifique que professionnel. Je vous remercie sincèrement de m'avoir permis de participer à l'AAIC, une expérience marquante dans mon parcours, ainsi que pour le financement de ma quatrième année de thèse, qui a été déterminant dans l'aboutissement de ce travail. Votre attitude toujours positive a contribué à créer un environnement de travail à la fois stimulant et bienveillant, et je vous en remercie profondément.

Merci au **Docteur Julien Chapuis**, pour sa bienveillance et la confiance qu'il m'a accordée depuis notre première rencontre. Cela fait maintenant 7 ans que j'ai eu l'opportunité de travailler à vos côtés, et je dois dire que j'ai beaucoup appris grâce à votre expertise et votre passion pour la recherche. Je vous remercie sincèrement pour vos précieux conseils, votre disponibilité constante et vos remarques constructives. Sans oublier de vous remercier de m'avoir aidé à réaliser l'article, ainsi que le manuscrit. Je m'estime chanceuse de vous avoir eu comme directeur de thèse, merci pour tout ce que vous avez fait !

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des personnes avec qui j'ai évolué pendant ces sept années passées au laboratoire :

À **Pauline**, qui va désormais prendre la relève. Tu as toujours été prête à m'apporter ton aide et ton soutien m'a été précieux dans la finalisation de ce travail. Je t'adresse tous mes encouragements pour la poursuite de ce travail, j'attends les résultats de ta thèse avec impatience,

À **Anne-Marie** pour tous les bons moments que nous avons partagés lors de nos innombrables cultures. Tes conseils avisés et ta bonne humeur ont rendu ces moments de travail non seulement productifs, mais aussi très agréables. J'ai été ravie de faire partie de la "Team souris" à tes côtés,

À **Audrey**, pour m'avoir formé aux MEA, pour ton aide et tous tes précieux conseils. Je te souhaite sincèrement le meilleur pour la suite !

À **Florie**, pour toute l'aide que tu m'as apportée dans le cadre des expériences de biologie moléculaire,

À **Julie** et à **Pierre**, pour vos conseils avisés et surtout pour votre gentillesse et votre bienveillance à mon égard,

À **Devrim**, pour la relecture de l'article et ton aide pour les statistiques,

À tous les membres de l'équipe neuro qu'ils soient présents ou partis vers de nouvelles aventures, qu'ils m'aient aidés dans ce travail ou tout simplement soutenus tout au long de cette thèse : **Karine, Dolores, Valérie, Ana, Célia, Carla, Johanna, Charlotte, Alejandra**, .... Merci à vous qui avez tous contribué directement ou indirectement à ce travail par votre aide, vos conseils, votre soutien, votre énergie,

À la relève de ce laboratoire : **Florian, Nina, Valentin, Aurore** et **Bruno**. Mention spéciale à **Florian**, pour m'avoir toujours aidée lorsque je suis venue dans ton bureau pour te poser de nombreuses questions sur les MEA, ce qui est arrivé assez souvent !

À **Benjamin**, pour ta disponibilité et tous tes dépannages informatiques,

À **Xavier**, pour avoir toujours été prêt à apporter ton aide,

À **Marianne** et à **Anne-Sophie**, pour toute l'aide administrative que vous m'avez donnée durant toutes ces années et en particulier pour l'organisation de la soutenance,

Un immense merci à **l'équipe Protéo** pour avoir créé cet environnement de travail chaleureux, où le partage et les moments de rire sont toujours au rendez-vous.

À **Yara, Annie, Marlène, Julian** et **Morgane**, merci à vous pour tous ces bons moments passés ensemble, dans le labo ou en dehors, qui ont fait de ma thèse une expérience aussi riche professionnellement qu'humainement. Mention spéciale à **Yara** pour toutes ces soirées de rédaction passées au labo ; ton énergie et ta positivité inébranlables ont été un vrai moteur pour me garder éveillée et motivée durant ces longues sessions !

À **Olivia** et **Maggy**, la "première ligne" face à l'arrivée quotidienne de colis. Merci pour toute l'aide précieuse que vous m'avez apportée lorsque je me retrouvais (souvent) perdue à chercher tel ou tel produit.

Enfin je tiens surtout à remercier mes **parents**, qui m'ont accompagnée et soutenue durant toutes ces années d'études. Merci de m'avoir offert cette chance de pouvoir faire un doctorat. Pour l'amour et le soutien qu'ils m'ont porté et qui m'a permis de cheminer sereinement jusqu'à ce jour où je rédige ma thèse pour devenir docteur en neurosciences.



## RÉSUMÉ

La maladie d'Alzheimer (MA), première cause de démence dans le monde, est une pathologie neurodégénérative conduisant à une perte neuronale importante et à un déclin cognitif progressif. Elle est caractérisée par 2 lésions principales : (i) la dégénérescence neurofibrillaire due à l'accumulation intracellulaire de la protéine Tau hyperphosphorylée, et (ii) les plaques séniles causées par l'agrégation extracellulaire de peptides A $\beta$ , produits du catabolisme de l'APP. De plus, un dysfonctionnement et une perte synaptique constituent l'un des marqueurs précoces de la maladie. La MA est une pathologie multifactorielle avec une composante génétique estimée à 60-80%. Les études d'association pangénomiques (GWAS) ont permis l'identification de plusieurs gènes de susceptibilité pour la MA, dont le gène *FERMT2*. Ce gène code la protéine adaptatrice Kindline-2 (KD2) qui a été identifiée comme un modulateur important du métabolisme de l'APP et de la production d'A $\beta$ . Bien que KD2 ait initialement été décrite pour son rôle dans l'adhésion cellulaire *via* l'activation des intégrines, ses fonctions dans le cerveau étaient mal connues. Récemment, il a été rapporté que l'APP et KD2 forment un complexe protéine-protéine, et que cette interaction KD2/APP était nécessaire pour que KD2 ait un impact sur le métabolisme de l'APP. De plus, KD2 régulerait la plasticité synaptique de manière dépendante de l'APP. Il a ainsi été suggéré qu'une dérégulation de KD2 pourrait avoir un effet délétère sur la fonction synaptique et favoriser le processus de la MA.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail a été d'identifier les mécanismes pouvant conduire à une perte de fonction de KD2.

Nos résultats suggèrent que le clivage de la protéine KD2 pourrait jouer un rôle dans les dysfonctions synaptiques associées à la MA. En effet, nous avons identifié KD2 comme un nouveau substrat pour deux protéases à cystéine, la caspase et la calpaïne, connues pour leur rôle dans la régulation de la plasticité synaptique. De plus, nous démontrons que ces clivages conduisent à l'inhibition de la capacité de KD2 à réguler le métabolisme de l'APP.

KD2 est une protéine adaptatrice impliquée dans la formation de complexes protéiques essentiels à l'adhésion cellulaire. Ainsi, ces clivages pourraient inhiber les fonctions de KD2, en limitant sa capacité à recruter différents partenaires impliqués dans la régulation du métabolisme de l'APP. Parmi ces partenaires, nous avons montré que SRC, récemment identifié comme un facteur de risque génétique pour la MA est également un régulateur important du métabolisme de l'APP. Nos résultats suggèrent l'existence d'un complexe APP/KD2/SRC, et que la régulation du métabolisme de l'APP par KD2 serait dépendante de l'activité de SRC.

Enfin, nous avons identifié un variant rare non synonyme (V177L) dans *SRC*, associé à un risque accru de développer la MA. Nos données montrent que ce variant altère l'activité de *SRC*, ainsi que sa capacité à interagir avec *KD2*. De plus, ce variant conduit à une altération du métabolisme de l'*APP*, suggérant que l'impact du variant V177L sur le métabolisme de l'*APP* pourrait résulter d'une altération de l'interaction *KD2/SRC*.

Dans l'ensemble, ces résultats ont permis d'identifier de nouveaux mécanismes potentiels dans la régulation des fonctions de *KD2* et faisant intervenir plusieurs gènes associés au risque de développer la MA (*FERMT2*, *APP* et *SRC*). Ce travail permettrait, à terme, de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques favorisant la survenue d'un dysfonctionnement synaptique en lien avec les facteurs de susceptibilité génétique de la MA.

# ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD), the leading cause of dementia worldwide, is a neurodegenerative disease leading to significant neuronal loss and progressive cognitive decline. It is characterized by 2 main lesions: (i) neurofibrillary tangles due to the intracellular accumulation of hyperphosphorylated Tau protein, and (ii) senile plaques caused by the extracellular aggregation of A $\beta$  peptides, products of APP catabolism. Furthermore, synaptic dysfunction and loss is one of the early markers of the disease. AD is a multifactorial disease with a genetic component estimated at 60-80%. Genome-wide association studies (GWAS) have identified several susceptibility genes for AD, including the FERMT2 gene. This gene encodes the Kindline-2 (KD2) adaptor protein, which has been identified as an important modulator of APP metabolism and A $\beta$  production. Although KD2 was initially described for its role in cell adhesion via integrin activation, its functions in the brain were poorly understood.

Recently, it was reported that APP and KD2 form a protein-protein complex, and that this KD2/APP interaction was necessary for KD2 to have an impact on APP metabolism. Furthermore, KD2 is thought to regulate synaptic plasticity in an APP-dependent manner. It has therefore been suggested that deregulation of KD2 could have a deleterious effect on synaptic function and promote the AD process.

In this context, the aim of my work was to identify the mechanisms that could lead to a loss of KD2 function. Our results suggest that cleavage of the KD2 protein may play a role in the synaptic dysfunctions associated with AD. We have identified KD2 as a novel substrate for two cysteine proteases, caspase and calpain, which are known to regulate synaptic plasticity. In addition, we demonstrate that these cleavages lead to inhibition of KD2's ability to regulate APP metabolism. KD2 is an adaptor protein involved in the formation of protein complexes essential for cell adhesion. These cleavages could therefore inhibit the functions of KD2 by limiting its ability to recruit various partners involved in the regulation of APP metabolism.

Among these partners, we have shown that SRC, recently identified as a genetic risk factor for AD, is also an important regulator of APP metabolism. Our results suggest the existence of an APP/KD2/SRC complex, and that the regulation of APP metabolism by KD2 is dependent on the activity of SRC. Finally, we identified a rare non-synonymous variant (V177L) in SRC, associated with an increased risk of developing AD. Our data show that this variant alters the activity of SRC, as well as its ability to interact with KD2. In addition, this variant leads to an alteration in APP metabolism, suggesting that the impact of the V177L variant on APP metabolism could result from an alteration in the KD2/SRC interaction.

Altogether, these results have made it possible to identify new potential mechanisms in the regulation of KD2 functions, involving several genes associated with the risk of developing AD (FERMT2, APP and SRC). Ultimately, this work will provide a better understanding of the pathophysiological mechanisms promoting the onset of synaptic dysfunction in relation to the genetic susceptibility factors for AD.

## RÉSUMÉ VULGARISÉ POUR LE GRAND PUBLIC (FRANÇAIS / ENGLISH)

Les synapses sont des unités fonctionnelles indispensables au bon fonctionnement des neurones et sont à la base des processus de mémorisation. La perte de ces synapses est l'un des marqueurs précoces de la maladie d'Alzheimer. Récemment, nous avons identifié un gène, *FERMT2*, qui favoriserait cette perte via des mécanismes encore inconnus. Mon travail de thèse a consisté à caractériser les mécanismes moléculaires expliquant le rôle de ce gène dans la survenue de la perte de ces synapses. De façon intéressante, mes résultats suggèrent que ces mécanismes feraient intervenir d'autres gènes connus pour favoriser le développement de la maladie. Ces données permettraient de préciser les mécanismes à l'origine de la perte des synapses observée au cours de la maladie. À terme, de nouvelles stratégies thérapeutiques pourraient être mise en place en visant à lutter contre la mise en place de ces mécanismes afin de préserver les synapses et de limiter la progression de la maladie.

Synapses are functional units that are essential to the proper functioning of neurons and underpin memory processes. The loss of these synapses is one of the early markers of Alzheimer's disease. We have recently identified a gene, *FERMT2*, which is thought to promote this loss via as yet unknown mechanisms. My thesis work involved characterising the molecular mechanisms explaining the role of this gene in the loss of these synapses. Interestingly, my results suggest that these mechanisms involve other genes known to promote the development of the disease. These data will help to clarify the mechanisms behind the loss of synapses observed during the course of the disease. Ultimately, new therapeutic strategies could be put in place to combat the establishment of these mechanisms in order to preserve synapses and limit the progression of the disease.

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications suivantes :

- Chloé Najdek, Pauline Walle, Amandine Flaig, Anne-Marie Ayrat, Florie Demiautte, Audrey Coulon, Valérie Buiche, Neuro-CEB Brain Bank, Erwan Lambert, Carla Gelle, Dolores Siedlecki-Wullich, Julie Dumont, Devrim Kilinc, Fanny Eysert, Jean-Charles Lambert, Julien Chapuis. Cleavage of KINDLIN2 by caspases and calpain controls its impact on APP metabolism. *Soumis*.
- Charles Ellis, Natasha L Ward, Matthew Rice, Neil J Ball, Pauline Walle, Chloé Najdek, Devrim Kilinc, Jean-Charles Lambert, Julien Chapuis, Benjamin T Goult. The structure of an Amyloid Precursor Protein/talin complex indicates a mechanical basis of Alzheimer's Disease. *Open Biology*. doi: 10.1098/rsob.240185. (2024)
- Audrey Coulon, Dolores Siedlecki-Wullich, Chloé Najdek, Carla Gelle, Anne-Marie Ayrat, Florie Demiautte, Erwan Lambert, Alexandre Vandeputte, Priscille Brodin, Tiago Mendes, Jean-Charles Lambert, Devrim Kilinc, Julie Dumont, Julien Chapuis. High-content screening of synaptic density modulators in primary neuronal cultures. *Curr Protoc*. doi: 10.1002/cpz1.904. (2023)
- Audrey Coulon, Florian Rabiller, Mari Takalo, Avishek Roy, Henna Martiskainen, Dolores Siedlecki-Wullich, Tiago Mendes, Celia Lemeu, Lukas-Iohan Carvalho, Anaël Ehrardt, Ana Raquel Melo de Farias, Marc Hulsman, Chloé Najdek, Nina Lannette-Weimann, Alejandra Freire-Regatillo, Philippe Amouyel, Camille Charbonnier, Orio Dols-Icardo, Heli Jeskanen, Roosa-Maria Willman, Teemu Kuulasmaa, Mitja Kurki, John Hardy, Richard Wagner, Sami Heikkinen, Henne Holstege, Petra Mäkinen, Gaël Nicolas, Simon Mead, Michael Wagner, Alfredo Ramirez, Tuomas Rauramaa, Aarno Palotie, Rebecca Sims, Hilkka Soininen, John van Swieten, Julie Williams, Céline Bellenguez, Benjamin Grenier-Boley, Carla Gelle, Erwan Lambert, Anne-Marie Ayrat, Florie Demiautte, Marcos R. Costa, Séverine Deforges, Devrim Kilinc, Christophe Mulle, Julien Chapuis, Mikko Hiltunen, Julie Dumont, Jean-Charles Lambert. Neuronal downregulation of PLCG2 impairs synaptic function and elicits Alzheimer disease hallmarks. *Soumis*.

Ainsi qu'aux communications suivantes :

- Journée André Verbert – Colloque des doctorants  
Présentation orale: « Characterization of the mechanisms responsible for a loss of FERMT2 function in Alzheimer's disease » - Faculté de médecine de Lille 2022.
- AAIC – Alzheimer's Association International Conference  
Poster: « FERMT2 cleavage impacts APP metabolism in a Src-dependent manner » - Amsterdam, juillet 2023.
- Participation à une animation scientifique – Échange doctorants/M1  
Poster: « Characterization of the mechanisms responsible for loss of FERMT2 function in Alzheimer's disease » - Faculté de Médecine 16 mars 2023.
- Thèse en 180 secondes – UMR 1167  
Présentation orale : « Caractérisation des mécanismes responsables de la perte de fonction de FERMT2 dans la maladie d'Alzheimer » - Institut Pasteur de Lille, octobre 2022.

# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>2</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>RÉSUMÉ VULGARISÉ POUR LE GRAND PUBLIC (FRANÇAIS / ENGLISH) .....</b>	<b>9</b>
<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....</b>	<b>10</b>
<b>ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>19</b>
<b>PREMIERE PARTIE : LA MALADIE D'ALZHEIMER – GENERALITES.....</b>	<b>19</b>
1. POUR COMMENCER, COMMENT A-T-ELLE ETE DECOUVERTE ?.....	19
2. QUELLE EST L'EVOLUTION CLINIQUE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER ?.....	21
3. QUELLES SONT SES CARACTERISTIQUES NEUROPATHOLOGIQUES ?.....	22
3.1. Les lésions macroscopiques .....	22
3.2. Les lésions microscopiques .....	23
3.2.1. Les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires.....	23
3.2.2. Les plaques amyloïdes extracellulaires .....	25
3.2.3. La neuro-inflammation.....	27
3.2.4. Dysfonctions et perte synaptiques.....	28
4. COMMENT DIAGNOSTIQUE-T-ON LA MALADIE D'ALZHEIMER ? .....	28
4.1. Première étape, le diagnostic clinique .....	29
4.2. Ensuite, le diagnostic paraclinique .....	30
5. QUELLES SONT LES OPTIONS THERAPEUTIQUES POUR LA MALADIE D'ALZHEIMER ? .....	32
5.1. Quels sont les traitements symptomatiques disponibles ?.....	32
5.1.1. Les traitements médicamenteux.....	32
5.1.2. Les traitements non médicamenteux.....	33
5.2. Les traitements « disease-modifiers », porteurs d'espoir ?.....	33
<b>DEUXIEME PARTIE : ÉTIOLOGIE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER .....</b>	<b>35</b>
6. LES FORMES MONOGENIQUES DE LA MALADIE D'ALZHEIMER .....	35
6.1. La protéine précurseur de l'amyloïde ou APP .....	36
6.1.1. Structure de l'APP .....	36



6.1.2. Fonctions de l'APP .....	37
6.1.2.1. Caractéristiques de l'APP en tant que molécule d'adhésion cellulaire.....	38
Le domaine extracellulaire de l'APP .....	38
Le domaine intracellulaire de l'APP .....	39
6.1.2.2. Les rôles de l'APP sur la croissance des neurites, la synaptogénèse et la plasticité synaptique.....	40
6.1.3. Le métabolisme de l'APP .....	41
6.1.3.1. La voie non-amyloïdogène .....	42
6.1.3.2. La voie amyloïdogène.....	43
6.1.3.3. Autres voies de clivage de l'APP .....	44
6.2. Le complexe de la $\gamma$ -sécrétase dépendant des Présénilines .....	46
6.3. Trois gènes et une hypothèse physiopathologique.....	48
6.3.1. Découvertes de mutations dans le gène APP.....	48
6.3.2. Fondements et Arguments en Faveur de l'hypothèse de la cascade amyloïde...49	
6.3.3. Critiques de l'hypothèse de la cascade amyloïde .....	50
7. LA COMPLEXITE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER : AU-DELA DES FORMES MONOGENIQUES ? ....	51
7.1. Les facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer.....	51
7.1.1. Les facteurs de risque modifiables .....	51
7.1.2. Les facteurs de risque non modifiables .....	52
7.2. Quelles approches permettent l'identification de facteurs de risque génétique pour la maladie d'Alzheimer ?.....	52
7.2.1. Qu'est-ce qu'un variant génétique ? .....	52
7.2.2. Les études d'association par approche gène-candidat .....	53
7.2.3. Les études d'association pangénomiques (GWAS).....	55
7.2.4. Limites des approches GWAS.....	57
7.2.5. Le séquençage d'exome entier (WES) .....	58
7.3. Implication des gènes GWAS dans le métabolisme de l'APP ? .....	59
<b>TROISIEME PARTIE : LES ADHESIONS FOCALES : DES STRUCTURES COMPLEXES ET MULTIFORMES.....</b>	<b>62</b>
8. LES ADHESIONS FOCALES BASEES SUR LES INTEGRINES.....	62
8.1. L'assemblage des adhésions focales .....	64
8.2. Le désassemblage des adhésions focales .....	66
9. LES CONTACTS PONCTUELS : EQUIVALENTS NEURONAUX DES ADHESIONS FOCALES .....	67

9.1. Rôles des contacts ponctuels dans le guidage axonal et la stabilisation des synapses .....	67
9.2. Similarités entre contacts ponctuels et adhésions focales .....	68
<b>QUATRIEME PARTIE : LA PROTEINE KINDLINE-2 .....</b>	<b>70</b>
10. LA FAMILLE DES PROTEINES KINDLINES .....	70
10.1. Structure des Kindlines .....	70
10.2. Les Kindlines : des protéines adaptatrices .....	72
11. ZOOM SUR KINDLINE-2 : UNE PROTEINE ASSOCIEE AU RISQUE DE MA .....	73
11.1. Quelles sont les fonctions identifiées de Kindline-2 ? .....	74
11.1.1. Kindline-2 contribue à l'activation des intégrines .....	74
11.1.2. Kindline-2 facilite la liaison des intégrines au cytosquelette d'actine .....	75
11.1.3. Kindline-2 régule l'expression des gènes.....	76
11.1.4. Kindline-2 joue un rôle dans la modulation du cycle cellulaire .....	77
11.1.5. Kindline-2 intervient dans la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose .....	77
11.1.6. Kindline-2 participe à l'activation de l'endocytose .....	77
11.1.7. Kindline-2 est impliquée dans le processus d'angiogenèse .....	78
11.1.8. La dérégulation de Kindline-2 est associée à divers cancers .....	78
11.2. Les mécanismes de régulation de Kindline-2 .....	79
11.2.1. Kindline-2, Src et les intégrines .....	79
11.2.2. Dégradation protéasomique de Kindline-2.....	80
11.3. Kindline-2 dans la maladie d'Alzheimer .....	80
11.3.1. Kindline-2 régule métabolisme de l'APP .....	80
11.3.2. Kindline-2 interagit directement avec l'APP .....	82
11.3.3. Kindline-2 régule la croissance axonale et la plasticité synaptique de manière dépendante de l'APP .....	83
11.3.4. Les variants de Kindline-2 associés au risque de MA .....	83
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>85</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>86</b>
LIGNEE HEK293-APP <sup>695WT</sup> .....	86
SOURIS FERMT2 <sup>FL/FL</sup> ET CULTURE DE NEURONES PRIMAIRES .....	86
ÉCHANTILLONS POST-MORTEM HUMAINS.....	87
FRACTIONNEMENT SYNAPTIQUE .....	88

WESTERN BLOT ET QUANTIFICATION DES PEPTIDES AB .....	88
PROXIMITY LIGATION ASSAY (PLA) .....	90
GST PULL-DOWN .....	90
CO-IMMUNOPRECIPITATION .....	91
MUTAGENÈSE DIRIGÉE.....	91
ANALYSE STATISTIQUE.....	93
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>94</b>
PARTIE 1 : PERTE DE FONCTION DE KINDLINE-2 PAR UN CLIVAGE DE LA PROTEINE.....	94
1. Identification d'un clivage de la protéine Kindline-2.....	94
2. Le fragment de 57-kDa de Kindline-2 est issu du clivage par la calpaïne.....	98
3. Le fragment de 39-kDa de Kindline-2 est généré par le clivage des caspases.....	100
4. Impact du clivage de Kindline-2 sur le métabolisme de l'APP .....	105
5. Conclusion intermédiaire .....	108
PARTIE 2 : PERTE DE FONCTION DE KINDLINE-2 DUE A D'AUTRES FACTEURS DE SUSCEPTIBILITE GENETIQUE. ....	109
1. Kindline-2 régule le métabolisme de l'APP de manière Src dépendante .....	109
2. Identification de variants de Src associés au risque de MA.....	114
2.1. Src, un nouveau facteur de risque génétique pour la MA .....	114
2.2. Le variant V177L impacte l'activité de la kinase Src.....	117
2.3. Le variant V177L de Src impacte le métabolisme de l'APP .....	118
2.4. Le variant V177L impacte l'interaction entre Src et Kindline-2.....	120
2.5. Conclusion intermédiaire.....	122
3. Régulation bidirectionnelle entre Kindline-2 et Src.....	123
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>126</b>
MECANISMES DE REGULATION DE L'INTERACTION KINDLINE-2 / APP .....	126
1. Régulation par l'intervention de protéases .....	126
1.1. Comment ces clivages sont-ils régulés ?.....	127
En condition physiologique ?.....	127
Dans la physiopathologie de la MA ? .....	128
1.2. Quel est l'impact de ces clivages sur les fonctions de Kindline-2 ?.....	129
Inhibition du recrutement de partenaires .....	129
Impact sur la capacité de dimérisation de Kindline-2.....	130
2. Régulation par l'effet d'un autre facteur de risque de la MA .....	131

2.1. Est-ce que la protéine Src est impliquée dans la régulation du métabolisme de l'APP ? .....	131
2.2. Le variant V177L de Src : un variant perte de fonction ? .....	132
2.3. Régulation mutuelle entre Src et Kindline-2 ? .....	133
2.4. Preuves supplémentaires de l'implication des protéines des adhésions focales dans la physiopathologie de la MA.....	135
PERSPECTIVES .....	137
1. Caractériser les voies régulées par Kindline-2 .....	137
2. Impact des variants de Src dans le processus physiopathologie de la MA .....	138
3. Étude de l'impact de la voie APP/KD2/Src sur la pathologie Tau .....	140
4. Implication de Kindline-2 et APP dans la mécano-transduction synaptique.....	141
CONCLUSION .....	144
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>145</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>179</b>

# ABRÉVIATIONS

A			
<b>Aβ</b>	Peptide β-amyloïde	<b>APHP</b>	Assistance Publique – Hôpitaux de Paris
<b>ABS</b>	Actin-Binding Site		
<b>ADL</b>	Activities of Daily Living	<b>APH1</b>	Anterio-Pharynx Defective-1
<b>ADP</b>	Adénosine Diphosphate		
<b>AICD</b>	APP IntraCellular Domain	<b>ApoE</b>	APOLipoprotein E
<b>ADAM</b>	A Disintegrin And Metalloprotease	<b>APLP</b>	Amyloid Precursor-Like Protein
<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique	<b>AP-2</b>	Adaptor Protein complex 2
<b>APP</b>	Amyloid Precursor Protein	<b>ARH</b>	Autosomal Recessive Hypercholesterolemia protein
<b>AEP</b>	Asparagine EndoPeptidase	<b>Arp2/3</b>	Actin Related Protein 2/3
<b>ABCA7</b>	ATP Binding Cassette subfamily A member 7	<b>ATP</b>	Adenosine Triphosphate
<b>ARNm</b>	Acides RiboNucléique Messenger	<b>ARN</b>	Acides RiboNucléiques
B			
<b>BACE</b>	B-site APP Cleaving Enzyme	<b>BRCA1</b>	Breast Cancer 1
<b>BIN1</b>	Bridging Integrator 1		
C			
<b>CD2AP</b>	CD2 Associated Protein		
<b>CTF</b>	Carboxy-Terminal Fragment		
D			
<b>DNF</b>	Dégénérescence NeuroFibrillaire	<b>DL</b>	Déséquilibre de liaison
<b>Dab2</b>	Disabled-2	<b>DOK1</b>	Docking Protein 1
		<b>DNMT</b>	DNA MethylTransferases
E			
<b>eQTL</b>	Expression Quantitative Trait Loci		
F			
<b>FAK</b>	Focal Adhesion Kinase	<b>FERM</b>	4.1/ezrin/radixin/moesin
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration		
<b>FDG</b>	FluoroDéoxyGlucose		
G			
<b>GABA</b>	Gamma-AminoButyric Acid	<b>GWAS</b>	Genome Wide Association Study
<b>GSK3β</b>	Glycogène synthase kinase-3β	<b>GTP</b>	Guanosine DiPhosphate
H			
<b>HEK293</b>	Human Embryonic Kidney 293 cells	<b>HSPG</b>	Heparan <i>Sulfate</i> ProteoGlycan
<b>HDAC</b>	Histone Désacétylase		
I			
<b>IADL</b>	Instrumental Activities of Daily Living	<b>IRM</b>	Imagerie par Résonance Magnétique
<b>ILK</b>	Integrin-Linked Kinase	<b>IC</b>	Intervalle de Confiance
K			
<b>KPI</b>	Kunitz Protease Inhibitor	<b>KO</b>	Knockout

<b>L</b>			
<b>LCR</b>	Liquide Céphalo-Rachidien	<b>LTP</b> <b>LRP1</b>	Long-Term Potentiation Low density lipoprotein receptor-related protein 1
<b>M</b>			
<b>MA</b>	Maladie d'Alzheimer	<b>MMSE</b>	Mini-Mental State Examination
<b>MAP</b>	Microtubule-Associated Protein	<b>MoCA</b>	Montreal Cognitive Assessment
<b>MAP</b>	Mitogen-Activated Protein	<b>MT-MMP</b>	Membrane-Type Matrix Metalloproteinase
<b>MAPT</b>	Microtubule-Associated Protein Tau	<b>MPT</b>	Modifications post-traductionnelles
<b>MCI</b>	Mild Cognitive Impairment	<b>MOB1</b>	Mps One Binder
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire	<b>MMP</b>	Metalloproteinase
<b>MIS</b>	Memory Impairment Screen	<b>MAF</b>	Minor Allele Frequency
<b>N</b>			
<b>NMDA</b>	N-Méthyl-D-aspartate	<b>NPI</b>	Neuropsychiatric Inventory
<b>NCT</b>	Nicestrine	<b>NLS</b>	Nuclear Localization Sequence
<b>O</b>			
<b>OR</b>	Odds Ratio		
<b>P</b>			
<b>PEN</b>	Presenilin-Enhancer-2	<b>PICALM</b>	Phosphatidylinositol binding Clathrin Assembly Protein
<b>PHF</b>	Paired Helical Filament	<b>PSEN</b>	Gènes codant pour les présénilines
<b>PKC</b>	Protéine Kinase C	<b>PTB</b>	PhosphoTyrosine-Binding domain
<b>PTEN</b>	Phosphatase and TENsin homologue	<b>PTP1B</b>	Protein Tyrosine Phosphatase 1B
<b>PtdIns</b>	Phosphatidylinositol	<b>PH</b>	Pleckstrin Homology
<b>R</b>			
<b>RACK1</b>	Receptor for Activated C-Kinase 1		
<b>RE</b>	Réticulum Endoplasmique		
<b>S</b>			
<b>SORL1</b>	Sortilin Related Receptor 1	<b>SNC</b>	Système Nerveux Central
<b>SRC</b>	Sarcoma, une protéine tyrosine kinase	<b>SNP</b>	Système Nerveux Périphérique
<b>T</b>			
<b>TEP</b>	Tomographie par émission de positons	<b>TCF4</b>	Transcription Factor 4
<b>TEM</b>	Transition épithélio-mésenchymateuse		
<b>U</b>			
<b>UTR</b>	Untranslated Transcribed Region		

# INTRODUCTION

## Première partie : La maladie d'Alzheimer – Généralités

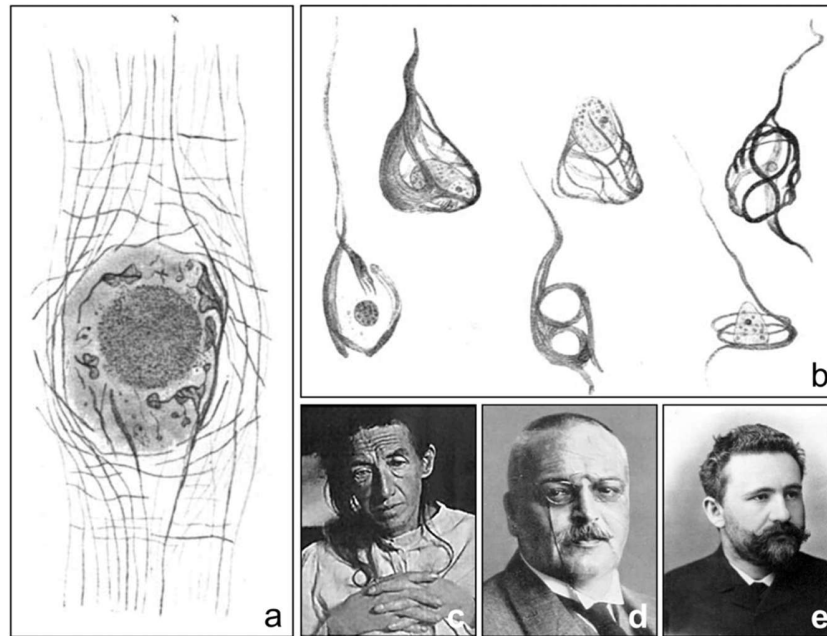
La maladie d'Alzheimer (MA) et les démences apparentées constituent un enjeu majeur de santé publique en raison de l'absence de traitements curatifs ou préventifs. Selon l'Organisation mondiale de la Santé, plus de 55 millions de personnes sont atteintes de démences dans le monde. La MA serait responsable de 50 à 70 % des cas (1). Cette pathologie représente ainsi la principale cause d'invalidité et de dépendance chez les personnes âgées.

### 1. Pour commencer, comment a-t-elle été découverte ?

Aujourd'hui, la MA est bien connue du grand public, bien que ses symptômes aient été observés depuis longtemps. Des écrits de l'Antiquité, notamment d'auteurs comme Hippocrate et Platon, évoquent la défaillance mentale chez les personnes âgées, exprimant la conviction que la vieillesse est inséparable de cette défaillance mentale (2). Au Moyen Âge, ces symptômes étaient associés à un dysfonctionnement du cœur, alors considéré comme le siège des processus mentaux tels que la mémoire, la pensée et le jugement. À l'époque moderne, la démence était parfois attribuée à la sorcellerie ou perçue comme une punition pour le péché. Jusqu'au XIX<sup>e</sup> siècle, les progrès dans la compréhension de la démence étaient limités, car elle était souvent considérée comme une conséquence inévitable du vieillissement.

Ce n'est qu'en 1906 que la MA a été caractérisée pour la première fois par le docteur Alois Alzheimer, à la suite de l'examen clinique et neuro-pathologique de l'une de ses patientes, Mme Augusta Deter. Cette patiente, âgée de 51 ans, manifestait plusieurs symptômes notamment de sévères troubles de la mémoire, une aphasie, des hallucinations et des pertes d'orientations spatio-temporelles. À son décès en 1906, le docteur Alois Alzheimer réalisa un examen *post mortem* et découvrit une atrophie cérébrale ainsi que deux anomalies au sein du tissu cérébral : des dépôts protéiques anormaux à l'extérieur des neurones et une dégénérescence des neurones (Figure 1 a, b). Il partagea ces observations lors de la 37<sup>ème</sup> assemblée des psychiatres du sud-ouest de l'Allemagne en 1906. Ce n'est cependant qu'en 1910 qu'Emil Kraepelin, psychiatre allemand et collègue d'Alois Alzheimer, inclut la description de la maladie dans la huitième édition

de son traité de psychiatrie et proposa de la nommer « maladie d'Alzheimer » suite aux découvertes de son confrère.



**Figure 1 :** a,b Illustrations par Aloïs Alzheimer d'un dépôt protéique anormal (a) et de dégénérescences neurofibrillaires (b) observés en utilisant la méthode d'imprégnation argentique de Bielschowsky (3). c. Portrait d'Augusta Deter (1850-1906). d. Portrait du Dr Aloïs Alzheimer, psychiatre, neurologue et neuro-pathologiste allemand (1864-1915). e. Portrait d'Emil Kraepelin, psychiatre allemand (1856-1926).

Cependant, la description initiale de la MA reposait sur un nombre très limité de cas, principalement chez des patients relativement jeunes. Ainsi, jusqu'à la fin des années 1960, la MA, alors appelée démence présénile, était considérée comme distincte de la démence sénile, qui touchait les personnes âgées et qui était vue comme une conséquence normale du vieillissement. Les études cliniques et neuropathologiques ultérieures ont cependant permis de reconnaître la MA comme une pathologie en tant que telle.

Il faudra ensuite attendre les années 1984-1985 pour que les principaux composants des lésions cérébrales observées par Aloïs Alzheimer soient caractérisés. Glenner et Wong ont démontré que l'accumulation du peptide  $\beta$ -amyloïde (ou A $\beta$ ) est à l'origine des plaques séniles (4), ces dépôts protéiques anormaux initialement rapportés par le Dr Aloïs Alzheimer. L'année suivante, Brion et ses collègues ont identifié que l'accumulation de la protéine Tau anormalement phosphorylée est quant à elle, responsable des dégénérescences neurofibrillaires (5).



## 2. Quelle est l'évolution clinique de la maladie d'Alzheimer ?

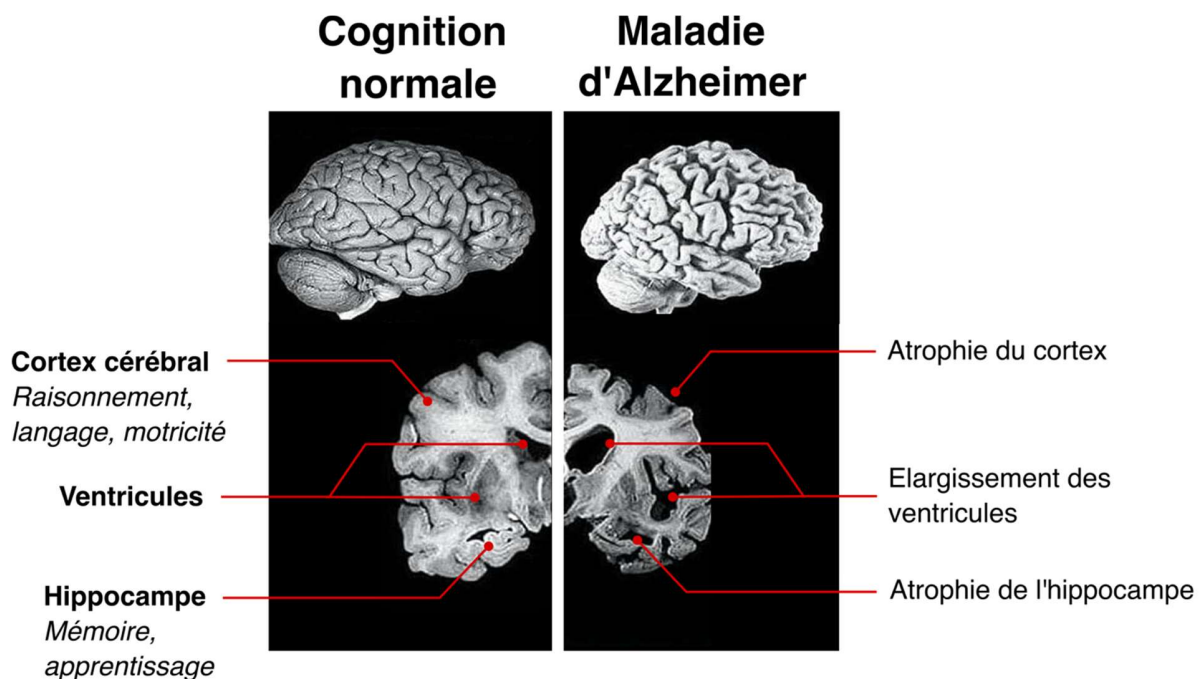
La MA est une maladie neurodégénérative à évolution lente qui conduit au déclin progressif et irréversible des facultés cognitives, en particulier de la mémoire. On peut la caractériser cliniquement en différents stades, même s'il n'existe pas de frontière nette entre eux (6). En effet, l'intensité ainsi que l'évolution des symptômes varient selon les individus, ce qui rend parfois la transition d'un stade à l'autre difficile à reconnaître.

- ⇒ Le premier stade, appelé stade préclinique ou asymptomatique, est caractérisé par l'absence de symptômes cliniques détectables, ou par des symptômes si légers qu'ils passent inaperçus. Il est toutefois possible de détecter des modifications de certains marqueurs biologiques (7,8). Malheureusement, la grande majorité des cas ne sont pas identifiés durant cette phase, qui peut durer plusieurs années, voire plusieurs décennies.
- ⇒ Le stade suivant est appelé stade pré-déméntiel ou prodromal. Il s'agit d'une phase de troubles cognitifs légers (MCI pour *mild cognitive impairment*) durant laquelle les patients présentent des troubles cognitifs cliniquement significatifs, pouvant perturber la vie quotidienne tout en permettant à l'individu de conserver son autonomie. Parmi ces symptômes, on observe des pertes de mémoire (oublier des dates, des mots, ou l'endroit où l'on se trouve), des changements d'humeur (apathie, dépression), des difficultés de concentration et des problèmes de coordination. C'est souvent à ce stade que la MA est diagnostiquée.
- ⇒ Le stade de démence est atteint lorsque les troubles cognitifs s'aggravent, entraînant une perte d'indépendance dans les tâches quotidiennes. Ce stade de démence peut être subdivisé en démence légère, modérée et sévère (9). Dans sa forme la plus fréquente, la MA se caractérise par des troubles de la mémoire, progressivement associés à d'autres troubles cognitifs. Parmi ceux-ci, on retrouve des difficultés d'orientation spatio-temporelle, des troubles du langage et de l'écriture, une apraxie (difficulté à exécuter des gestes), une agnosie (difficulté à reconnaître les visages ou les objets), une altération des fonctions exécutives (raisonnement, planification, prise de décision) et des modifications du comportement (10). À terme, les symptômes observés au stade de démence conduisent généralement à une institutionnalisation.

### 3. Quelles sont ses caractéristiques neuropathologiques ?

La MA est une maladie neurologique qui entraîne des changements structuraux dans le cerveau, visibles à l'œil nu et au microscope lors d'un examen *post-mortem*.

#### 3.1. Les lésions macroscopiques



**Figure 2 :** Atrophie cérébrale survenant dans la MA (Source : Alzheimer's association).

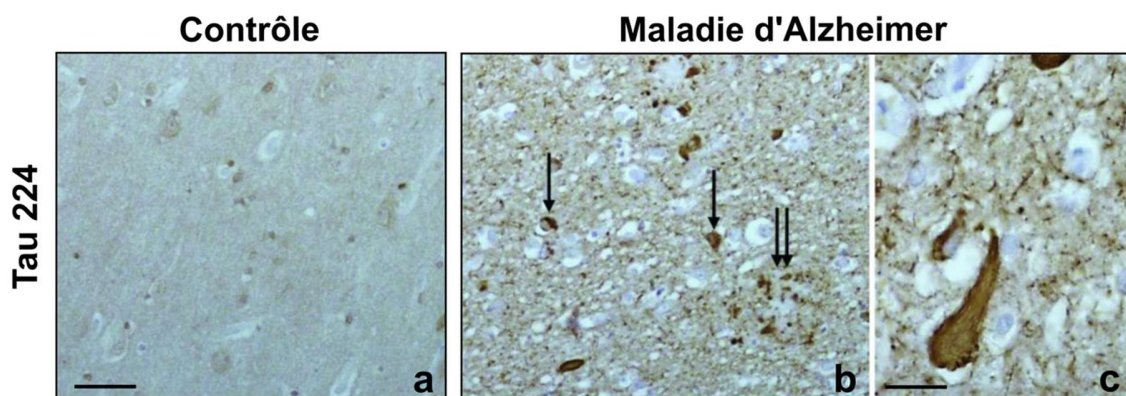
Lors de l'examen *post mortem*, la première observation notable est la différence au niveau des circonvolutions cérébrales, indiquant une atrophie cérébrale, marqueur d'une mort neuronale massive (Figure 2). Cette atrophie n'est toutefois pas homogène. Elle affecte principalement la région hippocampique, dont l'évolution est corrélée au déclin cognitif (11), ainsi que le cortex cérébral, y compris le cortex entorhinal et l'amygdale (12,13). La diminution du volume du cortex étant associée à une dilation des ventricules. Toutefois, il est important de noter que certaines de ces modifications macroscopiques ne sont pas spécifiques à la MA. L'atrophie de l'hippocampe, par exemple, peut être présente dans d'autres types de démences, telles que la maladie de Parkinson ou la démence vasculaire (14,15).

### 3.2. Les lésions microscopiques

Les lésions microscopiques de la MA sont caractérisées par des accumulations protéiques ainsi que des pertes cellulaires et synaptiques. À noter que pour observer ces lésions, les échantillons doivent être prélevés dans des régions bien précises du cerveau, car leur distribution est hétérogène.

#### 3.2.1. Les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires

La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) est l'une des lésions retrouvées dans la MA (Figure 3). La DNF est constituée de filaments appariés en hélice (*Paired Helical Filaments* ou PHF) dont les constituants principaux sont les protéines Tau. Cette protéine est codée par le gène *MAPT* (*Microtubule Associated Protein Tau*) sur le chromosome 17 (16), et fait partie de la famille des MAP (*Microtubule Associated Proteins*). Elle est principalement retrouvée dans le compartiment axonal des neurones matures et joue un rôle crucial dans la polymérisation et la stabilité des microtubules, composants principaux du cytosquelette (5,17,18). La protéine Tau est également impliquée dans le transport axonal et la plasticité synaptique (19–21). Des modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation, régulent la fonction physiologique de la protéine Tau. Dans la MA, on retrouve une hyperphosphorylation ainsi qu'une phosphorylation anormale de cette protéine, ce qui entraîne la dissociation de la protéine Tau des microtubules et favorise son agrégation en PHF, entraînant la formation et l'accumulation des DNF dans le corps cellulaire du neurone (Figure 3b,c).

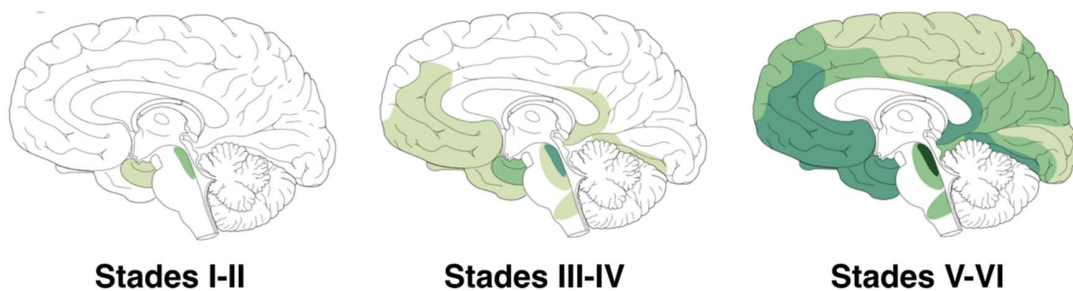


**Figure 3 :** Immunohistochimie de la protéine Tau chez (a) un témoin neurologiquement normal et (b,c) un patient atteint de la MA. (b) L'immunohistochimie anti-Tau 224 (fragments de Tau couvrant la partie N-terminale jusqu'à l'acide aminé 224) montre des enchevêtrements neurofibrillaires (flèche) et des neurites dystrophiques (double flèche). (c) Les

enchevêtrements neurofibrillaires sont visibles à un plus fort grossissement. Les barres d'échelle représentent 50  $\mu\text{m}$  en **a** et **b** ; et 20  $\mu\text{m}$  en **c** ; d'après Cicognola et *al.* 2019 (22).

En 1991, H. Braak et E. Braak ont identifié plusieurs stades de propagation de ces DNF au cours du développement de la MA (23). Dans le cadre de la MA typique, ce schéma débute dans le cortex entorhinal et le locus coeruleus (stades I-II) et, à mesure que la maladie progresse, les DNF s'étendent aux zones d'association limbiques (stades III-IV) et isocorticales (V-VI) (Figure 4).

L'évolution spatio-temporelle des DNF est corrélée aux stades cliniques de la maladie. Le stade entorhinal (I-II) correspondrait au stade asymptomatique. Le stade limbique (III-IV) serait associé au stade pré-déméntiel caractérisé par des troubles de la mémoire, notamment des souvenirs récents. Le stade cortical (V-VI) marquerait quant à lui l'apparition des symptômes de démence (23,24). La sévérité du déclin cognitif dans la MA est d'ailleurs mieux corrélée avec la charge de DNF qu'avec les dépôts amyloïdes (25).



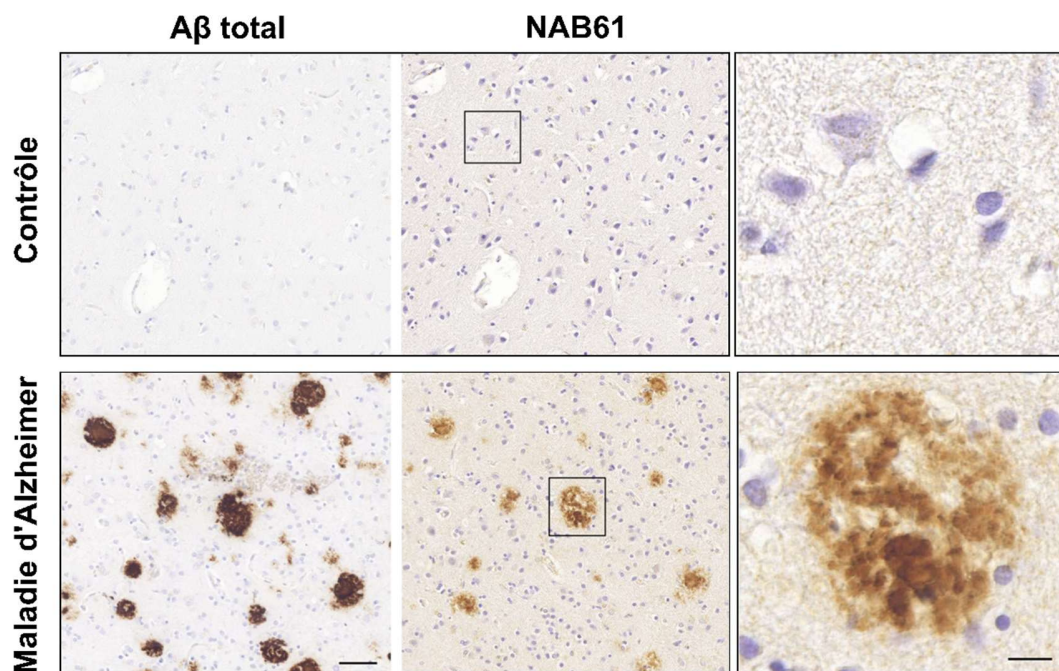
**Figure 4** : Représentation de l'évolution spatio-temporelle des DNF au cours du développement de la MA, selon Braak et Braak, d'après Goedert et *al.* 2015 (26).

Il est important de noter que les DNF ne sont pas spécifiques à la MA et se retrouvent dans d'autres maladies neurodégénératives regroupées sous le terme « tauopathies », telles que certaines démences fronto-temporales et syndromes parkinsoniens (27). Bien que les DNF ne soient pas exclusives à la MA, leur distribution topographique dans le cerveau est spécifique et reflète un mécanisme particulier à cette maladie.

### 3.2.2. Les plaques amyloïdes extracellulaires

La plaque amyloïde ou plaque sénile, contrairement à la DNF, constitue une lésion extraneuronale présente dans la MA (Figure 5). Elle est principalement composée de peptides  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) agrégés, issus du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP, Amyloid Precursor Protein). Le métabolisme de l'APP et la production des peptides  $A\beta$  seront détaillés ultérieurement.

L'étude des plaques séniles a révélé la présence de diverses molécules associées, telles que plusieurs protéases (28,29), du cholestérol et son transporteur, la protéine ApoE (Apolipoprotéine E) (30,31), ainsi que des facteurs du complément (32). Ces éléments indiquent l'implication de différents processus rassemblés pour la présence d'amyloïde, notamment la réponse pro-inflammatoire, la perturbation des neurites, et la perte synaptique et cellulaire.

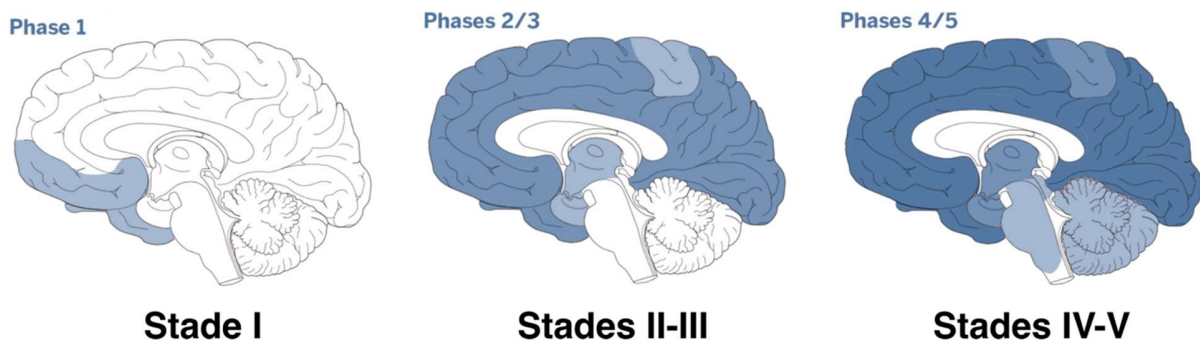


**Figure 5 :** Images représentatives de dépôts d' $A\beta$  formant des plaques amyloïdes. Immunoréactivité de l' $A\beta$  total et de l'anticorps NAB61 (qui cible les formes toxiques d' $A\beta$ , dimères d' $A\beta$  et oligomères solubles) chez un témoin neurologiquement normal et un patient atteint de la MA ; barre d'échelle = 50  $\mu$ m. Les plaques d' $A\beta$  sont visibles à un plus fort grossissement ; barre d'échelle = 10  $\mu$ m, d'après Querol-Vilaseca et *al.* 2019 (33).

Au cours de la maladie, la progression de la pathologie amyloïde diffère de celle de la pathologie Tau. Les plaques amyloïdes se développent initialement dans un ou plusieurs sites du néocortex



temporal basal et orbitofrontal (stade I). Elles apparaissent ensuite dans l'ensemble du néocortex, ainsi que dans la formation hippocampique, le diencephale et les ganglions de la base (stades II et III). Dans les cas sévères de la MA, les plaques A $\beta$  sont également présentes dans le cervelet et le tronc cérébral (stades IV et V) (23,34,35) (Figure 6).



**Figure 6** : Progression spatiale de la pathologie amyloïde au cours du développement de la MA, d'après Goedert et al. 2015 (26).

Une étude longitudinale sur un groupe de 200 participants a révélé que les dépôts amyloïdes progressent lentement et peuvent précéder de plus de vingt ans les changements volumétriques du cerveau et les problèmes cognitifs (36). De plus, la progression de la pathologie amyloïde semble ralentir à mesure que la maladie progresse, jusqu'à atteindre un plateau (37,38). En d'autres termes, l'accumulation d'A $\beta$  précède le déclin cognitif, et une fois que ce plateau est atteint, les symptômes de démence deviennent plus sévères. Ainsi, l'accumulation d'A $\beta$  peut être un biomarqueur permettant de prédire le risque de transition d'une personne sans troubles cognitifs à un stade pré-déméntiel, voire d'un stade pré-déméntiel au stade de démence légère (stade I). Cependant, il pourrait être moins utile comme marqueur pour suivre la progression de la maladie une fois les symptômes devenus plus sévères (stades II à V) (Figure 6). Ces études soutiennent donc l'idée que l'accumulation d'A $\beta$  précède de plusieurs années l'apparition des premiers symptômes de la MA. Cela, ajouté à la lenteur de cette accumulation, offre potentiellement une large fenêtre temporelle pour une intervention thérapeutique anti-A $\beta$ .

### 3.2.3. La neuro-inflammation

De nombreuses preuves indiquent que l'activation anormale des astrocytes et de la microglie provoque une gliose réactive et une neuroinflammation, deux processus cruciaux dans la progression de la MA, en complément des caractéristiques pathologiques bien connues que sont la protéine Tau et l'agrégation des peptides A $\beta$ .

L'inflammation est une réponse du système immunitaire physiologique, visant à défendre l'organisme en éliminant les débris nocifs, les agents pathogènes, et les cellules endommagées. Dans le cerveau, le système immunitaire repose principalement sur deux types de cellules gliales : les cellules de la microglie et les astrocytes. Les cellules microgliales, les macrophages spécifiques du cerveau, assurent notamment la surveillance immunitaire (39). Les astrocytes, quant à eux, remplissent diverses fonctions homéostatiques, comme la modulation de la neurotransmission, l'apport métabolique et la régulation de la réponse immunitaire par la libération des cytokines (40).

Au début de la MA, l'activation de la microglie et des astrocytes semble bénéfique, car elle contribue à l'élimination de l'A $\beta$ . Cependant, à mesure que la maladie progresse, cette activation continue peut exacerber la pathologie de la MA (41). Par exemple, l'activation continue de la microglie peut intensifier son activité d'élagage des synapses, aggravant ainsi la perte neuronale (39). De plus, cette activation conduit à la libération de molécules pro-inflammatoires telles que les cytokines, dont certaines entretiennent l'inflammation chronique, tandis que d'autres réduisent l'activité phagocytaire, favorisant l'accumulation d'A $\beta$  (42,43).

Plusieurs études ont relevé la présence de marqueurs inflammatoires dans le cerveau des patients atteints de MA, notamment des niveaux élevés de cytokines dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien (LCR), ainsi qu'une gliose (24,44,45). L'augmentation de ces molécules est positivement corrélée avec les troubles cognitifs chez les personnes atteintes de la MA (46,47).

Des recherches ont montré que l'A $\beta$  peut activer la microglie et stimuler la production de cytokines inflammatoires, suggérant que l'A $\beta$  est un facteur important dans l'activation microgliale (48,49). En effet, l'administration intracérébrale d'A $\beta$  chez des rongeurs adultes normaux provoque une neuroinflammation, une perte neuronale et des troubles cognitifs (50). De plus, il a été démontré que comme pour l'A $\beta$ , les oligomères de Tau peuvent déclencher une réponse inflammatoire (51).

La neuroinflammation et les cytokines pro-inflammatoires augmentent la phosphorylation de la protéine Tau, entraînant une instabilité du cytosquelette et la mort neuronale (52,53).

#### **3.2.4. Dysfonctions et perte synaptiques**

La perte synaptique est une composante significative de l'atrophie cérébrale observée chez les patients atteints de la MA. Les synapses, ces jonctions essentielles pour la communication neuronale, sont des structures dynamiques modulables en nombre, morphologie et fonction, permettant ainsi de renforcer ou de réduire les contacts synaptiques et la transmission entre les neurones. Dès les années 1990, des analyses de biopsies des lobes frontaux chez des patients atteints de MA légère à modérée ont révélé une réduction significative du nombre de synapses, avec des corrélations directes entre la densité synaptique et les scores cognitifs (54). D'ailleurs, parmi tous les changements pathologiques observés dans le cerveau des personnes atteintes de la MA, la perte de synapses est celle qui présente la corrélation la plus forte avec le déclin des fonctions cognitives (55–57). Il existe également une corrélation importante entre les niveaux de protéines synaptiques et les symptômes cognitifs des patients (58,59). Les troubles synaptiques précèdent la dégénérescence neuronale, étape clé dans la transition entre la phase asymptomatique et la phase symptomatique (60,61), constituant ainsi un indicateur structurel majeur du déclin cognitif et offrant une fenêtre d'intervention thérapeutique avant l'apparition des signes cliniques.

#### **4. Comment diagnostique-t-on la maladie d'Alzheimer ?**

À ce jour, il n'existe aucun test de diagnostic unique permettant de déterminer si une personne est atteinte de la MA. Son diagnostic est un processus complexe qui nécessite une approche multidisciplinaire. Il est essentiel de combiner des méthodes cliniques et paracliniques (examens de laboratoire et d'imagerie médicale) pour établir un diagnostic précis et différencier la MA d'autres types de démence ou de troubles cognitifs.



#### 4.1. Première étape, le diagnostic clinique

Le processus de diagnostic commence par un examen clinique avec un neuropsychologue afin d'évaluer la présence et la gravité des troubles cognitifs. À ce stade, il est important de faire la distinction entre une plainte mnésique et un trouble mnésique. Selon l'APHP, 50 % des personnes de plus de 60 ans se plaignent de leur mémoire. Ces plaintes ne sont pas nécessairement liées à un problème de mémoire mais plutôt à des difficultés de concentration et d'attention dues à la fatigue, à l'anxiété ou à d'autres symptômes, qui peuvent ressembler à des troubles de la mémoire. De plus, il est recommandé de venir avec un proche lors de cet examen, car la MA implique souvent une anosognosie, c'est-à-dire une absence de conscience des symptômes par la personne atteinte. Pour identifier le type de troubles cognitifs, des tests cliniques permettent d'évaluer différents paramètres (Tableau 1).

Paramètres mesurés	Outils d'évaluation
Mémoire	Épreuve des 5 mots (62) Memory Impairment Screen (MIS) (63)
Fonctions exécutives	Test de Stroop (64) Trail Making Test (65).
Efficience cognitive globale	Mini-Mental State Examination (MMSE) (66) Montreal Cognitive Assessment (MoCA) (67)
Troubles psycho-comportementaux	Neuropsychiatric Inventory (NPI) (68) Behave-AD (69)
Capacités fonctionnelles de la vie quotidienne	Instrumental Activity of Daily Living (IADL) (70) Activities of Daily Living (ADL) (71)

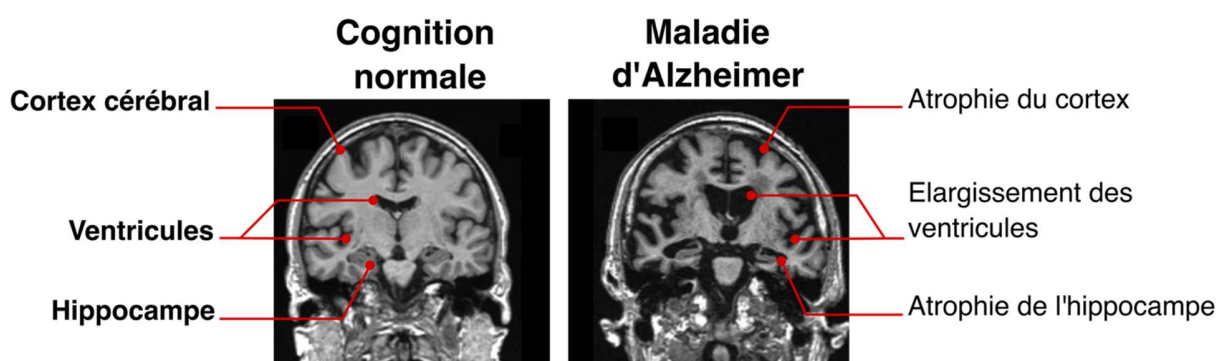
**Tableau 1** : Exemples d'outils d'évaluation cliniques utilisés pour identifier des troubles cognitifs.

Ces outils d'évaluation fournissent des détails sémiologiques qui orientent vers la MA ou un autre trouble cognitif.

#### 4.2. Ensuite, le diagnostic paraclinique

Si la MA est suspectée suite à l'examen clinique, des analyses sanguines sont dans un premier temps effectuées pour écarter d'autres pathologies provoquant des symptômes similaires, comme une affection thyroïdienne ou une carence en vitamine B12.

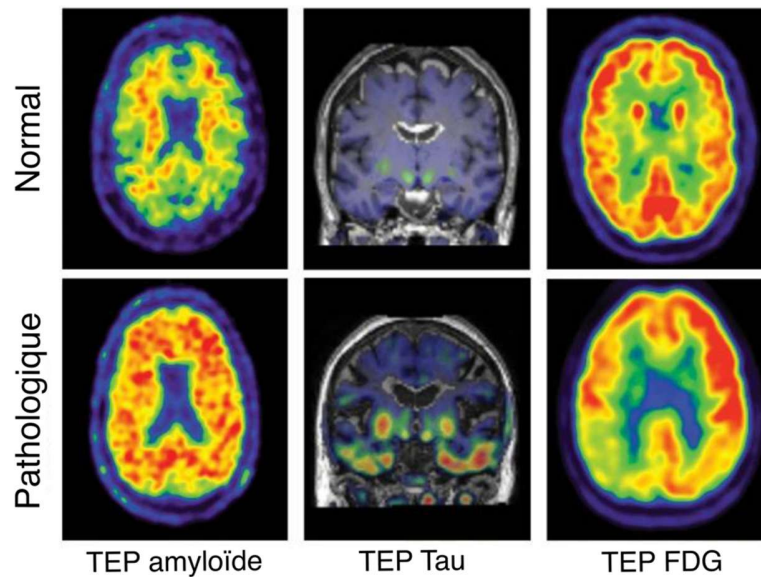
Dans un second temps, des techniques d'imagerie cérébrale peuvent être utilisées. La Haute Autorité de Santé recommande l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) en cas de trouble cognitif avéré. L'IRM permet de réaliser un diagnostic différentiel, notamment en identifiant des pathologies curables susceptibles de provoquer des troubles cognitifs, telles qu'une tumeur cérébrale ou une pathologie inflammatoire. Des signes de dégénérescence, tels qu'une atrophie corticale ou hippocampique, ou un élargissement des ventricules, sont ensuite recherchés (Figure 7).



**Figure 7** : IRM d'un un sujet âgé cognitivement normal et d'un sujet atteint de la MA, d'après Vemuri et al. 2010 (72).

Le diagnostic de la MA peut être posé sur la base de l'IRM, bien que le pourcentage d'erreur de diagnostic soit estimé à environ 10-20 %. Pour cette raison, des examens complémentaires peuvent être proposés. La tomographie par émission de positons (TEP) permet de visualiser l'activité cérébrale, et de mettre en évidence l'hypométabolisme temporo-pariétal et hippocampique caractéristique de la MA en utilisant la TEP au 18-fluorodésoxyglucose (TEP-<sup>18</sup>FDG) (Figure 8). Il existe également des ligands TEP spécifiques aux protéinopathies associées à la MA, qui permettent d'identifier la présence des pathologies amyloïdes et Tau *in vivo*. L'imagerie TEP amyloïde permet d'évaluer l'étendue et la localisation des dépôts amyloïdes (Figure 8). D'autres biotraceurs permettent de mettre en évidence la propagation spatiale de la pathologie Tau (73) (Figure 8).

Il est également possible de détecter ces biomarqueurs dans le LCR des patients par ponction lombaire. Les personnes atteintes de la MA présentent une diminution du taux d'A $\beta$  dans le LCR, en raison de la présence des plaques amyloïdes, ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de la protéine Tau, reflet de la formation des dégénérescences neurofibrillaires (74). Cette méthode, bien que précise, reste invasive et n'est donc pas utilisée en routine.



**Figure 8 :** Biomarqueurs d'imagerie TEP. Exemples de marqueurs d'imagerie par TEP normaux (en haut) et pathologique (en bas) chez trois sujets différents. Pour toutes les images, plus la couleur est chaude, plus le traceur se fixe. À gauche : TEP amyloïde avec le 18F-flutémétamol. Au milieu : TEP de la protéine Tau avec le 18F-flortaucipir (AV-1451). À droite : TEP-FDG ; d'après ten Kate et *al.* 2018 (75).

Les avancées technologiques récentes permettent désormais de mesurer ces biomarqueurs (A $\beta$  et Tau phosphorylée) dans le sang. Ces biomarqueurs plasmatiques sont connus pour être corrélés aux biomarqueurs du LCR et aux résultats issus de la TEP Tau et amyloïde. Cependant, les niveaux de ces biomarqueurs plasmatiques peuvent être influencés par des paramètres physiologiques et des comorbidités, notamment d'origine rénale (76–78). Il est donc essentiel de prendre en compte tous ces facteurs avant de pouvoir utiliser les marqueurs plasmatiques dans un contexte clinique. De plus, il est possible d'avoir des biomarqueurs positifs sans jamais développer la maladie. En effet, une étude a montré qu'à 80 ans, environ 30% des sujets cognitivement normaux sont positifs pour le marqueur amyloïde tout en étant en bonne santé (79). C'est pourquoi, en France, il est recommandé de ne pas doser ces biomarqueurs chez des sujets cognitivement normaux, car il n'est pas certain qu'ils développeront la pathologie.

Toutefois, les analyses de sang sont faciles à réaliser et font déjà partie intégrante des routines cliniques. Ainsi, le dosage de biomarqueurs sanguins pourrait, à l'avenir, intervenir dans les premières étapes du processus de diagnostic de la MA.

## **5. Quelles sont les options thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer ?**

À l'heure actuelle, il n'existe encore aucun traitement curatif permettant de guérir la MA. Les meilleures approches pour gérer la maladie semblent combiner des thérapies médicamenteuses et non médicamenteuses. Celles-ci visent à atténuer les symptômes afin d'améliorer la qualité de vie des patients et ralentir la progression de la maladie.

### **5.1. Quels sont les traitements symptomatiques disponibles ?**

#### **5.1.1. Les traitements médicamenteux**

Actuellement, quatre médicaments symptomatiques sont disponibles sur le marché. Comme leur nom l'indique, ces médicaments visent à traiter les symptômes de la maladie, ils ne parviennent pas à modifier son évolution.

- ⇒ Le Donépézil (Aricept®), la Galantamine (Reminyl®) et la Rivastigmine (Exelon®) sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase prescrits dans le traitement des formes légères à modérées. Ces médicaments empêchent la dégradation de l'acétylcholine, un neurotransmetteur essentiel aux processus d'apprentissage et de mémorisation, ce qui permet de réduire temporairement ou de stabiliser les symptômes comportementaux tels que l'agitation ou la dépression.
- ⇒ La Mémantine (Ebixa®), quant à elle, est un antagoniste des récepteurs glutamatergiques de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA) utilisé dans le traitement des formes modérées à sévères. Les récepteurs NMDA et le glutamate exercent un rôle déterminant pour les fonctions cognitives. Dans la MA, l'excès d'activité glutamatergique joue un rôle délétère en provoquant une excitotoxicité, un processus pathologique entraînant la mort neuronale. En bloquant les effets pathologiques de taux élevés de glutamate, la mémantine aurait un effet protecteur contre le dysfonctionnement neuronal.

Cependant, en raison de l'efficacité relative de ces médicaments et des effets indésirables importants (notamment des troubles digestifs, cardiovasculaires et neuropsychiatriques (80,81)), la Haute Autorité de Santé a décidé, depuis 2018, de ne plus rembourser ces médicaments.

### **5.1.2. Les traitements non médicamenteux**

La prise en charge non pharmacologique constitue une méthode alternative et multimodale pour améliorer la prise en charge des patients en ciblant différents aspects de la maladie. Elle permet, entre autres, de développer des stratégies compensatoires pour les symptômes des patients. Parmi ces approches non médicamenteuses, des thérapies de stimulation sensorielle telles que l'aromathérapie, la musicothérapie ou la luminothérapie ont montré des effets bénéfiques notamment l'amélioration du sommeil, la réduction des symptômes dépressifs, une baisse du niveau d'agitation (82). L'activité physique, par exemple, a démontré des améliorations en termes de fonction physique, comme l'activité motrice et l'autonomie, ainsi que des effets positifs sur certains symptômes neuropsychiatriques, tels que la dépression ou le taux de déclin fonctionnel (82). Bien que les preuves scientifiques concernant l'efficacité de ces approches soient limitées, les proches de patients et le personnel soignant s'accordent à reconnaître leurs effets bénéfiques.

### **5.2. Les traitements « *disease-modifiers* », porteurs d'espoir ?**

Contrairement aux thérapies symptomatiques, les thérapies « *disease-modifying* » ciblent les causes sous-jacentes de la maladie. Récemment, deux médicaments basés sur l'immunothérapie, le lecanemab (Leqembi®) et le donanemab (Kisunla®), ont été soumis à des essais cliniques de phase III (CLARITY AD et TRAILBLAZER-ALZ2 respectivement). Ce sont des anticorps monoclonaux qui visent à réduire la charge amyloïde chez les patients atteints de la MA à un stade précoce, en ciblant les plaques amyloïdes  $\beta$  à différents stades de leur formation dans le cerveau. Le lecanemab se lie avec une grande affinité aux protofibrilles  $A\beta$  solubles, qui sont démontrées être plus toxiques pour les neurones que les monomères ou les fibrilles insolubles (83–85). Le donanemab, quant à lui, vise à éliminer la formation et/ou bloquer l'agrégation du peptide pyroglutamate amyloïde- $\beta$  tronqué en position 3 (pGlu3- $A\beta$ ,  $A\beta$ pE3).

Lors des essais cliniques, ces deux médicaments ont montré une diminution de la charge amyloïde ainsi qu'un ralentissement du déclin cognitif de 27% et 35%, pour le lecanemab et le

donanemab respectivement, par rapport aux groupes sous placebo sur une période de 18 mois (86,87). Le lecanemab et le donanemab sont ainsi les premiers médicaments ciblant la pathologie amyloïde à démontrer un tel succès lors d'essais cliniques avancés.

Il convient toutefois de souligner que ces traitements peuvent entraîner des effets indésirables significatifs, notamment la formation d'œdèmes et d'hémorragies intra-cérébrales, nécessitant une surveillance étroite des patients traités, notamment par la réalisation fréquentes d'IRM (86,87). Cela soulève la question du rapport bénéfice/risque. En 2023, le lecanemab est devenu le premier médicament « *disease-modifying* » pour la MA à recevoir l'approbation de la *Food and Drug Administration* (FDA), suivi en 2024 par le donanemab, avec une recommandation de vigilance accrue concernant l'apparition des effets secondaires (86). Le lecanemab (Leqembi®) est désormais disponible aux États-Unis, au Royaume-Uni, en Chine, au Japon, en Corée du Sud et en Israël. En revanche, le 26 juillet 2024, l'Agence européenne du médicament (EMA) s'est prononcée contre la commercialisation sur le marché européen du Leqembi®, jugeant que la balance entre le bénéfice et les risques n'était pas favorable. En ce qui concerne le Kisunla®, il est actuellement disponible aux États-Unis et au Japon, tandis que sa demande d'autorisation pour le marché européen est toujours en cours d'évaluation par l'EMA.

## Deuxième partie : Étiologie de la maladie d'Alzheimer

La caractérisation des facteurs susceptibles de favoriser le développement de la MA a constitué, et constitue encore, un enjeu majeur. Ces facteurs peuvent être de nature génétique ou environnementale. La prédisposition à développer la MA dépendra ainsi de leurs interactions. Bien que toutes les formes de la MA partagent globalement les mêmes symptômes cliniques, l'âge d'apparition, la présence ou non d'antécédents familiaux, ou la vitesse de progression segmentent la MA en deux catégories : les formes dites monogéniques et les formes dites complexes.

### 6. Les formes monogéniques de la maladie d'Alzheimer

Certaines formes de la MA présentent une cause purement génétique, et se caractérisent par une transmission autosomique dominante. Ces formes monogéniques présentent certaines caractéristiques distinctives, notamment un âge d'apparition précoce, elles s'étendent approximativement de 30 ans à 65 ans, des antécédents familiaux positifs et une évolution plus agressive. Ces formes sont toutefois rares, représentant moins de 1% des cas de la MA (88). Actuellement, trois gènes ont été identifiés comme jouant un rôle majeur dans ces formes monogéniques. Le premier fut identifié en 1991 sur le chromosome 21, comme celui du précurseur de la protéine amyloïde, l'*APP* (89). Puis en 1995, les gènes des présénilines 1 et 2 (*PSEN1* et *PSEN2*, sous-unités catalytiques de la  $\gamma$ -sécrétase), furent identifiés sur les chromosomes 14 et 1 respectivement (90,91). Ces trois gènes codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme de l'APP. De ce fait, l'identification et la caractérisation de mutations au sein de ces gènes à l'origine des formes autosomiques dominantes ont placé la voie du métabolisme de l'APP au centre de l'attention.

## **6.1. La protéine précurseur de l'amyloïde ou APP**

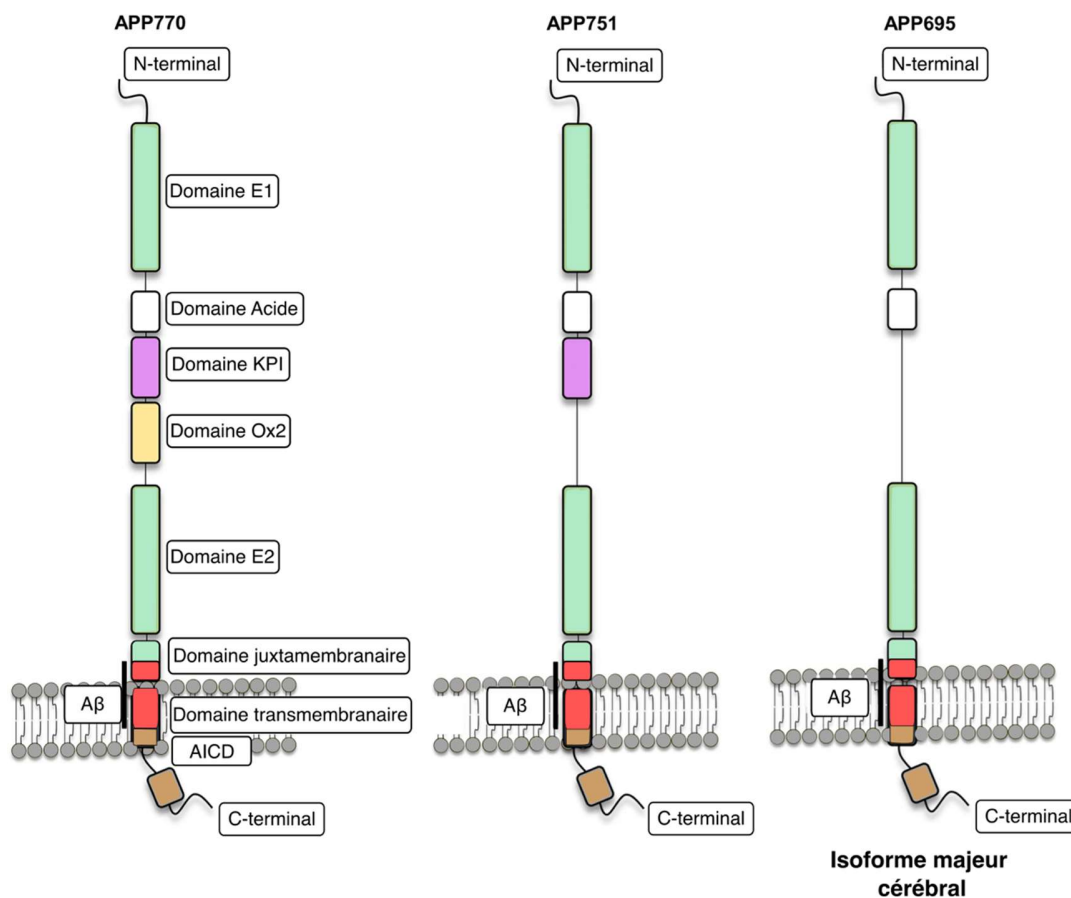
### **6.1.1. Structure de l'APP**

Le gène *APP* code pour la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), à l'origine des peptides A $\beta$ , composants des plaques amyloïdes mentionnées précédemment. Depuis de nombreuses années, le métabolisme de l'APP a été étudié afin de mieux comprendre la génération des peptides A $\beta$ .

L'APP est une protéine transmembranaire de type I exprimée de manière ubiquitaire. L'épissage alternatif de l'APP génère plusieurs isoformes, qui peuvent être métabolisées en divers produits peptidiques en plus de l'A $\beta$ , chacun ayant de multiples fonctions possibles (voir tableau 2). Les trois isoformes majeures, APP695, APP751 et APP770, sont produites par l'épissage alternatif des exons 7 et 8, qui codent respectivement un domaine d'inhibiteur de protéase de type Kunitz (KPI) et un domaine qui partage une identité de séquence avec l'antigène OX-2 (Figure 9). L'isoforme la plus longue, APP770, contient à la fois les domaines KPI et OX-2, tandis que l'APP751 ne contient que le domaine KPI. L'isoforme la plus courte, APP695, est dépourvue de ces deux domaines. Ces trois isoformes partagent une courte queue intracellulaire C-terminale, un domaine transmembranaire hydrophobe contenant la séquence du peptide A $\beta$ , et un long domaine extracellulaire N-terminal. La partie N-terminale contient un domaine E1 globulaire riche en cystéine, un sous-domaine acide, un domaine E2 riche en hélice et une région juxtamembranaire. Les domaines E1 et E2 contiennent des domaines de liaison à l'héparine, composants de la matrice extracellulaire (MEC). À l'extrémité C-terminale, les isoformes de l'APP possèdent le domaine intracellulaire de l'APP (AICD) qui contient un motif YENPTY, impliqué dans la régulation de leur transport et métabolisme via des interactions protéiques.

Dans le cerveau, l'APP695 est fortement exprimée, notamment dans les neurones, tandis que les isoformes APP751 et APP770 sont présentes à des niveaux bien plus faibles. Les isoformes contenant le domaine KPI, comme APP751 et APP770, sont davantage exprimées dans les cellules non neuronales (92).





**Figure 9** : Représentation schématique des trois isoformes majeurs de l'APP, adapté de Delport et al. 2022 (93)

### 6.1.2. Fonctions de l'APP

L'APP est principalement exprimée dans le cerveau, bien qu'elle soit présente dans la plupart des tissus (94). Malgré des efforts de recherche considérables pour comprendre la biologie de l'APP, ses fonctions physiologiques restent mal comprises, car l'accent a souvent été mis sur les effets pathologiques des peptides Aβ à l'origine des plaques amyloïdes. Contrairement à ce rôle bien établi dans la pathogenèse de la MA, des études de plus en plus nombreuses suggèrent que l'APP agit comme une molécule d'adhésion cellulaire dans le système nerveux central, régulant la synaptogenèse, la croissance des neurites, la migration et la signalisation cellulaire, tant pendant le développement cérébral que dans le cerveau mature et vieillissant (94). Une question importante est donc de savoir si la perte des fonctions physiologiques médiées par l'APP pourrait contribuer à la pathogenèse de la MA.

Néanmoins, les fonctions physiologiques de l'APP sont difficiles à étudier en raison de l'existence de nombreux fragments protéolytiques issus de sa dégradation, qui peuvent contribuer à des phénotypes distincts, et de la présence de protéines homologues, APLP1 et APLP2, qui peuvent avoir des fonctions redondantes. Cependant, malgré le fait que ses homologues peuvent compenser une partie de ses fonctions, l'APP semble clairement avoir une fonction physiologique qui lui est propre.

#### **6.1.2.1. Caractéristiques de l'APP en tant que molécule d'adhésion cellulaire**

##### ***Le domaine extracellulaire de l'APP***

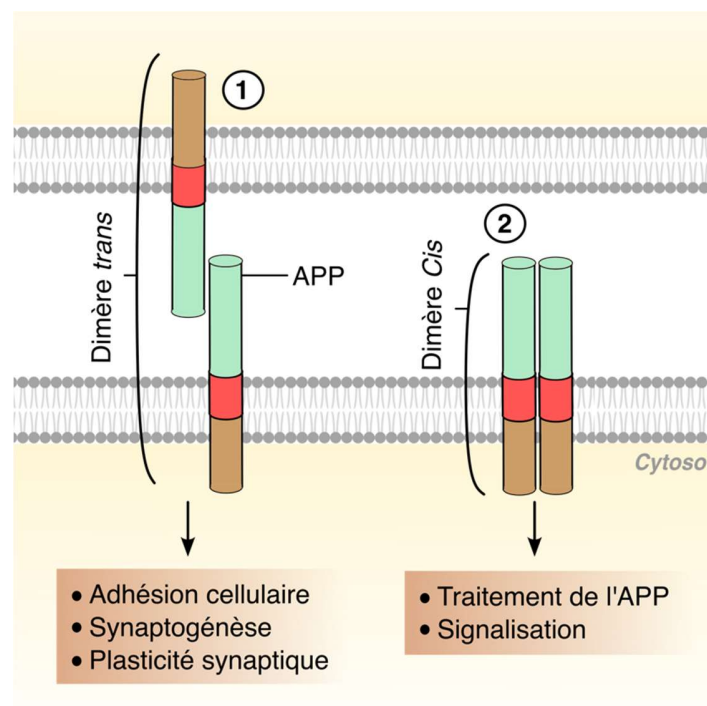
De nombreuses études ont mis en évidence la capacité de l'APP à interagir avec différentes protéines de la MEC via son domaine N-terminal. Ces interactions joueraient un rôle fondamental dans la formation et le maintien de l'architecture cérébrale au cours du développement et à l'âge adulte.

Par exemple, une interaction entre l'APP et la Réeline, une protéine extracellulaire impliquée dans la migration neuronale au cours du développement cortical, a été identifiée. Cette interaction est impliquée dans la croissance neuritique et l'arborisation dendritiques (95). De plus, la Réeline pourrait également moduler les niveaux de l'APP à la surface cellulaire et son traitement par la voie amyloïdogène en contrôlant son endocytose (95). Une autre interaction à avoir été mise en évidence au cours du développement neurologique, est celle entre l'APP et les protéoglycanes à base d'héparane sulfate (HSPG pour Heparan Sulfate ProteoGlycan), un autre composant de la MEC. La liaison de l'APP aux HSPG peut stimuler les effets de l'APP sur la croissance des neurites (96). De plus, l'interaction de l'APP avec la F-Spondine a été suggérée comme médiatrice de l'inhibition de l'adhésion cellulaire et favorisant l'interaction avec d'autres substrats (97).

Outre la capacité de l'APP à se lier à divers composants de la MEC, des études montrent que le domaine extracellulaire de l'APP pourrait également jouer un rôle dans la dimérisation de l'APP (98) (Figure 10). Tous les membres de la famille APP peuvent se dimériser de manière homo- et hétérotypique en orientation cis et trans (99). Cette dimérisation peut intervenir de manière intercellulaire, comme cela a été décrit pour différentes molécules d'adhésion cellulaire comme les cadhérines et les nectines (100). Le domaine E1 a été identifié comme l'interface d'interaction majeure pour l'homo- et l'hétérodimérisation de l'APP (99,101). La dimérisation intercellulaire de

l'APP est supposée médier l'adhésion cellulaire, l'activité synaptogène, ainsi que la stabilisation des synapses (101,102).

De plus, la dimérisation de l'APP à la surface des cellules ainsi que sa liaison aux composants de la MEC semblent être modulées par son traitement protéolytique. Il a été suggéré que la protéolyse de l'APP régule négativement ses fonctions physiologiques qui dépendent de la dimérisation (103).



**Figure 10** : La formation et les fonctions des dimères cis et trans de l'APP. La formation de dimères trans (1) et de dimères cis (2) peut se produire de manière homophile (par exemple, APP et APP) ou hétérophile (par exemple, APP et une protéine APP-like (APLP)), adapté de Müller et *al.* 2017 (104).

### ***Le domaine intracellulaire de l'APP***

L'APP, comme d'autres molécules d'adhésion, ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque et dépend de ses interactions avec d'autres protéines pour s'articuler avec le cytosquelette d'actine. La queue cytoplasmique de l'APP contient un motif d'acides aminés, YENPTY, reconnu par des protéines adaptatrices capables d'interagir avec le cytosquelette d'actine. Ce motif

YENPTY, également présent dans d'autres protéines d'adhésion comme l'intégrine  $\beta 1$ , peut lier des protéines adaptatrices dotées de domaines PTB (liaison à la phosphotyrosine), qui jouent un rôle clé dans l'adhésion, la migration cellulaire et la synaptogenèse (104,105).

Parmi ces partenaires, il a été démontré que l'APP interagit avec la protéine Fe65 au niveau du cône de croissance, la région la plus mobile des neurones. Cette interaction est capable de moduler la motilité du cône de croissance (106). De plus, Fe65, en formant un complexe avec l'APP, régule le trafic et le clivage protéolytique de l'APP (107,108).

Le motif YENPTY de l'APP lie également les protéines de la famille Mint/X11, impliquées dans la synaptogénèse et l'exocytose des vésicules. Cette interaction pourrait jouer un rôle dans la mise en place du compartiment pré-synaptique (102,109). Mint/X11 régulent également le trafic et le traitement de l'APP (110,111).

À ce jour, plus de 200 partenaires extracellulaires et intracellulaires de l'APP ont été identifiés (104), dont beaucoup influencent des processus neuroattractifs ou neurorépulsifs affectant les processus cellulaires tels que la migration des neurones et la croissance des neurites.

#### **6.1.2.2. Les rôles de l'APP sur la croissance des neurites, la synaptogénèse et la plasticité synaptique**

L'APP est abondante dans les cônes de croissance et les boutons synaptiques (106,112), et elle joue un rôle clé dans la migration cellulaire et la croissance des neurites (95,113–115). Une étude a montré que l'APP régule la croissance axonale et la taille du cône de croissance. Dans les neurones APP<sup>-/-</sup>, le nombre de filopodes dans le cône de croissance diminue, tandis qu'il augmente dans les neurones surexprimant l'APP. De plus, le niveau d'expression de l'APP influence l'adhésion du cône de croissance (116). Un des mécanismes possibles par lesquels l'APP favorise la croissance des neurites est la régulation de l'adhésion cellule-substrat. L'APP se lie à la laminine, au collagène et à l'héparane sulfate (117–119), tous capable d'influencer la croissance des neurites.

L'APP pourrait également jouer un rôle dans la régulation de la synaptogenèse. Au cours du développement, l'expression de l'APP augmente considérablement au cours de la synaptogenèse (102,120,121). De plus, l'APP est présente dans les membranes pré- et post-synaptiques, et sa

capacité à se trans-dimériser est cruciale pour la synaptogenèse dans le système nerveux central et périphérique. Cette dimérisation semble également essentielle pour la dynamique structurale et fonctionnelle de la synapse. Une partie de la fonction synaptogène de l'APP est assurée par son domaine YENPTY (99,101,102,122).

De plus, l'expression de l'APP est rapidement régulée à la hausse dans les axones en réponse à une lésion, probablement dans le cadre d'un mécanisme de réparation (123). Des études suggèrent également que l'APP exerce une action neuroprotectrice en participant à la réparation des tissus après une lésion cérébrale traumatique (124–126).

Les souris APP-KO présentent des déficits associés à une altération de la fonction synaptique, tels que des modifications de la ramification dendritique et de la densité synaptique, ainsi que des altérations comportementales et une perturbation de la potentialisation à long terme (LTP) (127–134). De plus, des souris transgéniques exprimant une forme tronquée de l'APP au niveau C-terminal, incluant le motif d'interaction protéique YENPTY, montrent des déficits dans l'induction et le maintien de la LTP, associés à des troubles de l'apprentissage et de la mémoire spatiale. Ces observations suggèrent que le domaine intracellulaire de l'APP, via le motif YENPTY, est nécessaire pour ces processus en se liant à d'autres partenaires (135).

L'APP possède donc des caractéristiques similaires à celles des molécules d'adhésions, tant au niveau de ses domaines extracellulaire que cytoplasmique. Le domaine extracellulaire peut s'autodimériser et interagir avec de multiples protéines de la MEC, tandis que son domaine cytoplasmique se lie à des protéines d'échafaudage associées au cytosquelette. Ces propriétés suggèrent que l'APP pourrait agir comme une molécule d'adhésion, reliant l'environnement extracellulaire au cytosquelette par l'intermédiaire de protéines d'échafaudage, de manière similaire à d'autres protéines d'adhésion telle que les intégrines.

### **6.1.3. Le métabolisme de l'APP**

Concernant sa maturation physiologique, l'APP est d'abord synthétisée dans le réticulum endoplasmique, puis transite par l'appareil de Golgi où elle peut subir différentes modifications post-traductionnelles, telles que la N- et O-glycosylation, la phosphorylation, la sulfatation, la

sialylation ou l'acétylation (136). Une fois mature, l'APP est transloquée du réseau transgolgien vers la surface cellulaire. L'APP peut ensuite être internalisée dans la voie endosomale pour être recyclée à la membrane plasmique ou acheminée vers la voie endolysosomale pour une dégradation protéolytique (137,138).

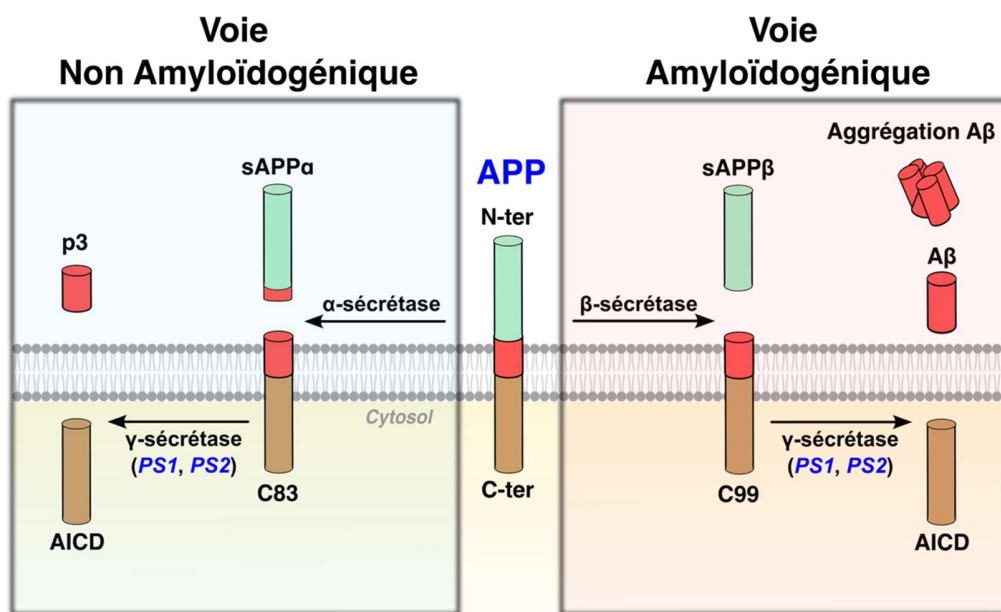
L'APP peut ainsi suivre plusieurs voies métaboliques faisant intervenir différentes activités enzymatiques, et de nombreuses études indiquent que la MA est susceptible de résulter d'un trafic cellulaire défectueux dans les voies sécrétoires et endocytiques (139). Il existe deux principales voies protéolytiques canoniques : la voie amyloïdogène, qui mène à la production de peptides A $\beta$ , et la voie non amyloïdogène. D'autres voies non canoniques, identifiées plus récemment, participent également à la génération de ces peptides A $\beta$ .

#### **6.1.3.1. La voie non-amyloïdogène**

Dans la voie non-amyloïdogène, l'APP est d'abord clivée à la surface de la cellule par l' $\alpha$ -sécrétase. Il existe plusieurs  $\alpha$ -sécrétases, notamment les membres de la famille ADAM (*ADAM* = *Disintegrin And Metalloprotease*), telles que ADAM9, ADAM10 et ADAM17, et elles peuvent être impliquées dans deux voies sécrétoires distinctes : l'une constitutive et l'autre régulée. ADAM9 et ADAM17 sont essentiellement responsables de la voie sécrétoire régulée, sous le contrôle notamment de la protéine kinase C (PKC) et de la MAP kinase (140). ADAM10 quant à elle contribue à la voie constitutive.

Le clivage de l'APP695 par l' $\alpha$ -sécrétase a lieu entre les résidus 612 et 613, au milieu de la séquence A $\beta$ , ce qui entraîne la libération d'un fragment N-terminal soluble sAPP $\alpha$  et d'un fragment C-terminal contenant 83 acides aminés (CTF $\alpha$  ou C83) (141) (Figure 11). Le C83 peut être internalisé puis traité par la  $\gamma$ -sécrétase dans les endosomes pour générer le fragment AICD et le fragment p3 (3 kDa) (142).

La voie non-amyloïdogène constitue le mécanisme de clivage physiologique prédominant de l'APP et représente environ 90% de sa protéolyse (143).



**Figure 11** : Illustration des voies canoniques de clivage de l'APP. En bleu, gènes dans lesquels ont été identifiés des mutations associées aux formes autosomiques dominantes de la MA.

### 6.1.3.2. La voie amyloïdogène

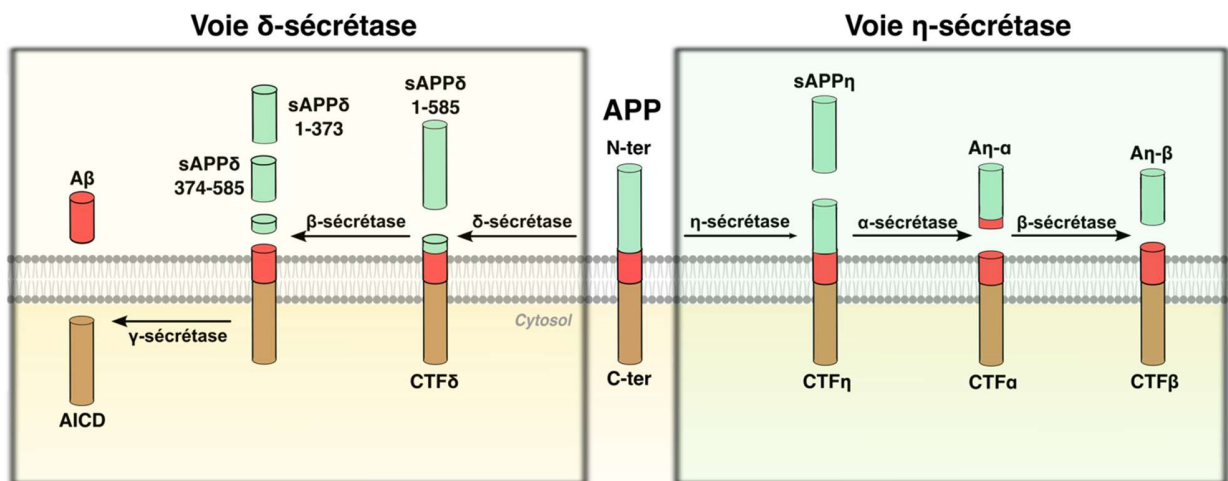
Dans 10% des cas, l'APP suit la voie amyloïdogène, qui débute par l'internalisation endosomale de l'APP (143). La β-sécrétase (BACE1 ou mémapsine 2) située à la membrane endosomale clive l'APP entre les résidus 596 et 597, libérant un fragment N-terminal soluble sAPPβ et un fragment C-terminal ancré dans la membrane (CTFβ ou C99) (Figure 11). Le C99 est ensuite clivé par la γ-sécrétase pour générer un fragment AICD et des monomères d'Aβ (144).

Le clivage de l'APP par la γ-sécrétase génère une variété de peptides, Aβ43, Aβ42, Aβ40, Aβ38 et Aβ37, la numérotation indiquant le nombre d'acides aminés composant le peptide. L'Aβ<sub>1-40</sub> est le peptide le plus abondant, représentant près de 90% du total de peptides amyloïdes produit, contre environ 10% pour l'Aβ<sub>1-42</sub> (145). Ces peptides, initialement distribués sous forme de monomères, peuvent s'agréger en différents types d'assemblage dont les oligomères, protofibrilles et fibrilles. Les fibrilles, plus grandes et insolubles, peuvent s'assembler en plaques amyloïdes, tandis que les oligomères, solubles, peuvent se répandre dans le cerveau (146). À noter que l'Aβ est un mélange hétérogène aux solubilités, stabilités et des propriétés biologiques différentes. Le peptide Aβ<sub>1-42</sub> possède notamment deux acides aminés hydrophobes supplémentaires au niveau C-terminal, ce qui lui confère une plus grande propension à s'agréger

et à former des fibrilles (147). C'est l'agrégation de ces fibrilles qui mène à la formation des plaques amyloïdes observées dans la MA (148). De plus, des études ont montré que l'isoforme  $A\beta_{1-42}$  est plus abondant dans les plaques amyloïdes des cerveaux de patients atteints de la MA que les autres formes d' $A\beta$  (149,150).

### 6.1.3.3. Autres voies de clivage de l'APP

En plus des sécrétases des voies canoniques, des études ont identifiés d'autres protéases qui contribuent à la génération de peptides  $A\beta$ .



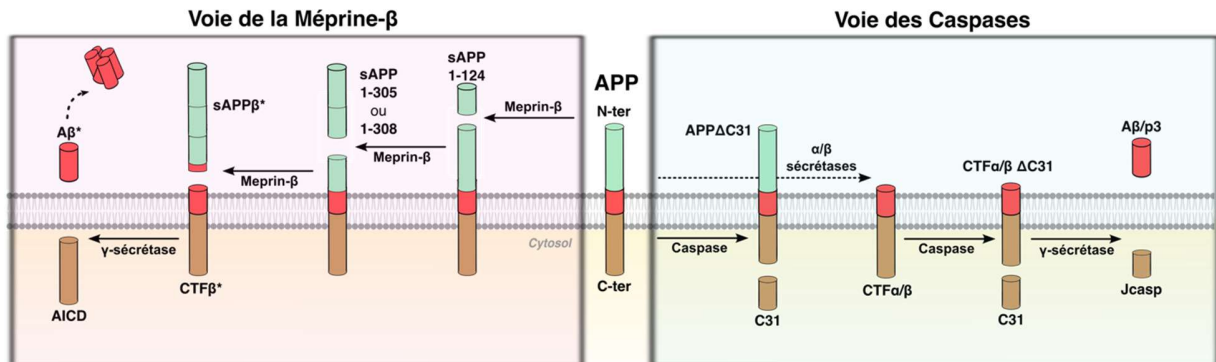
**Figure 12** : Illustration des clivages de l'APP par les  $\eta$ - et  $\delta$ - sécrétases.

La  $\delta$ -sécrétase, aussi connue sous d'asparagine endopeptidase (AEP), est une cystéine protéase qui est activée au cours du vieillissement. Elle clive le domaine extracellulaire de l'APP695 au niveau des résidus asparagines 373 et 585, ce qui semble renforcer le traitement ultérieur de l'APP par la  $\beta$ -sécrétase (151) (Figure 12). Ce clivage conduit notamment à l'augmentation de la production d' $A\beta$  et facilite la formation des plaques amyloïdes.

L' $\eta$ -sécrétase, caractérisée par l'action de la métalloprotéase matricielle MT5-MMP, a été identifiée comme une autre enzyme capable de cliver de l'APP (Figure 12). Le clivage de l' $\eta$ -sécrétase au niveau des acides aminés 504-505 de l'APP695 génère le fragment transmembranaire,  $\eta$ CTF, qui subit des clivages ultérieurs par les  $\alpha$ - et  $\beta$ -sécrétases produisant les peptides  $A\eta\alpha$  et  $A\eta\beta$ , respectivement (152,153). Une étude récente a également montré que



le fragment  $\eta$ CTF peut subir un clivage médié par la  $\gamma$ -sécrétase, conduisant à la production de peptides A $\beta$  (154).



**Figure 13** : Illustration des clivages de l'APP par la méprine  $\beta$  et les caspases. A $\beta^*$  désigne la version raccourcie au niveau amino-terminal de l'A $\beta_{2-x}$ .

La méprine  $\beta$ , également connue sous le nom de  $\beta$ -sécrétase alternative, est une métalloprotéase zinc-dépendante qui intervient également dans le traitement de l'APP (Figure 13). Elle clive l'APP sur plusieurs sites dans l'ectodomaine N-terminal et autour du site de la  $\beta$ -sécrétase, ce qui génère des fragments N-terminaux sAPP1-124, sAPP1-305 ou sAPP1-308, sAPP $\beta^*$  (possède un résidu supplémentaire par rapport au fragment sAPP $\beta$ ) et un fragment CTF- $\beta^*$  (plus court d'un résidu d'acide aminé que le fragment CTF- $\beta$ ) (155). Contrairement à la  $\beta$ -sécrétase, la méprine  $\beta$  clive l'APP à la membrane plasmique et le clivage ultérieur par la  $\gamma$ -sécrétase génère des peptides A $\beta$  tronqués au niveau amino-terminal, A $\beta_{2-x}$  et A $\beta_{3-x}$ . L'expression de la méprine  $\beta$  semble augmentée dans les cerveaux de patients de la MA. De plus, l'inhibition de la méprine  $\beta$  diminue les dépôts d'A $\beta$  dans le cerveau et améliore l'apprentissage et la mémoire dans un modèle de souris de la MA (156).

Au cours de l'apoptose, les caspases (principalement la caspase-3) peuvent directement cliver le domaine intracellulaire de l'APP695, après le résidu asparagine en position 664 (Figure 13). Ce clivage libère un fragment contenant les 31 derniers acides aminés de l'APP, appelé C31 (157). Un clivage ultérieur par la  $\gamma$ -sécrétase génère le fragment Jcasp (158).

La littérature consacrée à la MA s'est historiquement concentrée sur l'espèce A $\beta$ . Toutefois, en plus de l'A $\beta$ , la complexité des interactions entre l'APP et les protéases impliquées dans son clivage donne lieu à des dérivés multifonctionnels de l'APP (résumé dans le Tableau 2).

Fragments de l'APP	Fonctions connues
sAPP $\alpha$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neurotrophique, Neuroprotecteur (104,159,160)</li> <li>• Mémoire, Plasticité neuronale (104,161)</li> <li>• Inhibiteur de BACE-1 (162,163)</li> <li>• Modulateur de la transmission GABAergique (161,164)</li> </ul>
C83/ CTF $\alpha$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulateur du clivage de l'APP par la <math>\gamma</math>-sécrétase (165,166)</li> </ul>
p3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fonction physiologique inconnue (167)</li> </ul>
AICD	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Régulateur transcriptionnel, modulateur de la mortalité cellulaire et de l'homéostasie Ca<sup>2+</sup>, stabilisation des microtubules, régulateur de la plasticité synaptique (168)</li> </ul>
sAPP $\beta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modulateur de la transmission GABAergique (161)</li> </ul>
C99/ CTF $\beta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toxicité cellulaire, Altération de la plasticité synaptique, troubles du comportement (169,170)</li> </ul>
A $\beta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Libération et transmission des vésicules synaptiques (171–173)</li> <li>• Neurogénèse, croissance des neurites, prolifération cellulaire (173,174)</li> <li>• Anti-microbien (175,176)</li> <li>• Toxicité, dysfonction mitochondriale, stress oxydatif, inhibition de la (LTP) (171,177–179)</li> </ul>
C31	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neurotoxique (157)</li> <li>• Altération de la plasticité synaptique (180)</li> </ul>
JCasp	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibiteur de l'APP et de la libération de vésicules synaptiques excitatrices (181).</li> <li>• Apoptose neuronale (182)</li> </ul>
A $\beta_{2-x}$ et A $\beta_{3-x}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Potentiel d'agrégation supérieur à l'A<math>\beta_{1-40}</math> (183)</li> <li>• Induit l'agrégation des peptides A<math>\beta_{1-40}</math> (183)</li> </ul>
A $\eta\alpha$ et A $\eta\beta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypoactivité neuronale, altération de la LTP (153,184)</li> </ul>
$\eta$ CTF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Accumulation dans les neurites dystrophiques autour des plaques amyloïdes (153,154)</li> <li>• Production d'A<math>\beta</math> (154)</li> </ul>
sAPP $\eta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimule la production d'A<math>\beta</math> (152,153)</li> </ul>

**Tableau 2 :** Récapitulatif des fonctions identifiées des fragments d'APP générés par les voies de clivage conventionnelles et non conventionnelles.

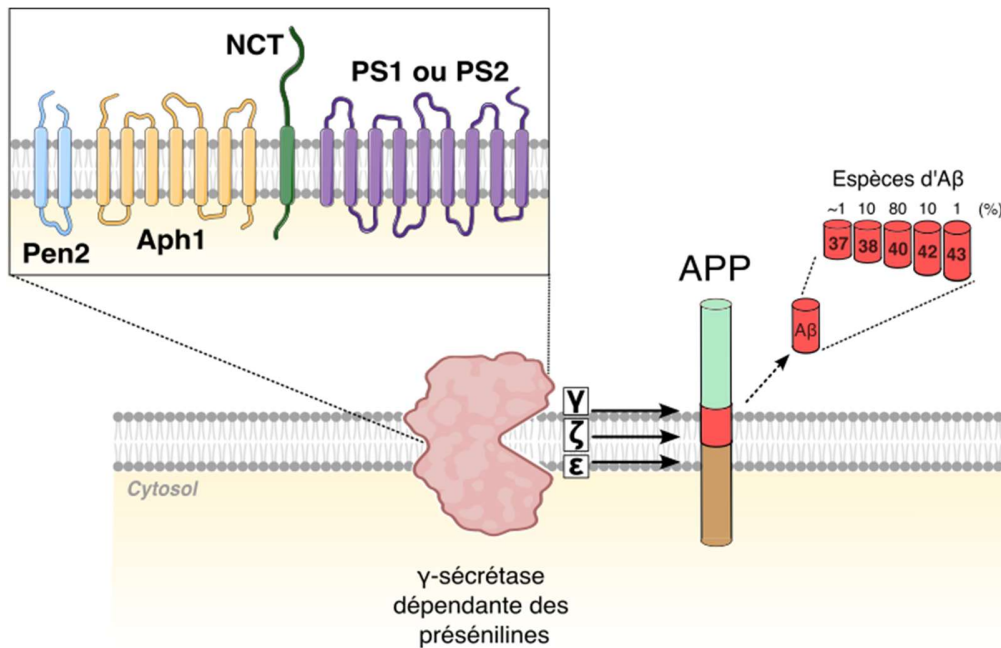
## 6.2. Le complexe de la $\gamma$ -sécrétase dépendant des Présénilines

Chez l'Homme, il existe deux gènes homologues, *PSEN1* et *PSEN2*. Les protéines codées Présénilines 1 et 2 ont des profils d'expression distincts dans les tissus humains (91). Alors que la préséniline 1 est transcrite uniformément dans tout le cerveau et les tissus périphériques, la préséniline 2 est exprimée à des niveaux relativement faibles dans le cerveau, mais est fortement exprimée dans certains tissus périphériques tels que le pancréas, les muscles squelettiques ou le cœur (185).

Les Présénilines 1 et 2 sont des protéines composées de neuf domaines transmembranaires. Elles constituent le cœur catalytique de la  $\gamma$ -sécrétase, une aspartyl-protéase intramembranaire composée de quatre protéines essentielles : les Présénilines 1 et 2, la Nicastrine (NCT), la protéine APH1 (pour Anterio-Pharynx Defective-1) et PEN2 (pour Presenilin-Enhancer-2) (138) (Figure 14). Bien que les Présénilines portent l'activité enzymatique, la  $\gamma$ -sécrétase doit être composée de ces quatre protéines transmembranaires pour être catalytiquement active. Les protéines PEN2, APH1 et Nicastrine étant nécessaire à la maturation et à la stabilité de l'ensemble du complexe (186).

L'assemblage du complexe de la  $\gamma$ -sécrétase est initié dans le RE, où Aph1 et la Nicastrine interagissent, suivi par la liaison des Présénilines. Puis PEN2 se lie au complexe et facilite l'endoprotéolyse des Présénilines, ce qui mène à la formation du complexe de la  $\gamma$ -sécrétase (187).

Par rapport à la  $\beta$ -sécrétase, la  $\gamma$ -sécrétase n'est pas strictement spécifique à un site et peut cliver de manière séquentielle l'APP sur trois sites différents ( $\gamma$ ,  $\epsilon$  et  $\zeta$ ) (Figure 14). Ces clivages génèrent des peptides A $\beta$  de différentes longueurs. En plus de l'A $\beta$ 40 et l'A $\beta$ 42 issus du clivage au site  $\gamma$ , le clivage au site  $\zeta$  produit des peptides A $\beta$  de 45 et 46 acides aminés, tandis que le clivage au site  $\epsilon$  conduit à la production d'A $\beta$  de 48 et 49 acides aminés. Puis la  $\gamma$ -sécrétase peut réaliser un clivage carboxyterminal des parties d'A $\beta$  restantes liées à la membrane, pour générer les peptides A $\beta$ 43, A $\beta$ 42, A $\beta$ 40 jusqu'aux espèces plus courtes d'A $\beta$ 38 et A $\beta$ 37 (188). L'A $\beta$ 40 est généré comme produit principal avec des quantités mineures de l'A $\beta$ 38 et de l'A $\beta$ 42. Les peptides A $\beta$ 37 et d'A $\beta$ 43 sont quant à eux générés en de très faibles quantités (189).



**Figure 14** : Illustration des composants du complexe de la  $\gamma$ -sécrétase dépendant des présénilines et du traitement de l'APP par la  $\gamma$ -sécrétase.

### 6.3. Trois gènes et une hypothèse physiopathologique

#### 6.3.1. Découvertes de mutations dans le gène *APP*

La découverte d'une transmission autosomique dominante de la MA a été un évènement marquant dans la recherche sur cette maladie. L'une des premières mutations identifiées concernait le gène codant pour l'APP, la protéine à partir de laquelle le peptide A $\beta$  est produit après un clivage séquentiel par la  $\beta$ - puis la  $\gamma$ -sécrétase (Figure 11) (89). Cette mutation, appelée « *London* » (V717I), entraîne une augmentation de l'A $\beta$ 42 (190,191).

À ce jour, plus de 270 mutations génétiques liées à la MA ont été identifiées, dont au moins 53 mutations constitutives de l'APP, entraînant un traitement enzymatique différentiel (<https://www.alzforum.org/mutations>). Certaines de ces mutations sont associées à la neuropathologie des formes familiales héréditaires de la MA. Par exemple, la mutation *Arctic* (E693G) augmente la propension de l'A $\beta$  à former des protofibrilles (192), tandis que la mutation *Uppsala* (APP  $\Delta$ 690-695) inhibe le traitement non amyloïdogène de l'APP et favorise la production de peptides A $\beta$  rapidement agrégatifs (193). Une duplication du gène de l'APP a également été

décrite comme responsable de certaines formes autosomiques dominantes (194). La majorité des mutations du gène *APP* à l'origine des formes familiales de la MA se trouvent à proximité des sites de coupures des  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases conditionnant le métabolisme de l'APP et la production de peptides A $\beta$ . Elles entraînent notamment une augmentation de la sécrétion d'A $\beta$ 42 ou un ratio plus élevé de l'isoforme A $\beta$ 42 par rapport à l'A $\beta$ 40. Néanmoins, toutes les mutations de l'*APP* ne sont pas pathogènes. Par exemple, la mutation *Icelandic* (A673T) semble protectrice, conférant une résistance à l'APP face au clivage par la  $\beta$ -sécrétase, ce qui réduit la production de l'A $\beta$ 40 et l'A $\beta$ 42 d'environ 40 % dans la lignée HEK293T (195).

### **6.3.2. Fondements et Arguments en Faveur de l'hypothèse de la cascade amyloïde.**

Le fait que les mutations pathogènes soit systématiquement associées à une modification du métabolisme de l'APP, en particulier à une production préférentielle de l'A $\beta$ 42, qui en s'agréant forme les plaques amyloïdes, a placé ce métabolisme au centre du processus pathologique. Cela a conduit à l'émergence de l'hypothèse de la cascade amyloïde (196). Cette hypothèse postule que l'accumulation cérébrale d'A $\beta$  pour former des plaques amyloïdes est le principal moteur de la pathogenèse de la MA, et que d'autres processus pathologiques tels que la formation de DNF et l'inflammation, résultent du déséquilibre entre la production et l'élimination de l'A $\beta$ . Le fait que les plaques amyloïdes soient retrouvées dans les cerveaux des patients avant l'apparition des symptômes cliniques renforce également l'idée que l'accumulation d'A $\beta$  précède les autres altérations (36).

Cette hypothèse a été renforcée par la découverte que la MA pouvait également être causée par des mutations autosomiques dominantes des gènes codant pour les présénilines 1 et 2 (*PSEN1* et *PSEN2*). Les mutations retrouvées dans *PSEN1* et *PSEN2* perturbent l'activité protéolytique de la  $\gamma$ -sécrétase et favorisent la production de peptides A $\beta$ 42, plus toxiques que les peptides A $\beta$ 40. À ce jour, près de 80 mutations de *PSEN2* ont été répertoriées, bien qu'elles soient décrites comme des causes peu fréquentes des formes familiales de la MA. Pour *PSEN1* en revanche, plus de 300 mutations ont été rapportées et expliquent la majorité des formes autosomiques dominantes de la MA (<https://www.alzforum.org/mutations>). Les faibles niveaux de la préséniline 2 dans le cerveau peuvent expliquer pourquoi les mutations de *PSEN2* ont une pénétration incomplète par rapport aux mutations de *PSEN1*.

Autre élément venant étayer l'hypothèse pathologique, le gène *APP* se situe sur le chromosome 21 et il a été montré que les individus atteints du syndrome de Down, en raison d'une trisomie sur le chromosome 21, présentent des similitudes neuropathologiques avec les patients atteints de la MA, et ont une prévalence plus élevée de la maladie par rapport à la population générale (197).

### 6.3.3. Critiques de l'hypothèse de la cascade amyloïde

Bien que de nombreuses preuves soutiennent l'hypothèse de la cascade amyloïde, elle présente aussi des limites notables. Cette hypothèse repose principalement sur l'étude de formes précoces et rares de la pathologie. Or, l'ensemble de ces mutations n'est retrouvé que dans un faible pourcentage des cas de MA, ce qui remet en question la validité de cette hypothèse pour l'ensemble des patients. De plus, les plaques amyloïdes ne semblent pas être suffisantes à elles seules pour provoquer une démence clinique. Il a en effet été rapporté que des individus en bonne santé peuvent présenter des dépôts amyloïdes sans pour autant développer la MA (198).

La plupart des modèles animaux de la MA, qui présentent des niveaux d'A $\beta$  plus élevés que les témoins, n'affichent pas de perte neuronale ou de troubles cognitifs significatifs, malgré la présence importante de dépôts d'amyloïde (199). Par exemple, les souris exprimant une mutation de l'*APP* (mutation *Swedish*, KM594/595NL) associée à des formes monogéniques de la maladie ne montrent pas de déficit cognitif, ce qui serait attendu dans un modèle fidèle de la MA.

En outre, le lien entre la pathologie amyloïde et la pathologie Tau, l'autre caractéristique neuropathologique de la MA, n'est toujours pas clairement établi. Certains modèles de souris transgéniques surexprimant l'*APP* humain muté, parfois en combinaison avec une mutation du gène de la préséniline 1, ne développent pas ou très peu de DNF, même à un âge avancé (200,201). De plus, contrairement aux marqueurs de la maladie comme les DNF, la perte synaptique ou l'activation microgliale, les plaques amyloïdes ne sont pas corrélées au déclin cognitif chez les patients (24).

Ces observations remettent en cause la linéarité de l'hypothèse de la cascade amyloïde, car elle ne découle finalement que de mutations sur les gènes *APP* et *PSEN1/2*. Or, dans la majorité des cas, la MA n'est pas due à des mutations héréditaires, mais est plutôt influencée par des facteurs de risques génétiques et environnementaux.

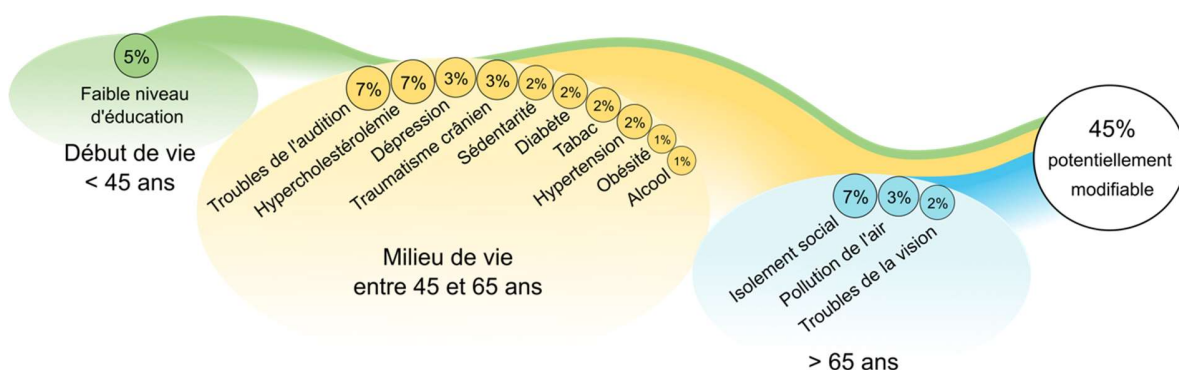
## 7. La complexité de la maladie d'Alzheimer : au-delà des formes monogéniques ?

Dans environ 99% des cas, les formes de la MA sont complexes et leur distribution dans les familles ne peut être expliquée par un modèle monogénique. Ainsi dans la majorité des cas, la MA est une pathologie multifactorielle qui résulte de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux, et peut être classifiée en deux groupes, les formes jeunes et les formes tardives, selon que la maladie débute avant ou après 65 ans. Les formes tardives représentant plus de 95% des cas (1).

### 7.1. Les facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer

#### 7.1.1. Les facteurs de risque modifiables

En ce qui concerne la composante environnementale, on peut distinguer les facteurs de risque modifiables et non modifiables. Des études ont estimé que 14 facteurs de risque modifiables pourraient expliquer environ 45 % des cas de démence dans le monde, ainsi près de la moitié des démences pourraient théoriquement être évitées ou retardées (Figure 15). Parmi ces facteurs de risque modifiables, on retrouve : un faible niveau d'éducation, l'hypertension, les troubles auditifs, le tabagisme, l'obésité, la dépression, l'inactivité physique, le diabète, l'isolement social, la consommation excessive d'alcool, les traumatismes crâniens, la pollution atmosphérique, les troubles de la vision et l'hypercholestérolémie (202).



**Figure 15** : Fraction attribuable à la population des facteurs de risque de MA potentiellement modifiables, adapté de Livingston et al. 2024 (202).

### **7.1.2. Les facteurs de risque non modifiables**

Des facteurs de risque non modifiables influent également sur le risque de démence. L'âge représente le premier facteur de risque pour la MA, suivi du sexe. Les femmes sont en effet plus susceptibles de développer la MA que les hommes, probablement en raison de différences hormonales (203). La génétique constitue un autre facteur de risque non modifiable de la MA. Bien que l'importance de la composante génétique dans ces formes complexes ait longtemps fait l'objet de débats, il est désormais clair qu'elles impliquent une forte prédisposition génétique, contribuant à 58-79 % du risque (204). Cela fait de la MA la maladie multifactorielle avec l'un des niveaux d'héritabilité les plus élevés devant le diabète (~40 %) et la maladie de Parkinson (~30 %) (205). Plus généralement, avoir des antécédents familiaux de MA constitue également un facteur de risque de la maladie. Les apparentés au premier degré de personnes atteintes de la MA ont un risque accru de développer la maladie par rapport à ceux qui partagent uniquement le même environnement (206).

En outre, la composante génétique de ces formes est complexe et hétérogène : elle est complexe car il n'existe pas de modèle simple expliquant le mode de transmission de la maladie, et hétérogène car elle pourrait interagir avec des facteurs non génétiques. Ainsi même pour ces formes complexes, identifier des déterminants génétiques est rapidement devenu un enjeu majeur et permettrait de tester l'hypothèse de la cascade amyloïde pour l'ensemble des cas de MA.

### **7.2. Quelles approches permettent l'identification de facteurs de risque génétique pour la maladie d'Alzheimer ?**

Les approches qui visent à identifier les gènes de susceptibilité impliqués dans des maladies multifactorielles, comme la MA, reposent sur l'étude des variants génétiques au sein de deux populations : les patients et les témoins.

#### **7.2.1. Qu'est-ce qu'un variant génétique ?**

Le génome de deux individus pris au hasard partage en moyenne 99,9% d'identité de séquence. Les 0,1% restants contiennent des variants qui assurent la diversité phénotypique des individus et influencent leur susceptibilité à développer ou non une pathologie. Un variant génétique se caractérise par une modification de la séquence d'ADN, définie comme la présence de plusieurs allèles à un même locus, avec une fréquence d'au moins 1% dans la population.



Différents types de variants ont été caractérisés, notamment :

- Les polymorphismes ponctuels (SNP) : les SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) sont des substitutions simples de nucléotides. La plupart de ces SNP sont bi-alléliques et représentent environ 90% de l'ensemble des variations génétiques humaines (207).
- Les indels : ils consistent en une insertion ou une suppression d'une ou plusieurs bases d'ADN. Ils constituent la deuxième catégorie de mutation la plus fréquente dans le génome humain, après les SNPs (208).
- Les polymorphismes de répétition : ce sont des séquences de nucléotides répétées en tandem tels que les microsatellites résultant de la répétition de courtes séquences de 2 à 4 nucléotides.

Dans la majorité des cas, les variants ne sont pas fonctionnels et n'altèrent ni la structure ni la fonction des protéines. Toutefois, ces variants peuvent être utilisés comme marqueurs génétiques dans des études visant à identifier de nouveaux gènes impliqués dans les maladies multifactorielles.

### **7.2.2. Les études d'association par approche gène-candidat**

La recherche de déterminants génétiques pour les formes complexes de la MA a initialement reposée sur les études d'association basées sur l'approche « gène candidat ». Ces études consistent à explorer un gène sélectionné *a priori* pour son implication potentielle dans la maladie. Les fréquences alléliques des variants situés sur ce gène sont comparées entre des patients et des individus témoins pour déterminer leur association ou non avec la pathologie. Les SNP sont les marqueurs génétiques les plus utilisés dans ces études. Si la distribution de ces polymorphismes est significativement différente entre les cas et les témoins, la variation génétique étudiée est associée à une modulation du risque de développer la maladie. La force de cette association est estimée par le calcul de l'Odds Ratio (OR), qui indique une diminution ( $OR < 1$ ) ou une augmentation ( $OR > 1$ ) du risque de survenue de la maladie chez les porteurs de l'allèle étudié par rapport aux non porteurs.

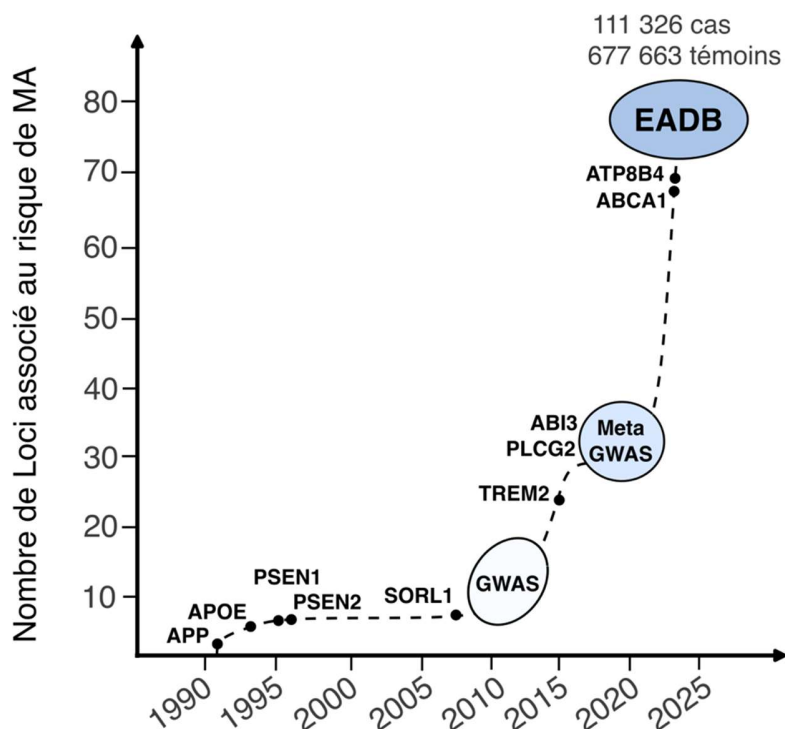
Ces études ont permis d'identifier le premier facteur de risque génétique des formes complexes de la MA, le gène *APOE*. En 1991, l'apolipoprotéine E (ApoE), dont le gène est situé sur le

chromosome 19, était mise en évidence dans les plaques amyloïdes (209). En parallèle, des études de liaisons génétiques, qui consistent à étudier la co-ségrégation de marqueurs génétiques polymorphes avec la pathologie à travers les générations, ont permis d'identifier un *locus* d'intérêt sur le chromosome 19, potentiellement impliqué dans la pathologie (210,211). À la suite de ces découvertes, l'*APOE* fut proposé comme gène candidat pour être un déterminant génétique de la MA.

Ce n'est que quelques années plus tard, que l'association de l'allèle  $\epsilon 4$  de l'*APOE* avec le risque de développer la MA fût découverte par une étude d'association menée par le groupe de Strittmatter (212). Les porteurs homozygotes  $\epsilon 4$  ont un risque environ 12 à 15 fois plus élevé de développer la MA comparé aux individus homozygotes pour l'allèle  $\epsilon 3$  (213,214). L'allèle  $\epsilon 2$  a quant à lui été associé à un effet protecteur (215). On estime que l'*APOE* représente 20% du risque attribuable à la MA, ce risque est plus proche de celui des gènes causaux dans les maladies monogéniques, comme BRCA1 dans le cancer du sein (214), que celui des facteurs de risque génétique dans les maladies complexes.

L'ApoE est impliquée dans la clairance des peptides  $A\beta$ , et la présence de l'allèle  $\epsilon 4$  diminuerait l'efficacité de cette protéine à éliminer ces peptides, favorisant ainsi leur accumulation et la mise en place de la cascade amyloïde (216). Ainsi, l'hypothèse de la cascade amyloïde pourrait également être valide pour les formes complexes de la MA pour lesquels une baisse de la clairance des peptides  $A\beta$  serait à l'origine de la charge amyloïde observée chez les patients.

Cependant, hormis l'*APOE*, la plupart des gènes candidats qui ont pu être proposés comme facteurs de susceptibilité n'ont pas été retrouvés associés au risque de développer la maladie. Ce n'est qu'avec l'émergence des approches pangénomiques à partir de 2009 que de nouveaux facteurs de risque de la MA ont été identifiés (Figure 16). Ces études d'association à l'échelle du génome reposent sur des techniques de génotypage à haut débit et aux séquençages de nouvelle génération ou NGS.



**Figure 16** : Chronologie de la découverte des gènes/loci associés au risque de développer la MA.

### 7.2.3. Les études d'association pangénomiques (GWAS)

Les études d'association pangénomiques ou GWAS (*Genome Wide Association Study*) consistent également en des études cas-témoin réalisées sur de grands échantillons de sujets non apparentés, visant à identifier des *loci* dont la fréquence allélique diffère significativement entre les cas et les témoins. Contrairement aux études d'association de type « gène candidat », les GWAS utilisent une approche sans hypothèse préalable, permettant une exploration exhaustive du génome. Les SNP sont généralement utilisés en raison de leur faible coût de génotypage et de leur abondance dans le génome. Des ressources telles que le projet HapMap, le projet *1000 Genomes* ou TOPMed fournissent un catalogue des SNP dans le génome (217–219). Pour réduire le coût et la redondance des informations collectées, un sous-ensemble informatif de SNP, appelé « tag SNP », est génotypé dans les études d'association pangénomiques. Ces tag SNP représentent des blocs haplotypiques, c'est-à-dire des régions génomiques représentatives d'un groupe de SNP, appelé haplotype, avec un déséquilibre de liaison (DL) élevé.

Le génotypage des populations étudiées est réalisé grâce aux puces de génotypage à haut débit. Dans un deuxième temps, ces génotypages peuvent permettre d'estimer le génotype des variants non présents sur la puce. Pour cela, on utilise des panels de référence qui répertorient les différentes combinaisons haplotypiques. Cette étape d'imputation permet alors d'élargir fortement le nombre de variants étudiés et une étude exhaustive du génome, sans avoir à génotyper l'ensemble des polymorphismes connus (85 millions de SNP identifiés en 2015, 1000 Genome Project Consortium).

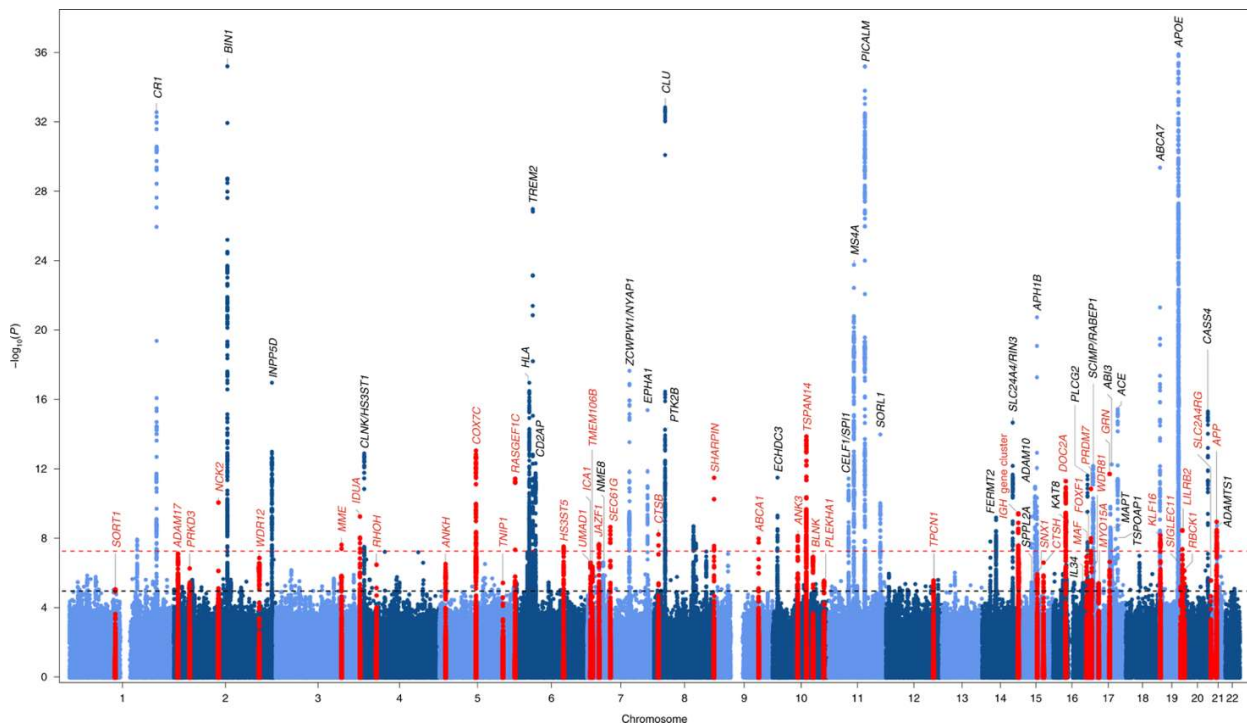
Les résultats des deux premières études d'association pangénomiques sur la MA ont été publiées en 2009. Elles ont été conduites sur quelques milliers d'individus et ont permis l'identification de trois nouveaux *loci*, en plus de l'*APOE*, à proximité ou à l'intérieur des gènes *CLU*, *CR1* et *PICALM* (220,221).

Afin d'augmenter la puissance des GWAS sur la MA, le laboratoire a lancé le projet IGAP (*International Genomics of Alzheimer's Project*), une collaboration internationale qui regroupe quatre consortiums : ADGC (*Alzheimer's Disease Genetics Consortium*), CHARGE (*Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology*), EADI (*European Alzheimer's Disease Initiative*) et GERAD (*Genetic and Environmental Risk in Alzheimer's Disease*). Ce projet a notamment permis de disposer d'un plus grand nombre d'échantillons et la réalisation d'une méta-analyse, qui permet de combiner les résultats de plusieurs GWAS indépendantes. Ceci a permis la réalisation d'une méta-GWAS, portant sur 17 008 cas et 37 154 témoins et l'identification de 11 nouveaux *loci* associés à la MA (222).

Cette méta-analyse a par la suite été suivie par d'autres méta-analyses de GWAS. L'augmentation de la taille des échantillons analysés, couplé à l'utilisation de panels de référence de plus en plus grands ont permis d'améliorer la qualité de l'imputation et d'augmenter le nombre de variations génétiques analysables (223–229). De plus, certaines GWAS ont utilisé une stratégie consistant à intégrer des cas proxys, c'est-à-dire des individus ayant indiqué avoir au moins un parent atteint de démence, ce qui a permis d'augmenter d'autant plus la puissance statistique des études pangénomiques sur la MA.

La combinaison de ces différentes avancées a abouti à une publication du consortium EADB (*European Alzheimer & Dementia Biobank*), à partir d'un échantillon de 64 498 cas et 46 828 cas

proxys et 677 643 témoins, qui a permis d'identifier 75 *loci* de susceptibilité pour la MA, dont 42 ont été nouvellement identifiés (230) (Figure 17).



**Figure 17 : Manhattan plot des différents *loci* associés à la MA par étude d'association pangénomique.** Les marqueurs génétiques sont représentés selon leurs positions génomiques sur l'axe des abscisses et sur l'axe des ordonnées est exprimé le logarithme négatif de la valeur p d'association avec le phénotype étudié. Les lignes horizontales indiquent les seuils de significativité  $p < 5.10^{-8}$  et  $p < 1.10^{-5}$ , d'après Bellenguez et al. 2022 (230).

L'utilisation des GWAS a ainsi permis l'identification de nouveaux facteurs de risque génétique de la MA. Entre 2009 et 2022, le nombre de *loci* associé au risque de développer la MA (en dehors de l'*APOE*) est passé de 3 à plus de 75.

#### 7.2.4. Limites des approches GWAS

Seule une petite partie de ces associations statistiques a fait l'objet d'études approfondies afin de déterminer notamment quels sont les gènes affectés par les variants causaux et comment les changements dans la fonction ou la régulation des gènes causaux conduisent à une modification

du risque de maladie. Ceci est principalement dû à plusieurs limitations inerrantes aux approches GWAS qui complexifient la caractérisation des mécanismes biologiques sous-jacents.

Premièrement, les variants génétiques associés sont localisés dans des blocs haplotypiques dans lesquels la plupart des variants se trouvent associés de façon indirecte avec la maladie, simplement parce qu'ils sont en DL avec le ou les variants causaux. Il est ainsi difficile de savoir parmi tous les variants associés au risque de développer la maladie dans un même *locus* quels sont ceux réellement responsables de cette association. Dans les cas où plusieurs gènes sont présents sur un même *locus*, il peut même être difficile de savoir quel gène est réellement impliqué dans cette association.

De plus, la majorité des *loci* ont généralement des effets faibles sur le risque de développer la maladie ( $OR \sim 1,2$ ) (231). Ainsi, l'apport propre de chacun des variants identifiés est faible en termes de contribution à l'héritabilité de la MA. Il est estimé qu'une proportion importante, environ 60%, de la variance génétique des formes complexes de la MA n'est pas expliquée par l'*APOE* ou les *loci* communs associés à l'échelle du génome (231).

Dans ce contexte, le séquençage de l'exome entier ou WES (*Whole Exome Sequencing*) est une approche complémentaire aux études GWAS permettant d'identifier des variants rares ( $MAF$  (*Minor Allele Frequency*)  $< 1\%$ ) dans les régions codantes et ayant des effets importants sur le risque de la maladie. De plus, les mécanismes de causalité impliquant des variants dommageables prédits, c'est-à-dire ayant un impact sur la séquence polypeptidique de la protéine codée, devraient être plus faciles à élucider en comparaison aux approches GWAS où la plupart des variants associés sont localisés dans des régions non-codantes.

#### **7.2.5. Le séquençage d'exome entier (WES)**

Ces dernières années, la baisse des coûts et les progrès des méthodes d'analyse ont fait du séquençage à haut débit de l'exome entier (WES), une alternative possible au génotypage sur puces utilisé dans les GWAS. Cette méthode analyse les bases dans les régions du génome codant pour les protéines (l'exome), ce qui signifie que toute association identifiée est susceptible d'avoir un effet fonctionnel évident.

L'exome représente environ 1,5 % du génome humain et hébergerait environ 85 % des mutations ayant des effets importants sur les caractéristiques liées à la maladie (232). En tant qu'approche globale, le WES permet d'identifier directement des variants génétiques, qu'ils soient fréquents ou rares, sans avoir recours au DL pour imputer les génotypes, comme c'est généralement le cas avec les données issues des GWAS. La méthode WES a ainsi permis d'identifier plusieurs variants rares associés au risque de MA, qui n'ont jusqu'ici pas pu être mis en évidence par les GWAS.

En 2012, les premières applications du WES à la MA ont identifié des variants rares du gène *SORL1* associés à des formes monogéniques à début précoce de la maladie (233). En 2013, la combinaison du WES avec des données GWAS imputées a permis la découverte de variants rares et non synonymes de *TREM2*, associés à une augmentation significative du risque de MA (234,235). La même année, afin d'augmenter la puissance des études basées sur les données de séquençage, différents groupes européens ayant généré des données de séquençage pour la MA se sont regroupés au sein du consortium ADES (*Alzheimer Disease European Sequencing*). De nouvelles données ont été intégrées au fil des années, notamment les données du consortium américain ADSP (*Alzheimer's Disease Sequencing Project*). Ainsi en 2022, l'étude ADES a publié la plus vaste étude WES dans le cadre de la MA en comparant les données de 16522 témoins et 16036 cas de MA. Celle-ci a permis de détecter une association significative avec le risque de MA de variants rares dans deux nouveaux gènes, *ABCA1* et *ATP8B4* (236). Entre temps, d'autres variants rares ont également été identifiés dans les gènes *ABI3*, *PLCG2*, *ABCA7*, *IGHG3* et *ZNF655* (237–240).

De manière intéressante, un certain nombre de ces gènes avec des variants rares ont été associés au risque de MA dans des études d'association pangénomiques de variants fréquents. Ceci suggère que les gènes concernés seraient susceptibles de jouer un rôle important dans la compréhension des processus physiopathologiques de la MA.

### **7.3. Implication des gènes GWAS dans le métabolisme de l'APP ?**

Conformément à l'hypothèse de la cascade amyloïde, des variations d'expression des gènes régulant le métabolisme de l'APP seraient impliquées dans le développement de la MA en favorisant la production des peptides A $\beta$ . Il a ainsi été proposé que les gènes identifiés par les GWAS puissent jouer un rôle dans le métabolisme de l'APP. En effet, bien que les principaux

acteurs comme les sécrétases soient aujourd'hui connus, le métabolisme de l'APP au niveau cellulaire apparaît plus complexe. Le clivage par l' $\alpha$ -sécrétase intervient à la surface cellulaire, tandis que les clivages par la  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases se produisent principalement dans les endosomes après l'internalisation de l'APP. De ce fait, de nombreux gènes capables de contrôler l'endocytose ou le trafic vésiculaire pourraient modifier le métabolisme de l'APP. D'autant plus que les analyses d'enrichissement des voies de signalisation effectuées sur les ensembles de données GWAS ont également identifié des voies physiopathologiques impliquées dans le traitement de l'APP et la régulation de l'endocytose (226).

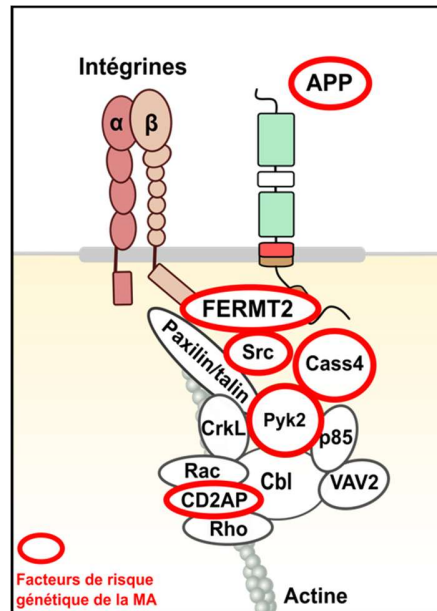
Dans ce contexte, une approche à haut débit a été développée au laboratoire afin d'identifier, parmi les gènes associés au risque de MA, ceux capables d'influencer le métabolisme de l'APP (241). Cette approche a montré que la sous-expression de Kindline-2 favorise le recyclage de l'APP mature des endosomes précoces et tardifs vers la membrane plasmique, favorisant ainsi la production d'A $\beta$ , en augmentant le pool d'APP susceptible d'être clivée par les sécrétases plutôt que d'être dégradée dans les lysosomes. D'autres études ont montré que la sous-expression de SORL1 est associée à une augmentation de la production d'A $\beta$  en bloquant la redirection de l'APP endocyté vers le réseau trans-golgi, réduisant ainsi son traitement dans les endosomes (242,243).

Outre les gènes susceptibles de moduler le tri de l'APP à partir des endosomes, il a été démontré que d'autres gènes définis par les études GWAS modulent le métabolisme de l'APP en contrôlant sa disponibilité dans les endosomes par la modulation de l'endocytose. Par exemple, la protéine CD2AP a été signalée comme capable de contrôler la production d'A $\beta$  en modulant la rétention de l'APP dans les endosomes précoces (244). La sous-expression d'ABCA7 semble induire une endocytose plus rapide de l'APP, augmentant ainsi la production d'A $\beta$  (245), tandis que la protéine PICALM a été décrite comme régulatrice de l'endocytose de la  $\gamma$ -sécrétase et de la dégradation du fragment CTF par autophagie (246,247). Il a également été proposé que PICALM module la charge de plaques amyloïdes (247,248).

Les analyses post-GWAS semblent donc placer de nombreux gènes définis par les études GWAS dans le processus métabolique de l'APP, ce qui souligne son importance dans les formes complexes de la MA. De plus, en tirant parti d'approches complémentaires et systématiques post-GWAS, il a été mis en évidence que de nombreux gènes identifiés par les GWAS qui modulent le métabolisme de l'APP participent également au complexe d'adhésion focale et aux voies de signalisation annexes (Figure 18). La voie des adhésions focales dépendante des intégrines a été impliquée dans la densité et l'activité synaptique en influençant la forme et la stabilité des épines



dendritiques ainsi que la signalisation neuronale. Parmi les gènes GWAS modulateurs du métabolisme de l'APP, les protéines CD2AP et Kindline-2, deux protéines adaptatrices, sont impliquées dans l'adhésion cellulaire et la régulation du cytosquelette d'actine (249–252).



**Figure 18** : Facteurs de risque génétiques de la MA impliqués dans la voie d'adhésion focale.

Il est intéressant de noter que l'APP, récemment décrit comme un gène défini par les GWAS (230), agit également comme une molécule d'adhésion synaptique. L'APP est particulièrement enrichie dans les sous-domaines hautement mobiles des neurones, tels que les cônes de croissance et les épines dendritiques, suggérant un rôle crucial dans le remodelage plastique des adhésions cellulaires et, par conséquent, dans la structuration correcte des synapses via la voie des adhésions focales (253,254).

Étant donné que le dysfonctionnement et la perte synaptique sont l'une des premières caractéristiques de la MA, une dérégulation génétiquement dépendante de la dynamique des synapses et de la signalisation cellulaire via la voie des adhésions focales pourrait contribuer aux processus de la MA, indépendamment de la toxicité de l'A $\beta$ .

## **Troisième partie : Les adhésions focales : des structures complexes et multiformes**

Les caractéristiques de l'APP, qui lui permettent d'agir potentiellement comme une molécule d'adhésion, rappellent les fonctions essentielles des intégrines dans la formation des adhésions focales. Ces structures sont des assemblages complexes de protéines qui connectent la MEC au cytosquelette d'actine via des récepteurs d'adhésion transmembranaires, tels que les intégrines. Ce mécanisme d'adhésion est fondamental pour de nombreux processus physiologiques, tels que le développement, la migration, la survie cellulaire, l'expression des gènes, la différenciation, l'immunité et l'homéostasie. Dans ce contexte, l'APP pourrait jouer un rôle clé en modulant ces fonctions essentielles, à l'instar des intégrines.

### **8. Les adhésions focales basées sur les intégrines**

Les adhésions focales sont des complexes macromoléculaires présents dans les cellules adhérentes, telles que les fibroblastes, et mesurent environ 1 à 5  $\mu\text{m}$  (255). À ce jour, plus de 200 protéines ont été impliquées dans la signalisation de l'adhésion focale (256). En fonction de leurs activités biochimiques, ces protéines se divisent en deux grands groupes : les protéines catalytiques et les protéines adaptatrices.

Les protéines catalytiques se subdivisent en plusieurs sous-groupes selon la spécificité de leur substrat, incluant les protéases (telles que les calpaïnes et les caspases), les kinases (par exemple, les tyrosine kinases telles que FAK et Src, les sérine/thréonine kinases telle qu'ILK $\gamma$  ou la phosphoinositide 3-kinase), les phosphatases (comme PTP1B (protéine tyrosine phosphatase 1B) et PTEN (Phosphatase and TENsin homologue)), et d'autres enzymes.

Les protéines adaptatrices, quant à elles, jouent un rôle crucial en médiant les interactions entre différentes protéines. Elles contiennent des domaines spécifiques, tels que le domaine LIM (une séquence consensus riche en cystéine) ou le domaine FERM (pour protéine 4.1/ezrine/radixine/moesine), qui facilitent ces interactions.

Les protéines des adhésions focales sont recrutées au niveau des intégrines, qui se connectent à la MEC et jouent un rôle essentiel dans la transmission des signaux entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule.

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires constitués d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$  (257). Chaque sous-unité comporte un grand domaine extracellulaire, une région transmembranaire, et, dans la plupart des cas, un petit domaine cytoplasmique. Chez les mammifères, il existe 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$ , formant 24 hétérodimères distincts d'intégrines  $\alpha\beta$ . Cette diversité confère à chaque hétérodimère des spécificités uniques en matière de reconnaissance des ligands et de fonctions biologiques.

Il existe deux types d'adhésion focale : les adhésions focales naissantes et les adhésions focales matures. Ces structures participent à la motilité des cellules à travers leurs processus d'assemblage et de désassemblage. Les adhésions focales naissantes sont de petites tailles et de courte durée. Une fraction de ces adhésions naissantes recrute des protéines supplémentaires pour former des complexes focaux, qui évoluent ensuite en adhésions focales matures, plus stables et de plus grande taille (258). Les adhésions focales matures contiennent des protéines adaptatrices et d'échafaudage telles que la Kindline, la Taline, la Vinculine, et la Paxilline. Ces adhésions sont probablement régulées par de petites GTPases. Des études montrent que la GTPase Rac est nécessaire pour la formation des complexes focaux, tandis que la GTPase Rho intervient plus tard pour permettre la maturation des complexes focaux naissants en adhésions focales plus larges, stabilisant ainsi la cellule pendant la migration (259).

Les intégrines, n'ayant d'activité enzymatique propre, s'associent avec des protéines adaptatrices et d'échafaudage pour transmettre des signaux chimiques et la force mécanique nécessaire à la formation de liens dynamiques et bidirectionnels entre la MEC et le cytosquelette (Figure 19). Ainsi, les adhésions focales sont des structures complexes hautement dynamiques qui s'assemblent et se désassemblent continuellement. L'équilibre entre ces deux processus régule la motilité cellulaire.



Lorsque les intégrines sont inactives, elles adoptent une conformation repliée, avec la partie extracellulaire orientée vers la membrane et les queues intracellulaires jointes. Lorsqu'elles sont activées, l'ectodomaine N-terminal des intégrines s'étend, ouvrant le site de liaison aux ligands entre les domaines extracellulaires  $\alpha$  et  $\beta$ , et séparant les queues intracellulaires (261). Cette étape d'ouverture permet l'établissement d'un pont moléculaire entre la MEC et le cytosquelette, les différentes conformations de l'intégrine permettant d'ajuster l'adhésion cellulaire et la signalisation.

Un certain nombre de composants cytoplasmiques régulent les interactions des intégrines avec le cytosquelette, modifiant ainsi l'affinité de la liaison au ligand. Il existe ainsi des régulateurs positifs et négatifs des intégrines.

Les intégrines peuvent être engagées dans une conformation fermée par des protéines cytoplasmiques inactivantes, telles que la filamine A et Dok 1 (262,263).

L'activation des intégrines, quant à elle, peut être décrite comme le recrutement de protéines d'adhésion focale à trois niveaux (Figure 18) :

- **Premier niveau** : les protéines adaptatrices, comme la Kindline et la Taline, permettent de relier les intégrines au cytosquelette. Ces deux protéines sont les principales co-activatrices des intégrines. La Taline se lie à la séquence NPXY/F proximale de la queue  $\beta$  cytoplasmique des intégrines par l'intermédiaire du motif phospho-tyrosine (PTB) dans son domaine F3. La liaison de la Taline à l'intégrine permet la rupture du pont salin entre les queues  $\alpha/\beta$  et est suffisante pour l'activation des intégrines (264). La Kindline se lie au motif NPxY distal de la queue  $\beta$  cytoplasmique des intégrines via son sous-domaine F3. Cependant, les Kindlines ne sont pas connues pour activer les intégrines par elles-mêmes, mais peuvent agir en coopération avec la Taline, ou bien avoir des effets spécifiques aux intégrines (265,266).
- **Deuxième niveau** : les protéines de signalisation, telles que la kinase d'adhésion focale (FAK), Src, et la Paxilline, qui assurent la transduction des signaux biochimiques et l'activation de multiples voies de signalisation intracellulaires (Figure 19).
- **Troisième niveau** : la couche de réticulation de l'actine, comprenant des protéines comme l' $\alpha$ -actinine, la Filamine, ou la Zyxine, qui régulent la polymérisation et l'organisation spatiale des filaments d'actine.

Une fois arrivées à maturité, les adhésions focales permettent aux cellules d'ajuster leurs réponses à leur environnement et de coordonner leurs fonctions cellulaires en fonction des signaux provenant de la MEC. Les adhésions focales liées à l'Actine restent stables jusqu'à ce que leur désassemblage soit déclenché.

## **8.2. Le désassemblage des adhésions focales**

Le désassemblage des adhésions focales est crucial pour la motilité cellulaire et le réarrangement du cytosquelette. Plusieurs mécanismes ont été associés au *turnover* des adhésions focales.

L'endocytose des intégrines, déclenchée par le ciblage des adhésions focales par les microtubules et médiée par la dynamine, la clathrine et ses adaptateurs, est apparue comme un contributeur majeur du désassemblage (267–270). Des études montrent que les microtubules acheminent la machinerie endocytaire vers les adhésions focales et déclenchent leur désassemblage par l'internalisation des composants de l'adhésion focale via l'endocytose médiée par la clathrine. Les protéines adaptatrices de la clathrine, comme AP-2, ARH, Dab2 et Numb, se lient directement aux queues cytoplasmiques  $\alpha$  ou  $\beta$  des intégrines, conduisant à leur internalisation vers les endosomes précoces (271,272).

La voie de signalisation FAK-Src joue également un rôle clé dans le renouvellement des adhésions focales. Les cellules déficientes en FAK présentent des adhésions focales anormalement grandes et stables, avec un taux de désassemblage réduit d'environ 15 fois, alors que le taux d'assemblage reste inchangé (273,274). De même, le désassemblage est fortement réduit dans les cellules dépourvues de la kinase Src. La phosphorylation des substrats de FAK et de Src, tels que p130cas ou la Paxilline, est nécessaire pour maintenir un taux normal de désassemblage des adhésions focales.

La famille des petites GTPases Rho joue également un rôle dans la dynamique des adhésions focales. Si l'activation de RhoA est nécessaire pour la maturation des complexes focaux en adhésions focales, d'autres membres de la famille des GTPases Rho, comme Rnd1 ou RhoE, semblent essentiels pour le désassemblage des adhésions (275,276).

D'autres travaux se sont concentrés sur les mécanismes physiques par lesquels ces structures sont désassemblées. L'un de ces mécanismes implique le clivage protéolytique des composants de l'adhésion focale par la calpaïne. La calpaïne, une protéase activée par le calcium, est présente au sein du complexe d'adhésion (277). L'inhibition de la calpaïne, par voie pharmacologique ou par siRNA, entraîne une diminution des taux de migration cellulaire et de désassemblage des adhésions focales, ainsi que l'apparition de grandes adhésions focales (278,279). Plusieurs protéines des adhésions focales, notamment la Taline, la Kindline, la Paxilline, FAK, Src, l' $\alpha$ -actinine et la tensine (280,281) ont été identifiées comme substrats de la calpaïne.

Les caspases, une autre famille de protéases, ont également été impliquées dans le processus de désassemblage des adhésions focales. Les caspases sont surtout connues pour leur rôle dans l'apoptose, et plusieurs protéines structurelles et de signalisation liées à l'adhésion et à la motilité sont clivées par les caspases au cours de l'apoptose (282–285). Néanmoins, diverses fonctions non apoptotiques ont pu être identifiées, notamment dans la différenciation, la prolifération et la promotion de la réponse immunitaire. Le clivage de protéines d'adhésion au cours de processus non apoptotiques, tels que la migration cellulaire, peut fournir un mécanisme permettant aux caspases de contrôler le renouvellement ou de modifier l'état d'activation de ces substrats. De plus, des études ont montré que le recrutement de la caspase au niveau des adhésions focales régule à la fois la migration cellulaire et l'activité des calpaïnes (284,286).

## **9. Les contacts ponctuels : équivalents neuronaux des adhésions focales**

Dans le système nerveux, il existe des complexes d'adhésion à base d'intégrine similaires aux adhésions focales, appelés contacts ponctuels, qui sont essentiels à divers processus physiologiques, tels que la croissance des neurites et la synaptogenèse. Les contacts ponctuels, particulièrement présents dans les cellules à forte mobilité, sont de petits sites d'adhésion mesurant de 90 à 200 nm.

### **9.1. Rôles des contacts ponctuels dans le guidage axonal et la stabilisation des synapses**

Le guidage des axones, assuré par le cône de croissance, repose sur ces structures sensori-motrices qui établissent des adhésions transitoires avec le substrat pour orienter les axones vers leurs cibles synaptiques (287,288). Similaires aux adhésions focales observées dans les cellules non neuronales en migration, ces contacts ponctuels dépendantes des intégrines et interagissent avec la MEC. Ils se forment lorsque les intégrines à la surface des cônes de croissance se lient aux des ligands de la MEC, ce qui provoque leur regroupement et le recrutement ultérieur de protéines adaptatrices. Ces protéines relient les intégrines au cytosquelette d'actine, facilitant ainsi l'avancée du cône de croissance et l'extension de l'axone (289).

En plus de leur rôle dans la croissance et le guidage axonale, ces adhérences sont cruciales pour la stabilisation des synapses. Après avoir atteint leur destination finale, les axones cessent de s'allonger et se ramifient pour établir des connexions synaptiques.

Les synapses permettent un transfert rapide et direct d'informations entre deux cellules, assuré par un réseau complexe de molécules d'échafaudage reliant les boutons synaptiques. Cet échafaudage est ancré de deux manières : par des connexions entre la cellule et les protéines de la MEC et par des adhésions cellule-cellule (290,291). Parmi les molécules d'adhésion cellulaire synaptique, les intégrines, exprimées à la fois aux membranes pré- et post-synaptiques, jouent un rôle clé (292–294). Leur activation est impliquée dans la consolidation de la LTP et la plasticité structurelle des épines dendritiques (293,295,296).

## **9.2. Similarités entre contacts ponctuels et adhésions focales**

Bien que leur formation diffère quelque peu, les contacts ponctuels et les adhésions focales partagent plusieurs similitudes. Parmi celles-ci figurent le recrutement de protéines adaptatrices et de signalisation, telles que la Taline, la Paxilline, la Vinculine, ainsi que les kinases FAK et Src. La stabilisation des contacts ponctuels dépend également de l'activité RhoA (289,297,298). De même, l'activité de FAK et de Src semble réguler la dynamique d'assemblage et de désassemblage des contacts ponctuels au niveau cônes de croissance (299–301). Ces adhésions sont également régulées de manière dynamique par des processus de clivage, notamment par la calpaïne et la caspase, activées de manière locale et transitoire au niveau de ces adhésions. Ces enzymes clivent des molécules d'adhésion telles que la Taline, FAK et l'Actine, régulant ainsi la stabilité et la dynamique des contacts ponctuels (302,303).

De façon intéressante, l'APP se colocalise avec les intégrines dans les neurones en culture (304). Dans les intégrines, le motif NPXY sert de fondation pour l'assemblage de la machinerie mécano-sensorielle du cytosquelette. Ce motif est également présent dans l'APP, et il a été démontré que l'APP se colocalise avec les protéines adaptatrices Taline et Kindline-2 (305,306). Le fait que l'APP colocalise avec des protéines des adhésions focales, associé aux données suggérant un rôle de l'APP en tant que molécule d'adhésion, laisse penser que l'APP pourrait jouer un rôle central dans les interactions cellule-cellule et cellule-substrat, notamment dans la plasticité synaptique et la stabilité des neurites lors que leur extension.

Comme discuté précédemment, des études GWAS ont attribué aux protéines d'adhésion focale un rôle central dans la pathologie de la MA (306,307). Cela indique qu'une perte de l'intégrité ou de la stabilité des adhérences pourrait contribuer à la progression de la MA. De plus, l'inactivation de l'APP a été rapportée comme ayant un impact sur la stabilité des adhésions focales (308),



renforçant l'idée que la stabilité et l'intégrité de ces complexes d'adhésion sont essentielles pour une fonction cérébrale saine.

Les facteurs de risque identifiés dans les GWAS incluent des protéines telles que Src, Rac, Rho, Kindline-2, et Paxilline, toutes connues pour moduler la dynamique des adhésions focales et leur stabilité (307). Une dérégulation de ces protéines pourrait donc perturber la mécanique des adhésions, entraînant un traitement aberrant de l'APP et à une capacité réduite à maintenir l'homéostasie cellulaire.

Dans le cadre de cette thèse, je me suis particulièrement intéressée à l'un de ces facteurs de risque génétique : la protéine Kindline-2. Ce co-régulateur clé de l'activité des intégrines, en coopération avec la taline, s'est révélé être un modulateur majeur du métabolisme de l'APP ainsi que des fonctions neuronales associées à cette protéine (241,306).

## Quatrième partie : La protéine Kindline-2

### 10. La famille des protéines Kindlines

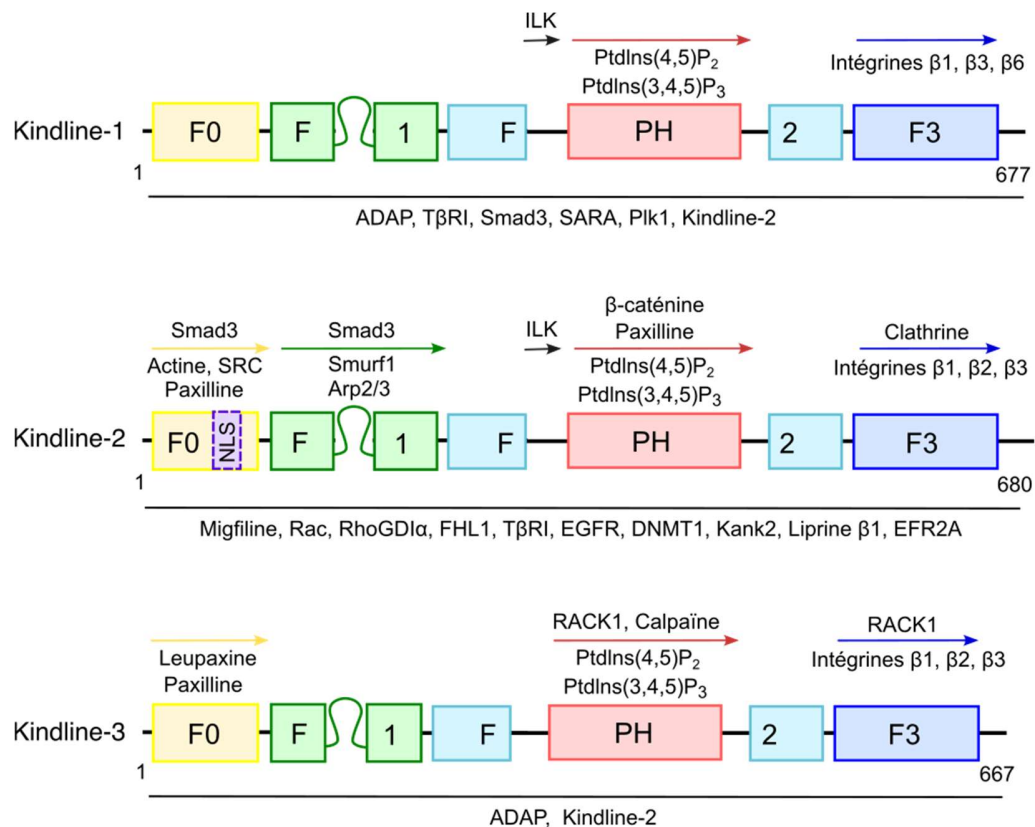
La protéine Kindline-2, encore appelée FERMT2 ou Mig-2, appartient à la famille des protéines Kindlines. Cette famille de protéines doit son nom à Theresa Kindler, qui a décrit pour la première fois en 1954 une maladie congénitale de la peau chez une patiente âgée de 14 ans (309). Cette maladie est caractérisée par des cloques cutanées, une fragilité de la peau, une photosensibilité accrue, et est associée à un risque élevé de cancer de la peau. Il a fallu attendre près de 50 ans pour que des mutations perte de fonction du gène *KINDLIN-1* (ou *FERMT1*) soient identifiées comme la cause de la maladie, aujourd'hui connue sous le nom de syndrome de Kindler (310,311).

#### 10.1. Structure des Kindlines

Chez les mammifères, la famille des Kindlines comprend 3 membres, Kindline-1, Kindline-2 et Kindline-3, chacun codé par un gène différent, *FERMT1* (chromosome 20p12.3), *FERMT2* (chromosome 14q22.1) et *FERMT3* (chromosome 11q13.1) respectivement. La drosophile possède deux orthologues, Fermitine-1 et -2, tandis que *Caenorhabditis elegans* n'en possède qu'un, UNC-112. D'après l'analyse phylogénétique chez les vertébrés, le gène *FERMT2* semble être celui qui a subi le moins de divergence évolutive, alors que les gènes *FERMT1* et *FERMT3* ont montré une divergence beaucoup plus importante et seraient issus d'événements de duplication du gène *FERMT2* (312). Néanmoins ces trois paralogues partagent un degré de similarité élevé, Kindline-2 partage 62% et 53% d'identité de séquence avec Kindline-1 et Kindline-3 respectivement (310).

D'un point de vue structural, la protéine Kindline est caractérisée par la présence d'un domaine FERM, ainsi nommé en raison de sa présence dans la protéine 4.1, l'Ézrine, la Radixine et la Moésine (313). Ce domaine, composé des sous-domaines F1, F2 et F3, est un domaine d'interaction que l'on trouve couramment dans de nombreuses protéines reliant la membrane au cytosquelette, comme la Taline (Figure 20). Le sous-domaine F3 ressemble à un domaine de liaison à la phosphotyrosine (PTB) qui a la capacité de lier les motifs NXXY, et se termine par une courte séquence d'environ 8 acides aminés qui est importante pour l'activation des intégrines par

la Kindline-2 (314). De plus, contrairement à la Taline, le domaine F2 de la Kindline abrite un domaine d'homologie à la Pleckstrine (PH), qui permet l'interaction avec de multiples phosphoinositides au niveau des membranes cellulaires, en particulier avec le phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate [PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>] (315,316). Le sous-domaine F1 est également précédé d'un sous-domaine F0 N-terminal. La courte région chargée positivement dans le domaine F0 (Ubiquitine like domain) et la boucle non structurée dans le domaine F1 sont également nécessaires pour la liaison de la Kindline à la membrane plasmique et sa localisation aux adhésions focales (317,318). De plus, d'après une analyse biochimique, seule la protéine Kindline-2 contient un signal de localisation nucléaire (NLS) (319).



**Figure 20 :** Organisation des domaines et partenaires d'interaction identifiés pour les Kindlines. Les partenaires d'interaction signalés comme interagissant avec des sous-domaines spécifiques connus sont indiqués au-dessus des sous-domaines correspondants, et ceux dont le domaine d'interaction avec la Kindline n'est pas connu sont notés au-dessous de la structure. RACK1 (Receptor of Activated protein C Kinase 1), ADAP (Adhesion and Degranulation promoting Adapter Protein) ; SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) ; RhoGDIα (Rho GDP-dissociation Inhibitor α) ; FHL1 (Four-and-a-Half LIM protein 1) ; EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) ; DNMT1 (DNA Methyltransferase 1), adapté de Bu et al. 2021 (320).

## **10.2. Les Kindlines : des protéines adaptatrices**

Les Kindlines sont des protéines adaptatrices qui ne possèdent pas de domaine catalytique. L'importance des Kindlines proviendrait de leur rôle d'adaptateur pour la médiation des interactions protéine-protéine, participant ainsi à l'élaboration de grands complexes multimoléculaires qui donnent lieu à diverses réponses cellulaires. Des efforts considérables ont ainsi été consacrés à l'identification des partenaires de liaison des Kindlines. Les sites de liaison des partenaires identifiés des Kindlines sont illustrés dans la figure 20.

Des sites de liaison aux phospholipides se trouvent dans les sous-domaines PH, F0 et F1, notamment au niveau de la longue boucle flexible. Ces interactions ancrent les Kindlines aux membranes et participent à l'activation des intégrines (316–318,321,322). Le sous-domaine F0 contient également des sites de liaison pour l'Actine, la kinase Src, la Paxilline ou la Leupaxine (323–326). Outre ses propriétés de liaison aux phospholipides, le sous-domaine PH contient également un site de liaison à la Paxilline et à RACK1 (327,328). Un site de liaison pour ILK (Integrin-Linked Kinase) a également été identifié entre le sous-domaine F2 N-terminal et le sous-domaine PH (329,330). Des interactions avec les protéines Smad3, Smurf1 et la  $\beta$ -caténine ont également été démontrées (331–334). Le sous-domaine F3 contient un domaine de liaison à la Clathrine et le site de liaison principal aux intégrines (320,335). D'autres partenaires des Kindlines, dont les régions d'interaction ne sont pas encore entièrement définies, sont également représentés sur la figure 20. Les sites de liaison ont principalement été étudiés pour une seule Kindline, mais ils peuvent être extrapolés aux autres membres de la famille grâce à leur homologie.

Certaines interactions peuvent influencer la fonction d'une Kindline spécifique de manière sélective. Des modifications post-traductionnelles (MPT), telles que la phosphorylation, l'ubiquitination ou la protéolyse, peuvent également être sélectives et influencer la fonction d'une Kindline spécifique (281,325,332,332). En effet, bien que les trois Kindlines partagent un degré élevé de similarité, des fonctions et un modèle d'expression spécifiques ont été attribués à chaque membre.

Kindline-1 est exprimée principalement dans les cellules épithéliales ; Kindline-2 est largement exprimée dans de nombreux types de cellules, à l'exception des cellules hématopoïétiques ; et

l'expression de Kindline-3 est limitée principalement aux cellules hématopoïétiques, bien qu'elle soit également exprimée dans les cellules endothéliales (319,336,337).

La suppression de chaque gène des Kindlines chez le poisson zèbre, la souris et/ou l'Homme est associée à des déficiences fonctionnelles significatives. Des mutations avec perte de fonction pour Kindline-1 et Kindline-3 entraînent notamment des maladies humaines associées à une altération de l'adhésion cellulaire. En effet, chez l'Homme, les mutations entraînant des déficiences en Kindline-1 sont à l'origine du syndrome de Kindler, comme mentionné précédemment. Des anomalies intestinales sont également présentes (309,310,338,339).

Des mutations du gène de la Kindline-3 provoquent un déficit d'adhésion leucocytaire de type III (LAD III), une maladie associée à des saignements spontanés, à une susceptibilité aux infections et à des anomalies osseuses (340,341).

Il n'existe aucun rapport sur des mutations perte de fonction de Kindline-2 chez l'Homme. Néanmoins, la perte de Kindline-2 chez la souris et le poisson zèbre entraîne une létalité embryonnaire (336,342) avec un phénotype évoquant un défaut de fonctionnement des intégrines.

## **11.Zoom sur Kindline-2 : une protéine associée au risque de MA**

La protéine Kindline-2 est la première Kindline exprimée au cours du développement. On la trouve dans différents compartiments subcellulaires. Dans les cellules en culture, elle s'accumule dans tous les types d'adhésion aux intégrines, notamment les adhésions naissantes et les adhésions focales. Kindline-2 a également montré une diffusion libre au niveau de la membrane, à l'intérieur et à l'extérieur des adhésions focales (319,343,344). Kindline-2, probablement grâce à son signal de localisation nucléaire, peut également se localiser dans le noyau des cellules (333).

Les modèles animaux ont fourni des informations sur les fonctions de cette protéine. Des mutations dans unc-112, l'orthologue de Kindline-2 chez *C. elegans*, entraînent un assemblage aberrant des corps denses et des lignes M, qui sont les équivalents des costamères musculaires et des disques intercalaires chez les vers (345). Chez la drosophile, la délétion de l'orthologue de la Kindline-2 entraîne un phénotype musculaire arrondi (346). Chez le poisson zèbre, le morphant Kindline-2 présente des défauts myocardiques dus à une perturbation de la formation des disques intercalaires et à un défaut d'attachement des myofibrilles aux complexes membranaires (342,347). Les souris présentant un déficit partiel en Kindline-2 (Kindline-2<sup>+/-</sup>) présentent une

altération de l'angiogenèse, de l'hémostase, de la propagation cellulaire et de l'organisation du cytosquelette d'actine (323,335,347). Enfin, le knock-out de Kindline-2 chez les souris entraîne une létalité péri-implantatoire des blastocytes (stade embryonnaire E7,5), provoquée notamment par un détachement de l'endoderme primitif et de l'épiblaste de la membrane basale (336).

### **11.1. Quelles sont les fonctions identifiées de Kindline-2 ?**

La fonction de Kindline-2 est polyvalente, comme le montre son large spectre de partenaires de liaison. Outre l'activation des intégrines, la Kindline-2 participe entre autres à la différenciation, à la signalisation indépendante des intégrines, à la progression du cycle cellulaire, à l'endocytose ou encore à l'expression des gènes.

#### **11.1.1. Kindline-2 contribue à l'activation des intégrines**

La fonction majeure de Kindline-2 est son rôle dans l'activation des intégrines. Kindline-2 est en effet le principal co-activateur des intégrines, avec la Taline. Pour cela, Kindline-2 est capable d'interagir directement, via son motif PTB dans le domaine F3, avec le motif NPxY/F distal des queues  $\beta$  cytoplasmiques de l'intégrine (336,348,349). Plus précisément, il a été montré que le motif QW au sein du domaine PTB, soit la glutamine en position 614 et le tryptophane en position 615, sont nécessaires pour cette interaction (336). L'interaction entre les intégrines et Kindline-2 peut ainsi être inhibée par la mutation des acides aminés Q614 et W615 en alanine (Q614A/W615A) (350).

Cette interaction est aussi bien impliquée dans l'activation « *Inside-out* » que « *Outside-in* » des intégrines. Elle régule notamment l'affinité de l'intégrine pour lier des ligands extracellulaires, en induisant des réarrangements conformationnels du domaine extracellulaire des intégrines (351,352). De plus, cette interaction permettrait de stabiliser les complexes ligands-intégrines, en renforçant notamment l'interaction entre la Taline et les intégrines (252,353). Une étude a montré que l'interaction Kindline-2/intégrines pouvait être conduite par la protéine LRP1 (Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1) qui stimule la formation du complexe en liant à la fois Kindline-2 et les intégrines (354).

Kindline-2 serait également impliquée dans le regroupement des intégrines. Ce regroupement favoriserait l'adhésion cellulaire en modulant l'affinité et facilitant la maturation des adhésions focales (355,356). Des études suggèrent que Kindline-2 est capable de se dimériser par une interaction via ses domaines F2 pour favoriser le regroupement et l'activation des intégrines (251,357). Une autre étude a montré que le domaine PH est nécessaire à l'oligomérisation de Kindline-2, tandis que le domaine F3 semble inhiber ce processus (358).

### **11.1.2. Kindline-2 facilite la liaison des intégrines au cytosquelette d'actine**

Outre l'activation de l'intégrine, la Kindline-2 participe également à la connexion des intégrines avec le cytosquelette d'actine. La Kindline-2 est en effet capable d'interagir avec la kinase liée à l'intégrine (ILK), une pseudo-kinase importante pour relier les intégrines au cytosquelette d'actine (329). L'interaction Kindline-2/ILK, qui est médiée par le sous-domaine F2-PH de la Kindline et le domaine pseudo-kinase de l'ILK, contribue également au recrutement et à la rétention de la Kindline et de l'ILK au niveau des adhésions focales (359). Cette interaction entraîne une interaction prolongée du ligand avec les intégrines et favorise la propagation cellulaire.

Kindline-2 interagit directement avec la Paxilline au niveau des sites d'adhésion naissantes dans les fibroblastes, ce qui favorise la croissance des protubérances membranaires médiée par la kinase des adhésions focales (FAK) (252). En outre, l'association de Kindline-2 avec la Paxilline affecte positivement la signalisation Akt initiée par l'engagement du ligand de l'intégrine, ce qui favorise l'adhésion cellulaire mais également la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire.

La phosphorylation de Kindline-2 par Src permet le recrutement de la Migfiline au niveau des adhésions cellule-MEC (360). La Migfiline, quant à elle, interagit avec la Filamine ce qui favorise l'association de la Migfiline avec les filaments d'actine. Kindline-2 participe ainsi à la connexion entre la MEC et le cytosquelette d'actine, ce qui joue un rôle dans la modulation de la forme des cellules (343).

Kindline-2 peut également lier directement le réseau d'actine via son motif ABS (Actin-Binding Site) dans son domaine F0, et peut ainsi réguler l'organisation du cytosquelette d'actine et la propagation cellulaire (323).

De plus, une étude a montré que Kindline-2 est capable de recruter le complexe Arp2/3 du cytosquelette via l'activation de la petite GTPase Rac1, ce qui favorise la polymérisation de l'actine (326).

### **11.1.3. Kindline-2 régule l'expression des gènes**

Des études ont identifié la capacité de Kindline-2 à réguler l'expression des gènes. Kindline-2, contrairement à ses deux homologues, peut se localiser dans le noyau grâce à sa séquence NLS dans le domaine F0 (319). Elle jouerait ainsi un rôle important dans la régulation transcriptionnelle et épigénétique.

Kindline-2 est fortement exprimée dans les muscles cardiaques et squelettiques où elle favorise l'élongation musculaire et la fusion des cellules musculaires de manière dépendante de l'intégrine (319,361). Une étude a en effet identifié Kindline-2 comme un régulateur de la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, importante notamment pour le développement musculaire. Au cours de la différenciation myogénique, la translocation nucléaire de Kindline-2 et de la  $\beta$ -caténine est induite. Plus précisément, Kindline-2 forme un complexe transcriptionnel avec la  $\beta$ -caténine et TCF4, qui interagit avec le promoteur de la Myogénine pour renforcer son expression et induire la différenciation myogénique (362).

De plus, l'interaction entre Kindline-2 et l'ADN méthyltransférase 1 (DNMT1) augmenterait la stabilité de cette dernière, et favoriserait notamment la liaison de la DNMT1 au promoteur de la E-cadhérine, supprimant ainsi l'expression de la E-cadhérine, une protéine associée à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (363). Kindline-2 participerait également à la régulation de la TEM en jouant un rôle dans la répression épigénétique de la famille des miR-200, via la formation d'un complexe avec la DNMT3A dans le noyau cellulaire (364).

De même, Kindline-2 réprimerait l'expression de GATA4 en formant un complexe avec l'histone méthyltransférase SUV39H1, ce qui permettrait de prévenir l'hypertrophie cardiaque pathologique (365).



#### **11.1.4. Kindline-2 joue un rôle dans la modulation du cycle cellulaire**

Kindline-2 a été impliqué dans la modulation de la progression du cycle cellulaire. Cette modulation dépend de la régulation de la SerpinB2 et p21 par Kindline-2. Pour cela, l'interaction de Kindline-2 avec p53, un gène inducteur de sénescence, inhibe la liaison de p53 au promoteur de SerpinB2 et p21, réduisant ainsi l'expression de ces dernières (366).

De plus, Kindline-2 a été identifié comme jouant un rôle dans la formation du fuseau mitotique. L'étude en question montre que Kindline-2 permet de maintenir l'acétylation de l' $\alpha$ -tubuline en inhibant l'Histone Désacétylase 6 (HDAC6) associée aux microtubules. Ce mécanisme ferait intervenir la voie de signalisation impliquant la Paxilline ou la kinase AKT et la Glycogène Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (367).

#### **11.1.5. Kindline-2 intervient dans la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose**

Il a été démontré que Kindline-2 inhibe la voie de signalisation Hippo en interagissant directement avec MOB1 et en induisant sa dégradation (368). La voie Hippo étant impliquée dans le contrôle de la prolifération et la promotion de l'apoptose.

Une autre étude montre que Kindline-2 pourrait également participer au contrôle de l'apoptose et de la prolifération via la régulation de la voie TNF/NF- $\kappa$ B (369). En effet, la suppression de l'expression de Kindline-2 dans des cellulaires hépatocytaires dans un modèle murin provoque une activation anormale de la voie de signalisation TNF/NF- $\kappa$ B, menant à une apoptose massive des hépatocytes et à la stimulation de la prolifération des cellules biliaires et des cellules stellaires hépatiques dans le foie.

#### **11.1.6. Kindline-2 participe à l'activation de l'endocytose**

Une autre fonction de Kindline-2 a pu être identifiée dans les cellules endothéliales, indépendamment de l'activation des intégrines. En effet, il a été montré que l'interaction de Kindline-2 avec la chaîne lourde de la Clathrine déclenche l'endocytose et le recyclage d'enzymes

membranaires, telles que CD39 (ou Ectonucléoside triphosphate diphosphohydrolase) et CD73 (ou Ecto-5'-nucléotidase), modulant ainsi le catabolisme de l'ATP/ADP, ce qui affecte l'agrégation plaquettaire et l'hémostase (335).

#### **11.1.7. Kindline-2 est impliquée dans le processus d'angiogenèse**

Kindline-2 est fortement exprimée dans les cellules endothéliales. Une étude effectuée chez la souris et le poisson zèbre a montré que Kindline-2 est nécessaire à l'angiogenèse et à l'homéostasie des vaisseaux sanguins. Ces fonctions sont assurées par la promotion de l'adhésion médiée par les intégrines au cours de l'angiogenèse (347).

Une autre étude a montré que l'interaction entre Kindline-2 et l'éphrine B est importante pour l'activation des intégrines médiée par EphB/éphrineB. En outre, il a été montré que Kindline-2 joue un rôle essentiel dans la signalisation bidirectionnelle de la voie EphB/éphrineB qui permet le développement vasculaire. Plus précisément, Kindline-2 serait capable de moduler l'activation du récepteur EphB en favorisant le regroupement de ces récepteurs par son interaction avec l'éphrineB (370).

#### **11.1.8. La dérégulation de Kindline-2 est associée à divers cancers**

Compte tenu du large profil fonctionnel de Kindline-2, cette protéine est liée à pratiquement toutes les facettes de la biologie du cancer, influençant entre autres le métabolisme cellulaire, les interactions entre la tumeur et le microenvironnement, la régulation des cellules souches cancéreuses, l'instabilité du génome et la chimiorésistance (333,367,371,372). Dans l'ensemble, Kindline-2 présente une expression variable dans les cancers humains. Elle peut exercer des fonctions de promotion ou d'inhibition des tumeurs. Ces résultats opposés semblent dépendre du type de tumeur. Par exemple, les niveaux d'expression de Kindline-2 sont en corrélation avec l'invasion tumorale, les métastases ganglionnaires et la mauvaise évolution de la maladie dans le cancer du sein, du pancréas, de la prostate ou encore du système gastrique (366,373–381).

A l'inverse, des niveaux élevés de Kindline-2 semblent inhiber la progression tumorale dans le cancer de l'ovaire et du côlon (382,383).

L'un des principaux effets oncogènes de Kindline-2 semble être la promotion de la TEM. Cette TEM joue un rôle essentiel dans l'acquisition du phénotype métastatique des tumeurs cancéreuses en passant d'un phénotype différencié à un phénotype plus dédifférencié. Kindline-2 médie par exemple la répression épigénétique de miR-200, un régulateur établi de la TEM, en formant un complexe avec la DNMT3A et favorise ainsi l'invasion du cancer du sein (364). Une autre étude a démontré que Kindline-2 favorise la TEM dans le carcinome hépatocellulaire en activant la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine via l'augmentation de l'expression de la  $\beta$ -caténine, ainsi que de l'Axine 2 et la Métalloprotéinase 7 (MMP7), deux cibles de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine (384).

Outre la régulation de la TEM, il a été montré que Kindline-2 régule la viabilité des cellules cancéreuses par la stimulation de la signalisation Hedgehog en favorisant l'expression de GLI1 par un mécanisme impliquant l'inactivation de GSK3 $\beta$  (378).

Il a également été suggéré que Kindline-2 augmente l'instabilité du génome, une caractéristique centrale du développement tumoral, par la régulation de l'expression de micro-ARN (385,386).

## **11.2. Les mécanismes de régulation de Kindline-2**

En dehors des interactions protéiques, la régulation de la fonction de Kindline-2 est également assurée par des MPT.

### **11.2.1. Kindline-2, Src et les intégrines**

L'une des MPT les plus répandues est la phosphorylation. Un certain nombre de sites de phosphorylation de Kindline-2, qui régulent la signalisation de l'intégrine, ont été découverts (387). Notamment, Kindline-2 est phosphorylée au niveau de la tyrosine 193 (Y193) dans son domaine F0 par la kinase Src, connue pour interagir avec le domaine F0/F1 de Kindline-2 via son domaine SH2 (325,360). Il est également établi que l'activité de Src est requise pour l'activation des intégrines médiée par Kindline-2, en venant interagir et phosphoryler Kindline-2 au niveau de la Y193. Il a été démontré que cela déclenchait une série d'événements interconnectés, notamment une meilleure affinité de liaison de Kindline-2 pour Src et Migfiline, le recrutement de la Migfiline aux adhésions focales, l'activation de Src, et la phosphorylation ultérieure de la Paxilline (360).

### **11.2.2. Dégradation protéasomique de Kindline-2**

La dégradation protéasomique est un autre mode de MPT qui régule l'activité de Kindline-2. Il a été démontré que Smurf1, une E3 ubiquitine ligase, contrôle la dégradation protéolytique de Kindline-2. Smurf1 interagit avec Kindline-2 au niveau de son domaine F1 et favorise son ubiquitination, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome et à l'inhibition subséquente de l'intégrine (332).

La Parkine, une autre E3 ubiquitine ligase, est également capable de former un complexe avec Kindline-2, au sein des mitochondries, ce qui mène à l'ubiquitination de Kindline-2 et sa dégradation protéasomique, inhibant ainsi le renouvellement des adhésions focales (388).

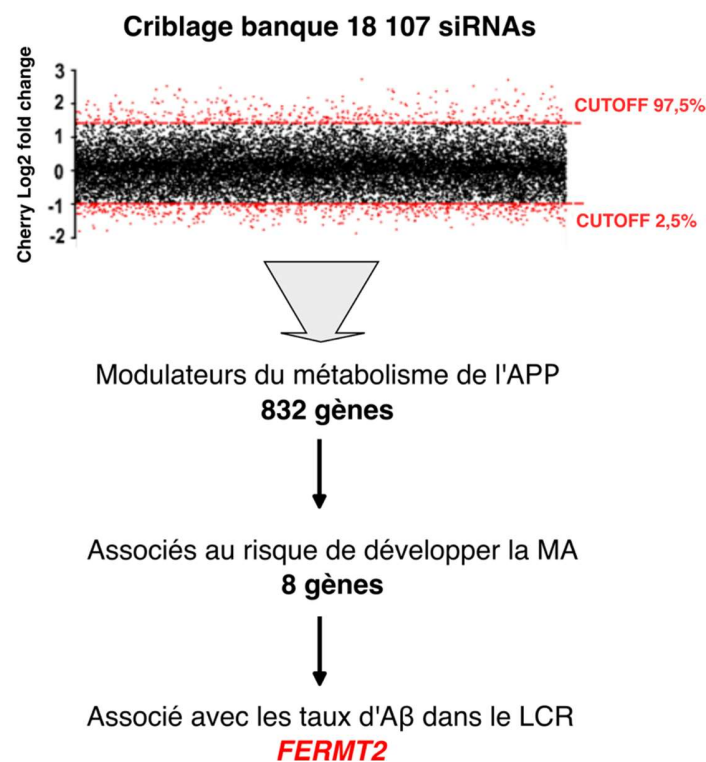
### **11.3. Kindline-2 dans la maladie d'Alzheimer**

En 2013, une étude GWAS a identifié Kindline-2 comme un facteur de risque génétique pour la MA (222,226,230,389). Comme mentionné précédemment, Kindline-2 est largement exprimée dans les tissus adultes, notamment dans le cerveau. On la retrouve dans les oligodendrocytes, les cellules endothéliales, la microglie, les neurones et les astrocytes où elle est le plus fortement exprimée (319). Au niveau neuronal, Kindline-2 est présente dans le corps cellulaire, les dendrites, les axones ainsi qu'au niveau du cône de croissance (319). Cependant, aucune donnée de la littérature ne décrivait ses fonctions physiologiques au niveau neuronal. Des études réalisées au laboratoire ont permis d'identifier Kindline-2 non seulement comme un régulateur du métabolisme de l'APP, mais également de la plasticité synaptique, et ce, de manière dépendante de l'APP.

#### **11.3.1. Kindline-2 régule métabolisme de l'APP**

Un criblage HCS (*High Content Screening*) utilisant une banque de 18 107 siRNA a été réalisé au laboratoire pour identifier les gènes capables de moduler le métabolisme de l'APP à l'échelle du génome. Les 5% des gènes ayant montré les effets les plus marqués ont été sélectionnés, soit

832 gènes (Figure 21). Parmi eux, huit gènes étaient situés dans des *loci* associés au risque de développer la MA. Afin de valider l'impact de ces gènes sur la production des peptides A $\beta$  chez l'Homme, l'association avec les variations des niveaux des peptides A $\beta$ 42 dans le LCR de 2950 patients a été analysée. Finalement, seul le gène *FERMT2* s'est révélé associé à une modulation des niveaux des peptides A $\beta$ 42, suggérant un rôle de ce facteur génétique dans la maladie via la régulation du métabolisme de l'APP.



**Figure 21** : Schéma illustrant les résultats du criblage HCS de 18 107 siRNA pour identifier les gènes capables de réguler le métabolisme de l'APP. Les criblages ont été effectués dans un modèle HEK293-APP<sup>695WT</sup>mCherry-YFP décrit précédemment (241). Les variations moyennes de l'intensité de fluorescence (log2 fold-change) du signal mCherry obtenues après trois criblages indépendants. Le signal mCherry a été utilisé pour déterminer les 5% de résultats présentant les variations les plus fortes (en rouge ; 2,5% montrant une régulation à la hausse et 2,5% montrant une régulation à la baisse), d'après Chapuis et *al.* 2017 (241).

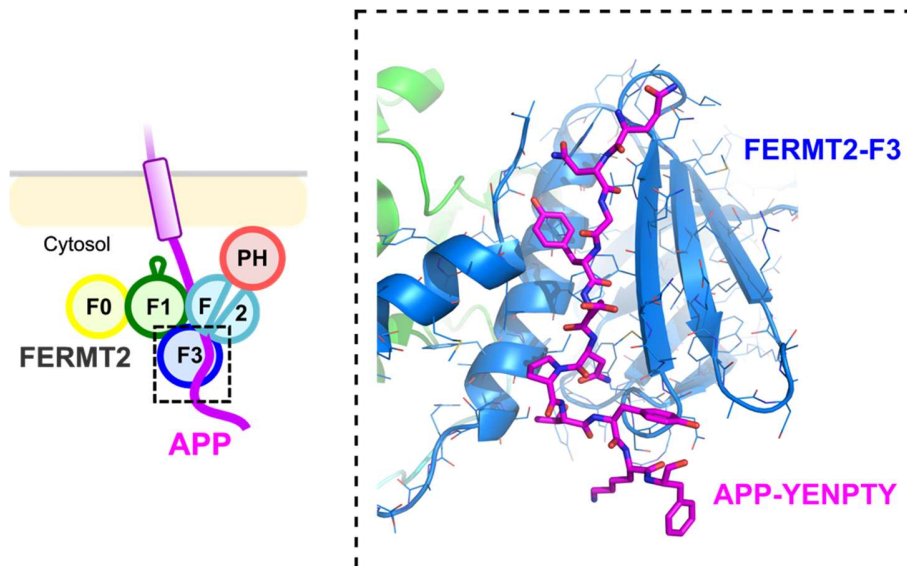
Pour comprendre les mécanismes par lesquels Kindline-2 régule le métabolisme de l'APP, l'impact de sa sous-expression a été étudié dans un modèle HEK293 surexprimant l'APP (HEK293-APP<sup>695WT</sup>). Les résultats de cette étude suggèrent que Kindline-2 régule l'internalisation et la dégradation de l'APP. En effet, l'inhibition de Kindline-2 favorise la production des peptides A $\beta$  en facilitant le recyclage de l'APP mature et en augmentant ses niveaux à la surface cellulaire. À l'inverse, la surexpression de Kindline-2 réduit les niveaux d'APP ainsi que ceux de ses métabolites apparentés (241).

De plus, Kindline-2 pourrait jouer un rôle dans le développement de la pathologie amyloïde. Une étude étaye le rôle potentiel de Kindline-2 dans le contrôle de la production des peptides A $\beta$  au niveau cérébral (390). Parmi les gènes identifiés par les analyses GWAS, trois, dont *FERMT2*, ont été associés à une augmentation des dépôts amyloïdes dans le cerveau.

### 11.3.2. Kindline-2 interagit directement avec l'APP

Kindline-2 est une protéine essentielle au déclenchement de la signalisation de l'intégrine (252). Cette activation repose sur l'interaction entre le domaine F3 de Kindline-2 et le motif NxTY présent dans le domaine intracellulaire des intégrines. Ce même motif est également présent dans le domaine intracellulaire de l'APP, jouant un rôle dans la régulation de son transport et de son métabolisme via des interactions protéiques (voir partie 6.1.2.1). Cela renforce l'idée que l'APP et Kindline-2 puissent former un complexe fonctionnel.

Récemment, une interaction directe entre Kindline-2 et l'APP a été identifiée par le laboratoire, impliquant l'interaction du domaine F3 de Kindline-2 avec le motif NxTY dans le domaine intracellulaire de l'APP (Figure 22) (306).



**Figure 22** : Modèle structurel du complexe Kindline-2 / APP construit par homologie à partir de la structure cristalline du complexe Kindline-2 / Intégrine  $\beta 3$ , d'après Eysert et al. 2021 (251,306).

L'impact de cette interaction sur le métabolisme de l'APP a été étudié à l'aide d'un mutant de Kindline-2 (Q621W622AA, Kindline-2<sup>QW</sup>). Des études antérieures ont montré que cette mutation empêche l'interaction entre le domaine F3 de Kindline-2 et le motif NxTY de l'intégrine-β3 (349). La surexpression de Kindline-2 dans la lignée cellulaire HEK293-APP<sup>695WT</sup> a diminué les niveaux d'APP à la surface cellulaire, un effet qui a été aboli par la mutation QW. De plus, la surexpression du mutant Kindline-2<sup>QW</sup> a exercé un effet dominant négatif, reproduisant les effets observés lors de l'inhibition de Kindline-2, avec une augmentation de l'APP mature à la surface cellulaire et une production accrue d'Aβ, comme rapporté précédemment (241). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que l'interaction Kindline-2 / APP est nécessaire pour que Kindline-2 ait un impact sur le métabolisme de l'APP.

### **11.3.3. Kindline-2 régule la croissance axonale et la plasticité synaptique de manière dépendante de l'APP**

Selon les rôles connus de Kindline-2 et de l'APP comme molécules d'adhésion, il est possible que l'interaction entre ces deux protéines intervienne dans les mécanismes d'adhésion cellulaire, telles que la croissance des neurites, la synaptogénèse ou encore la plasticité synaptique, rôles ayant déjà été établis pour l'APP.

L'effet de la sous-expression de Kindline-2 au niveau neuronal a donc été étudié et a montré des effets néfastes sur la croissance axonale ainsi que sur la LTP, impliquée dans les processus de mémorisation au niveau synaptique (306). Dans les deux cas, l'effet délétère de Kindline-2 dépendrait de son interaction avec l'APP. Comme mentionné précédemment, le domaine intracellulaire de l'APP est nécessaire pour une morphologie et une plasticité synaptiques normales, cela suggère que ses partenaires d'interaction intracellulaire, tel que Kindline-2, pourraient être nécessaires pour une fonction synaptique correcte (135).

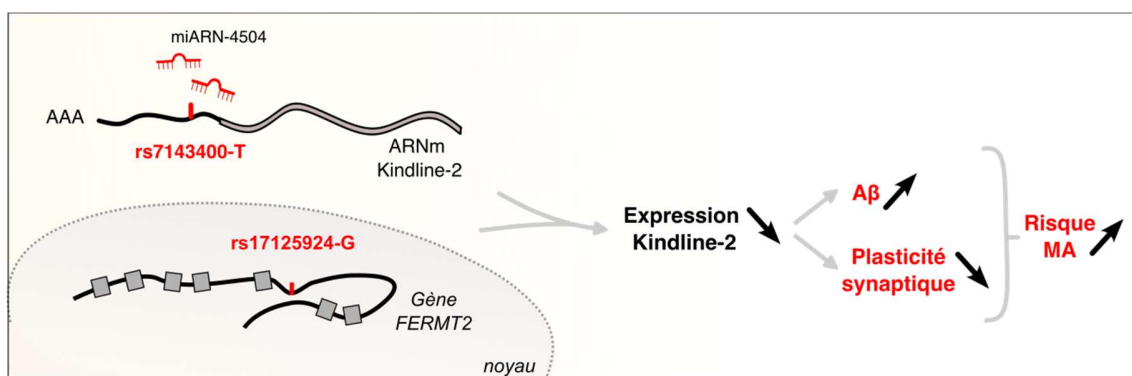
### **11.3.4. Les variants de Kindline-2 associés au risque de MA**

La caractérisation des facteurs qui modulent l'interaction entre Kindline-2 et l'APP pourrait permettre de mieux comprendre l'impact de Kindline-2 sur le métabolisme de l'APP ainsi que sur ses fonctions synaptiques. Il a été proposé qu'une diminution de l'expression de Kindline-2 pourrait limiter cette interaction.

Cette hypothèse a été confortée par deux études qui suggèrent qu'une faible expression de Kindline-2 pourrait contribuer au développement de la MA (306,391). En effet, ces études montrent que l'allèle *rs7143400-T*, associé à un risque accru de MA et situé dans la région non traduite en 3' de Kindline-2 (3'-UTR), crée un site de fixation pour le miR-4504. La transfection du miR-4504 a conduit à une réduction de l'expression de Kindline-2 uniquement dans les lignées cellulaires porteuses de l'allèle *rs7143400-T*, par rapport à celles porteuses de l'allèle *rs7143400-G*. Il est également intéressant de noter que l'expression du miARN-4504 est significativement augmentée dans le cerveau des patients atteints de la MA, par rapport aux individus sains (306). Bien qu'une diminution globale de l'expression de Kindline-2 n'ait pas été observée dans le cerveau des patients, il est connu que les miARN peuvent réguler localement l'expression des ARNm dans le compartiment synaptique (392).

De plus, les variants de Kindline-2 associés à une augmentation du risque de MA au niveau de signification à l'échelle du génome, notamment le variant *rs17125924* (tag SNP), font partie d'un *locus* de trait quantitatif d'expression (eQTL), significativement associé à une diminution de l'expression de l'ARNm de Kindline-2 dans le tissu nerveux, selon la base de données Genotype-Tissue Expression Database (393).

Le fait que des variants associés au risque de développer la MA soient également associés à une régulation négative de Kindline-2, suggère que la sous-expression de cette protéine pourrait être délétère et favoriser l'apparition de la maladie.



**Figure 23 :** Les variants associés au risque de développer la MA, notamment les allèles (mineurs) -G et -T des variants *rs17125924* et *rs7143400*, pourraient diminuer l'expression de Kindline-2 chez les individus porteurs. Cette sous-expression de Kindline-2 dans les neurones pourrait altérer le métabolisme de l'APP, augmentant ainsi la production des peptides Aβ et entraînant des perturbations de la plasticité synaptique de manière APP dépendante.



## OBJECTIFS

L'ensemble de ces données laisse supposer que (i) l'interaction de Kindline-2 avec l'APP serait nécessaire au contrôle de son métabolisme et participerait aux mécanismes impliqués dans la plasticité synaptique et que (ii) la perte du complexe Kindline-2 / APP aurait des conséquences néfastes sur la régulation du métabolisme de l'APP et le fonctionnement synaptique.

Ces mécanismes pourraient être initiés par la présence de variants génétiques, tels que le *rs7143400-T* et le *rs17125924-G*, qui pourraient être à l'origine d'une régulation négative de Kindline-2. Cependant, étant donné le rôle central de Kindline-2 dans la régulation des voies impliquant plusieurs facteurs de susceptibilité génétique et de son impact sur le métabolisme de l'APP (Figures 18 et 19), on pense que d'autres mécanismes moléculaires pourraient être impliqués dans le développement de la MA, indépendamment de la présence de ces variants.

De nombreuses questions restent à adresser afin de valider notre hypothèse de travail, notamment comment l'interaction de Kindline-2 avec l'APP régule le métabolisme de l'APP et comment cette interaction est régulée. Dans ce contexte, il est essentiel de comprendre les mécanismes pouvant être à l'origine d'une dérégulation de Kindline-2 pour avoir une compréhension globale de son rôle dans la pathophysiologie de la MA. À cette fin, ma thèse s'articule autour de deux principaux objectifs :

- Le premier objectif de mon projet de thèse est d'identifier les protéases régulant le clivage de la protéine Kindline-2, qui semble être un mécanisme modulant ses fonctions.
- Le deuxième objectif de mon projet de thèse est d'étudier l'impact de l'expression d'autres facteurs de susceptibilité génétique de la MA sur la régulation des fonctions de Kindline-2.

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

## Lignée HEK293-APP<sup>695WT</sup>

Les cellules HEK293 constituent une lignée immortalisée issue de rein embryonnaire humain. Ces cellules ont été précédemment transfectées de manière stable avec l'ADNc de l'APP<sup>695WT</sup> (HEK293-APP<sup>695WT</sup>). Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, Gibco) auquel sont ajoutés 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2mM de L-glutamine (Invitrogen) et 50 U/ml de pénicilline/streptomycine (Invitrogen). La lignée cellulaire est maintenue dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est saturée en humidité et sous 5% de CO<sub>2</sub>. Une fois confluentes et après lavage des flasques (T75) avec du PBS 1X (0.14 M NaCl, 3.3 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), les cellules sont trypsinées (Trypsine-EDTA 0,05%, Invitrogen) pendant 3 min puis diluées au 1/5 pour être ensemencées dans de nouvelles flasques contenant du milieu de culture. Pour réaliser les expérimentations de western blot, les cellules sont ensemencées à raison de 150 000 cellules par puits (plaque 24 puits, Falcon). Lorsque cela est spécifié, les cellules ont été traitées avec l'inhibiteur 10 µM Z-VAD-FMK (Promega) pendant 6 h.

## Souris *FERMT2*<sup>fl/fl</sup> et culture de neurones primaires

Des souris *FERMT2* floxées (*FERMT2*<sup>fl/fl</sup>) (EUCOMM)Wtsi (GSF-EPD0087\_1\_G04-1), qui portent des sites loxP flanquant les exons 5 et 6, ont été obtenues auprès de l'International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC). La souris a été accouplée avec une souris Flp-deleter pour supprimer les cassettes LacZ et neo. Les souris *FERMT2*<sup>fl/+</sup> ont ensuite été intercroisées pour obtenir des souris *FERMT2*<sup>fl/fl</sup>. L'hébergement des animaux et l'expérimentation ont été réalisés conformément aux procédures approuvées par le comité local d'éthique animale selon les normes européennes pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (accord APAFIS#32824-2021120518521661, Lille, France). Les milieux de culture et les suppléments proviennent de ThermoFisher, sauf mention contraire. Les neurones corticaux ont été disséqués à partir de souris *Kindline-2*<sup>fl/fl</sup>, conformément aux procédures décrites précédemment (394,395). Brièvement, les cortex ont été isolés à partir de souris aux stades embryonnaires E14-E15 dans un milieu de dissection froid (solution d'HBSS complétée par 10 mM d'HEPES, 1 mM de pyruvate de sodium,

10 mM de glucose et de la pénicilline/streptomycine) et trypsinés à 37°C pendant 30 min (Trypsine, T4549, Sigma). Au cours de ces 30 min d'incubation, de la DNase I (DN25, Sigma) a été ajoutée à la suspension de tissus afin de dégrader l'ADN et d'éviter l'agglutination des tissus lors de la trituration ultérieure. La trypsine a été inactivée par l'ajout de milieu d'isolement (milieu Neurobasal™ complété par 10% de SVF inactivé, 1% de GlutaMAX, 20 mM d'Hepes et de Gentamycine). La suspension cellulaire a été passée sur des tamis cellulaires de 100 µm puis de 70 µm suivie de deux centrifugations (0,3 × g pendant 10 min). Les cellules ont été remises en suspension dans un milieu de culture composé de MACS Neuro Medium (Miltenyi) supplémenté avec 0,25% de GlutaMAX, 2% de MACS NeuroBrew-21 (Miltenyi) et de Gentamycine, puis comptées. Pour les westerns blots, les cellules ont été ensemencées à une densité de 100 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans des plaques 24 puits, pré-incubées avec 0,1 mg/ml de poly-d-lysine (PDL) dans un tampon borate 0,1 M (0,31% d'acide borique, 0,475% de tétraborate de sodium, pH 8,5 ; Sigma) pendant une nuit à 4°C et rincées avec de l'eau. Pour supprimer l'expression de Kindline-2 spécifiquement dans les neurones, des transductions de vecteurs lentiviraux permettant l'expression de la Cre sous le contrôle du promoteur de la synapsine ont été effectuées à 1 jour *in vitro* (DIV1) à des multiplicités d'infection (MOI) 4 et 6. Brièvement, les lentivirus ont été dilués dans un milieu de culture contenant 4 µg/mL de polybrène (bromure d'hexadiméthrine, Sigma) et ont été ajoutés aux cellules.

Lorsque cela est spécifié, les cellules ont été traitées avec 20 µM d'inhibiteurs ALLN ou ALLM (Sigma-Aldrich), après traitement ou non avec 10 µM de ionomycine (Sigma-Aldrich) pendant 2 h ou 100 µM de glutamate (Fisher Scientific) pendant 6 h.

## **Échantillons *post-mortem* humains**

Les échantillons de cerveau ont été collectés dans le cadre d'un programme de don de cerveau dédié aux démences neurodégénératives et coordonné par le réseau de banques de cerveaux NeuroCEB, comme décrit précédemment (396). En bref, le consentement éclairé pour l'examen *post-mortem* et les études de recherche a été signé par le représentant légal de chaque patient au nom du patient, comme le permet la loi française et approuvé par le comité d'éthique local. La banque de cerveaux a été officiellement autorisée à fournir des échantillons aux scientifiques (accord AC-2013-1887). Toutes les procédures effectuées dans le cadre de cette étude impliquant des participants humains étaient conformes aux normes éthiques des comités de recherche institutionnels et à la Déclaration d'Helsinki de 1964. La banque de cerveaux répond aux critères

de la loi française sur les ressources biologiques, y compris le consentement éclairé, le comité d'éthique et la protection des données (article L1243-4 du Code de la Santé publique, août 2007). La banque de cerveaux Neuro-CEB (BioResource Research Impact Factor number BB-0033-00011) a été déclarée au ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, comme l'exige la loi française. L'évaluation de la pathologie neurofibrillaire liée à la MA (stade Braak) dans des échantillons de tissu cérébral *post-mortem* provenant de 28 personnes (Tableau 4) a été décrite précédemment (396).

Le tampon de lyse, contenant du trizma-base 20 mM, du NaCl 150 mM, un cocktail d'inhibiteurs de protéases 1X (Roche) et 1% de Triton X-100, a été ajouté à des morceaux de tissu cérébral entier (100 mg) à un ratio de 5 µL pour 1 mg de tissu. Les échantillons de cerveau ont été homogénéisés par battage de perles à l'aide d'un kit de lyse et de broyage Precellys (Precellys soft tissue homogenizing CK14) (3 x 30 s à 6500 rpm). Le lysat a ensuite été centrifugé à 4000 rpm pendant 15 min à 4°C. 50 µL du surnageant ont ensuite été utilisés pour l'analyse.

### **Fractionnement synaptique**

Les fractionnements subcellulaires ont été réalisés comme décrit précédemment (397). Brièvement, les neurones corticaux ont été remis en suspension dans un tampon froid contenant 0,32 M de saccharose et 10 mM d'HEPES, pH = 7,4, et ont été centrifugés à 1000 × g pendant 10 min pour éliminer les noyaux et les débris. Pour éliminer la fraction cytosolique, le surnageant a été concentré à 12 000 × g pendant 20 min. Le culot résultant a été remis en suspension dans une deuxième solution (HEPES 4 mM, EDTA 1 mM, pH = 7,4) et a été centrifugé deux fois à 12 000 × g pendant 20 min. Le culot a été incubé dans une troisième solution (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, et 0,5% Triton X-100, pH = 7,2) pendant 1 h à 4 °C et centrifugé à 12 000 × g pendant 20 min pour culotter la fraction synaptosomale. Le surnageant a été recueilli en tant que fraction non-PSD (Triton-sol). Le culot restant a ensuite été solubilisé (20 mM HEPES, 0,15 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% d'acide désoxycholique et 1% de SDS, pH 7,5) pendant 1 h à 4 °C et centrifugé à 10 000 × g pendant 2 h. Le surnageant contient la fraction PSD ou post-synaptique (Triton-insol). Les fractions cytosoliques, non PSD et PSD ont ensuite été analysées par western blot.

### **Western blot et quantification des peptides Aβ**

Les lysats de protéines issus de HEK293-APP<sup>695WT</sup> ou de PNC sont récoltés dans un volume minimum de 100 µL/puits dans des plaques 24 puits, dans un tampon de lyse froid contenant du

1 M Tris pH 7,4, 1,5 M NaCl, 0,1% Nonidet P-40, 10% SDS, 100 mM sodium orthovanadate, 0,5% de sodium désoxycholate et un cocktail d'inhibiteurs de protéase 1X (Roche). Les échantillons sont soniqués puis une quantification des protéines est réalisée à l'aide de la méthode Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Les lysats sont mélangés avec un tampon d'échantillonnage contenant du lithium dodécyl sulfate (LDS) 1X et de l'agent réducteur 1X puis dénaturés à 95°C pendant 10 min. Les protéines (6 µg/puits pour l'échantillon HEK293 et PNC, 50 µg/puits pour les échantillons de cerveau) sont séparées sur des gels Bis-Tris 4-12% pré-coulés, et l'électrophorèse est réalisée en appliquant une tension de 150 V pendant 80 min à l'aide d'un système d'électrophorèse Invitrogen™ XCell SureLock™ avec le tampon de migration NuPAGE® MOPS SDS 1X. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane en nitrocellulose de pores 0,2 µm (Bio-Rad) à l'aide du système de transfert Trans-Blot Turbo. Les membranes sont incubées dans une solution de TNT (0,01 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20, pH 8) contenant 5% de lait pendant 1 h à température ambiante. Puis les membranes sont rincées trois fois pendant 5 min dans du TNT avant d'être incubées avec des anticorps primaires. Ces derniers sont dilués dans du Superblock aux dilutions indiquées dans le tableau 3 et incubés sur la nuit à 4°C. Le lendemain, les membranes sont rincées 3 fois pendant 5 min avec du TNT, puis incubées avec les anticorps secondaires dilués dans du lait à 5% pendant 2 h à température ambiante. Les blots sont révélés à l'aide du kit de détection Amersham ECL Western Blotting (Merck Millipore). La glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ou la β-Actine ont été utilisées comme normalisateur.

Protéine cible	Fournisseur	Référence	Dilution
FERMT2 Cter [9E4]	GeneTex	RRID:AB_10727911	1:1000
APP Cter	Sigma Aldrich	RRID:AB_258409	1:5000
β-actine	Sigma Aldrich	RRID:AB_476692	1:10 000
Src	Cell Signaling	RRID:AB_331137	1:10 000
Phospho-Src (Tyr416)	Cell Signaling	RRID:AB_331697	1:10 000
Cre	Millipore	RRID:AB_2085748	1:1000
GAPDH	Millipore	RRID:AB_10615768	1:10 000
PSD95	Synaptic System	RRID:AB_2619800	1:1000
Synaptophysine 1	Synaptic System	RRID:AB_2622239	1:1000

**Tableau 3 :** Récapitulatif des anticorps utilisés, comprenant les fournisseurs, les références et les dilutions.

Les milieux de culture ont été prélevés pour évaluer les niveaux d'A $\beta$  à l'aide de kits Alpha-LISA (Alpha-LISA Amyloid  $\beta$ 1-X Kit, AL288C, PerkinElmer) conformément aux instructions du fabricant.

### **Proximity Ligation Assay (PLA)**

La technique de PLA est une technique d'immunofluorescence qui permet la détection endogène d'une interaction entre deux protéines, lorsque celles-ci se trouvent à moins de 40 nm. Le PLA a été réalisé en suivant les instructions du fournisseur (Duolink®, Olink Bioscience). Pour cela, les cellules ont été fixées dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 15 min, lavées 3 fois avec du PBS et perméabilisées pendant 5 min avec du Triton X-100 à 0,3%. Les cellules ont ensuite été incubées avec une solution de saturation Duolink® pendant 1 h à 37°C avant d'être incubées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires suivants : Src 1/400 (1/400 ; RRID:AB\_331137), Kindline-2 (1/100 ; RRID:AB\_10727911), Homer1 (1/400 ; RRID:AB\_10549720), MAP2 (1/200 ; RRID:AB\_2619881), Synaptophysine Oysert 488 (1/250 ; RRID:AB\_10890165), APP (1/500 ; RRID:AB\_2832229). Puis les cellules sont incubées avec des anticorps secondaires couplés à des sondes PLA (Duolink® In Situ PLA® Probe anti-Mouse MINUS et anti-Rabbit PLUS, Sigma-Aldrich) dilués au 1/5 dans la solution de saturation pendant 1 h à 37°C. Puis les cellules sont lavées deux fois au PBS 1X et incubées avec une ligase diluée au 1/40 dans la solution DUOLINK Ligation Buffer pendant 30 min à 37°C. Après deux étapes de lavages supplémentaires, une incubation est ensuite réalisée avec une solution d'amplification contenant une polymérase diluée au 1/80 dans la solution DUOLINK Ligation Buffer pendant 2 h à 37°C. Cette technique peut également être couplée à de l'immunofluorescence classique pour la réalisation de contre-marquages en ajoutant les anticorps secondaires couplés à des fluorophores. Pour le contre-marquage, les HEK293-APP<sup>695WT</sup> ont été incubées avec l'anticorps secondaire Alexa Fluor® 488 AffiniPure (1/100 ; RRID:AB\_2340472), et les neurones ont été incubés avec les anticorps secondaires Alexa Fluor® 405 (1/400 ; RRID:AB\_2340616) ou 647 AffiniPure (1/400 ; RRID:AB\_2340476).

### **GST pull-down**

Les protéines de fusion GST (SRC WT ou SRC V177L) ont été purifiées sur des billes magnétiques d'agarose au glutathion Pierce™ d'après les instructions du fabricant (Thermo Scientific™). Pour les expériences de pull-down, des cellules HEK293 ont été lysées avec un mix

contenant de l'Hepes (10 mM, pH 7,4), NaCl (140 mM), 0,5% NP-40, 1% Triton X-100, et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche). Le matériel insoluble a été éliminé par centrifugation par centrifugation à 12 000 rpm pendant 10 min. Le surnageant des lysats cellulaires a été incubé avec les protéines de fusion GST pendant la nuit à 4°C. Les billes ont ensuite été lavées quatre fois avec du tampon de lyse contenant 0,1% de Triton X-100. Les protéines ont été éluées des billes, en chauffant à 95 °C pendant 5 min, avec un tampon d'échantillonnage contenant du DTT puis détectées par Western Blot.

### **Co-immunoprécipitation**

Les lysats cellulaires ont été collectés dans un tampon de co-immunoprécipitation (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, et 0,5% NP-40, pH = 7,4) contenant des inhibiteurs de phosphatase et de protéase (11697498001 et 4906845001 ; Roche). Les échantillons ont été incubés pendant 20 min sur de la glace et centrifugés (12 000×g pendant 10 min). Pour les expériences d'immunoprécipitation, des quantités égales de lysats totaux ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-β-Amyloïde, 17-24 clone 4G8 (RRID: AB\_662812) pendant une nuit à 4 °C. L'immunoprécipitation a été réalisée à l'aide du kit de billes magnétiques Pierce Protein A/G (Thermo Scientific, 88802) selon les instructions du fabricant. Les échantillons contenant des protéines et des complexes d'anticorps ont été incubés avec 40 µL (0,4 mg) de billes magnétiques A/G préalablement lavées avec le tampon de co-immunoprécipitation. Après 2 h d'incubation à 4°C, les billes magnétiques ont été lavées trois fois puis les échantillons ont été traités avec un tampon de chargement (LDS, DTT et agent réducteur) pendant 20 min à température ambiante.

### **Mutagenèse dirigée**

Les variants de SRC (R159W, V177L, V177M et T218P) ont été générés par mutagenèse dirigée à partir d'un plasmide pCMV6-AC-GFP de chez Origene (NM 198291) contenant le cadre ouvert de lecture de la protéine Src WT.

Les amorces oligonucléotidiques utilisées ont été conçues avec le logiciel Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/>).

Variants	Substitution	Amorces	
R159W	CGG en TGG	Anti-sens	5'-gctctgactcccatctggtgatcttgccaaaatacc-3'
		Sens	5'-ggatatttggcaagatcaccagatgggagtcagagc-3'
V177L	GTG en TTG	Anti-sens	5'-gtctcactttctcgcaagaggaaggtccctctc-3'
		Sens	5'-gagagggaccttctcttgcgagaaagtgagac-3'
V177M	GTG en ATG	Anti-sens	5'-gtctcactttctcgcatgaggaaggtccctctc-3'
		Sens	5'-gagagggaccttctctatgcgagaaagtgagac-3'
T218P	ACC en CCC	Anti-sens	5'-ggtgcgggaggggatgtagaagccgcc-3'
		Sens	5'-ggcggcttctacatcccctcccgacc-3'

Le kit *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis* (Agilent) a été utilisé pour la mutagenèse dirigée. Brièvement, les réactions d'amplification ont été réalisées en suivant les instructions du fabricant dans un thermocycleur T-gradient (Biometra), programmé de la façon suivante : 95°C pendant 1 min, 16 cycles à 95°C pendant 50 sec, 60°C pendant 50 sec, et 68°C pendant 10 min, suivi d'un cycle à 68°C pendant 7 min.

Les produits d'amplification sont ensuite traités avec l'enzyme de restriction Dpn I (10U/μL) à 37°C pendant 1 heure, afin de digérer l'ADN double brin parental non muté. Ensuite, 50μL de bactéries compétentes XL1-Blue (Agilent) sont transformées avec 1μL de l'ADN digéré par Dpn I. Pour cela, un choc thermique est appliqué : 30 min sur glace, 45 sec dans un bain marie à 42°C, puis 2 min supplémentaires sur glace, suivi de l'ajout de 500 μL de milieu S.O.C (Thermo Scientific™).

Les bactéries transformées sont ensuite incubées sous agitation 250 rpm à 37°C pendant 1 heure, puis étalées sur des boîtes de pétri contenant de l'agar LB et de l'ampicilline (0,1 mg/ml) avant d'être incubées à 37°C toute la nuit.

Après la transformation bactérienne, une colonie est mise en suspension dans 5 mL de LB Broth complété avec de l'ampicilline (0.1 mg/mL) et incubée sous agitation 250 rpm à 37°C pendant la nuit. Des ampoules de stock de plasmides sont préparées en mélangeant 600 μL de suspension bactérienne avec 400 μL de glycérol à 90%, puis conservées à -80°C. Le reste de la suspension bactérienne est utilisé pour une mini-préparation effectuée à partir du kit NucleoBond® Xtraplasid purification (Macherey-Nagel), afin de purifier les plasmides amplifiés.

La concentration de l'ADN est ensuite mesurée pour vérifier la qualité du plasmide à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDropUV-vis (en ng/μL). Un étalonnage préalable est effectué, suivi de la mesure de 2 μL de chaque échantillon. Les ratios A260/280 et A260/230 sont relevés pour évaluer la pureté des échantillons.



Enfin, un séquençage des plasmides est effectué afin de vérifier l'efficacité de la mutagenèse dirigée et de contrôler l'intégrité de la séquence codante. Le séquençage de l'ADN est réalisé par le prestataire Genoscreen, selon la technologie Sanger (3730XL®, Applied Biosystems®). Les données obtenues sont analysées avec le logiciel MultAlin (Multiple sequence alignment ; <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), permettant l'alignement et la comparaison des fragments des différents ADN séquencés.

## **Analyse statistique**

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel GraphPad Prism version 10.2.2. Les données ont été analysées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney, comme indiqué dans les légendes des figures. Toutes les données sont présentées en tant que moyenne  $\pm$  écart type (SD) d'au moins  $n = 3$  expériences. La signification statistique a été acceptée au niveau de  $p < 0,05$ .

# RÉSULTATS

## Partie 1 : Perte de fonction de Kindline-2 par un clivage de la protéine.

L'une des hypothèses avancées est que la perte de fonction de Kindline-2 pourrait être liée à un clivage de la protéine. Les résultats présentés ci-après sont issus de données en cours de soumission (Annexe 1).

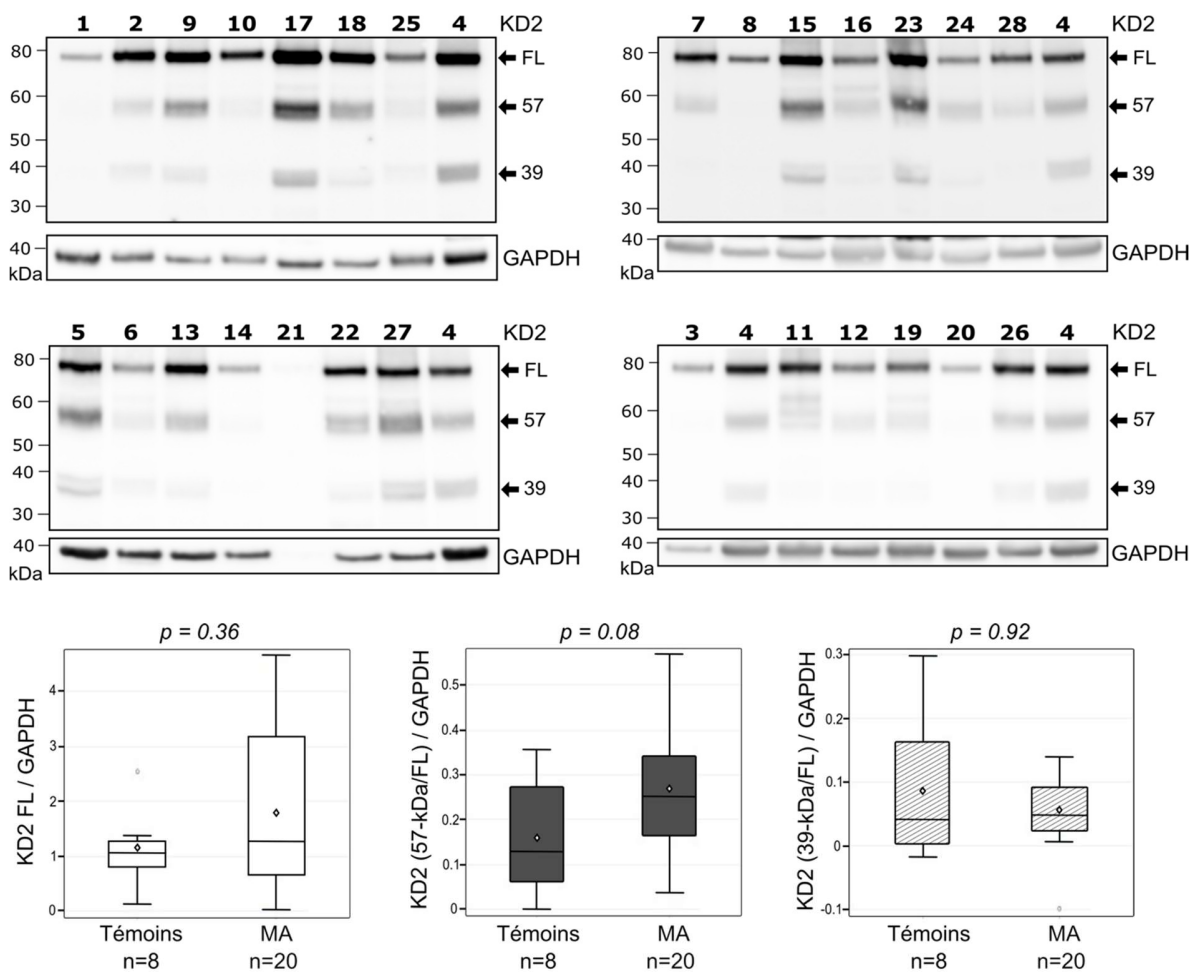
### 1. Identification d'un clivage de la protéine Kindline-2

Grâce à la Biobanque Neuro-CEB, nous avons pu obtenir des extraits de protéines hippocampiques issus de différents échantillons de cerveau humain, comprenant à la fois des individus témoins (n=8) et des patients atteints de la MA (n=20) (Tableau 4).

Individu	Genre	Age de décès	Délai post-mortem (h)	Stade de Braak	Diagnostic neuropathologique
1	F	95	ND	III	Non-MA
2	F	52	29	-	Non-MA
3	F	92	21	I	Non-MA
4	M	82	63	II	Non-MA
5	F	83	21	II	Non-MA
6	F	93	24	III	Non-MA
7	M	69	6	-	Non-MA
8	F	76	28	IV	Non-MA
9	F	48	ND	VI	MA
10	M	57	19	VI	MA
11	F	60	ND	VI	MA
12	M	72	44	VI	MA
13	F	72	5	VI	MA
14	F	78	24	VI	MA
15	M	81	17	VI	MA
16	F	85	31	VI	MA
17	F	100	67	VI	MA
18	M	67	30	VI	MA
19	M	67	ND	VI	MA
20	M	53	ND	VI	MA
21	F	56	26	VI	MA
22	F	70	ND	VI	MA
23	F	72	42	VI	MA
24	M	76	27	VI	MA
25	F	77	48	VI	MA
26	F	81	41	VI	MA
27	F	85	28	VI	MA
28	F	90	24	VI	MA

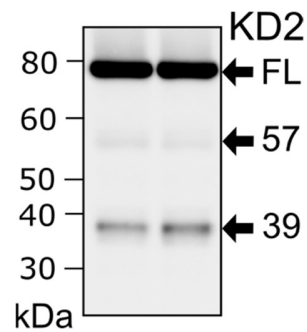
**Tableau 4 :** Détails démographiques de la cohorte neuropathologique. ND : Non déterminé ; MA : Maladie d'Alzheimer.

L'analyse de ces échantillons par western blot a révélé plusieurs bandes non caractérisées dans le profil de mobilité électrophorétique de la protéine Kindline-2, observées tant chez les individus témoins que chez les patients atteints de la MA à différents stades de Braak (Figure 24). L'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'extrémité C-terminale de Kindline-2 a permis d'identifier, en plus de la bande à 75-kDa correspondant à la forme entière de la protéine (ou full-length, FL), deux autres bandes à 57-kDa et 39-kDa. Le faible nombre d'échantillons n'a pas permis de détecter de différence significative dans la présence de ces bandes entre les patients et les témoins (Figure 24).



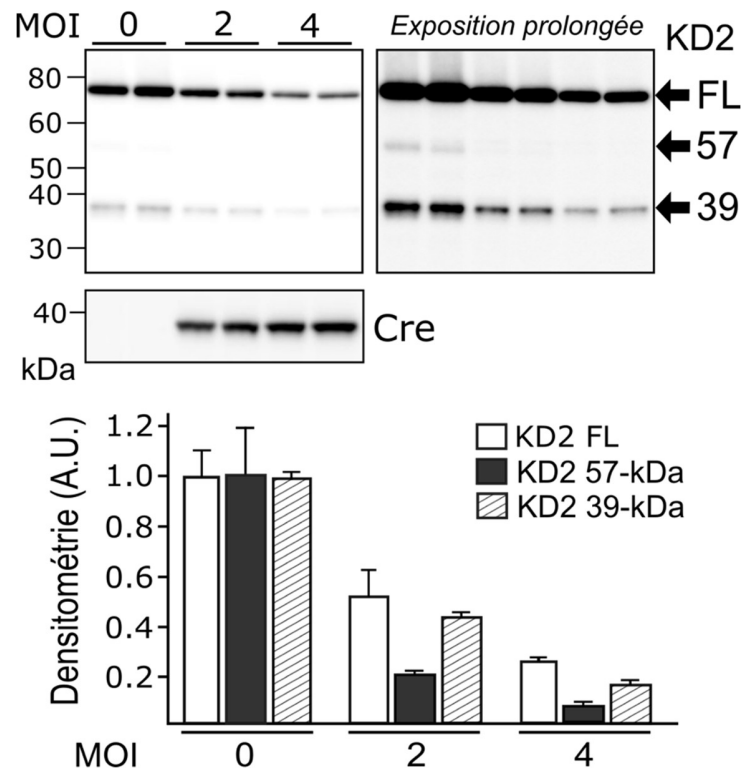
**Figure 24** : Profils électrophorétiques et quantifications de Kindline-2 et de ses fragments dans les extraits de protéines hippocampiques issus des échantillons post-mortem de cerveau de la biobanque Neuro-CEB. Les caractéristiques des individus, représentés par un numéro, sont détaillées dans le tableau 4. Les flèches noires indiquent la protéine Kindline-2 FL ainsi que les bandes à 57-kDa (57) et 39-kDa (39).

Nous avons également observé un profil électrophorétique similaire en utilisant des extraits de protéines provenant de cultures primaires de neurones corticaux de souris (PNC) (Figure 25). Il est intéressant de noter que la bande à 39-kDa apparaît plus abondante dans les PNC, par rapport à la bande à 57-kDa, en comparaison avec les échantillons de cerveau humain.



**Figure 25** : Western Blot d'extraits de protéines de PNC de souris à 21 jours in vitro. Un réplicat est montré. Les flèches noires indiquent la protéine Kindline-2 FL et les bandes à 57-kDa (57) et à 39-kDa (39).

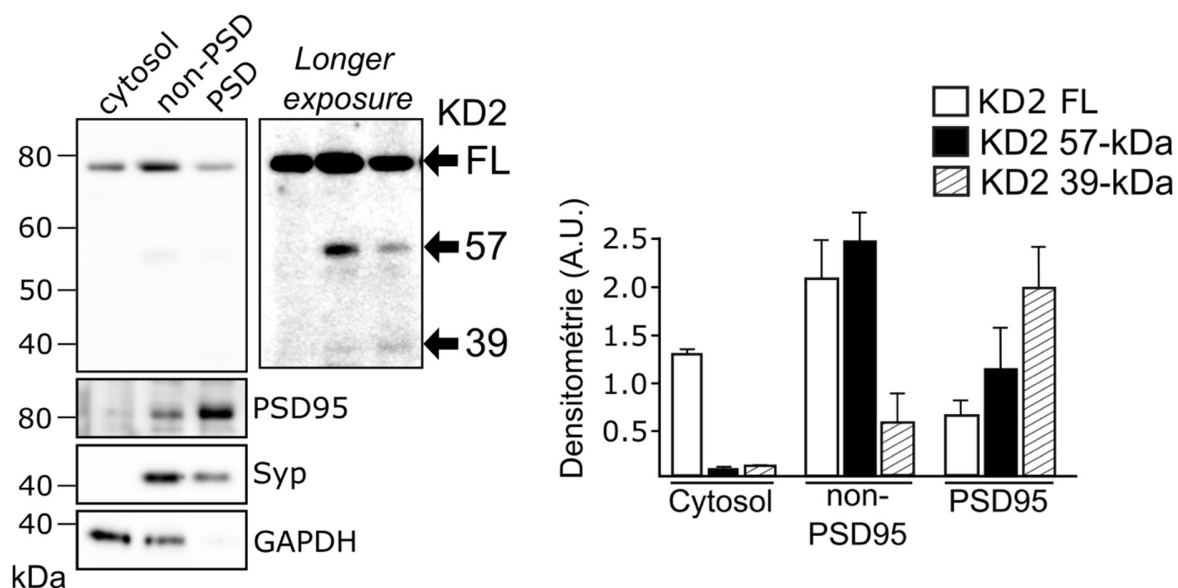
Pour exclure une éventuelle liaison non spécifique de l'anticorps, nous avons vérifié si la présence de ces bandes dépendait du niveau d'expression de Kindline-2. À cette fin, nous avons utilisé un modèle de souris permettant de réaliser un KO conditionnel de Kindline-2 de manière Cre-dépendante. La transduction de lentivirus permettant la surexpression de la Cre a entraîné une diminution dose-dépendante de l'expression de Kindline-2 FL. Les bandes à 57-kDa et 39-kDa ont également diminué en fonction de l'expression de la Cre, ce qui suggère que ces bandes sont spécifiques et que leur identification en tant que sous-produits potentiels du catabolisme de Kindline-2 est valide (Figure 26).



**Figure 26** : Western Blot et quantification montrant l'impact de l'expression de la Cre sur la mobilité électrophorétique de Kindline-2 dans les PNC. Les flèches noires indiquent la protéine Kindline-2 FL, ainsi que les bandes à 57-kDa (57) et à 39-kDa (39).

Puisque le laboratoire a précédemment identifié Kindline-2 comme une protéine synaptique (306), nous avons également cherché la présence potentielle des sous-produits de Kindline-2 dans les purifications de synaptosomes. Nos expériences de fractionnement synaptique montrent la présence des fragments à 57-kDa et 39-kDa dans les compartiments pré- et post-synaptiques, représentés respectivement par les fractions non-PSD et PSD (Figure 27).

Dans l'ensemble, nos données suggèrent que la protéine Kindline-2 subit au moins deux clivages, qui pourraient se produire dans les neurones. Cela implique un rôle potentiel du métabolisme de Kindline-2 dans la régulation de ses fonctions neuronales.

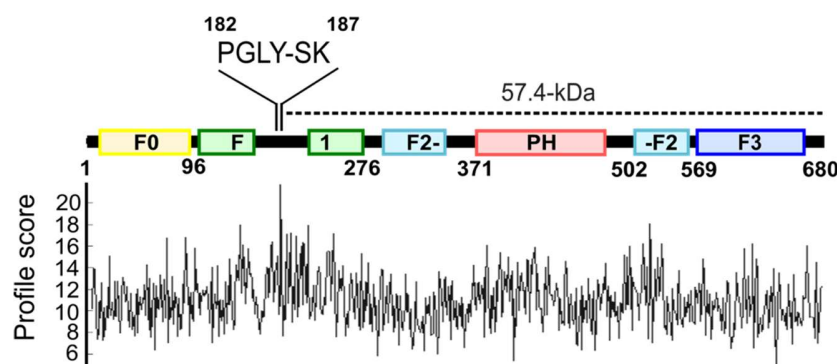


**Figure 27** : Western Blot représentant un fractionnement synaptique à partir de PNC à 21 jours in vitro et quantification montrant la présence des fragments 57-kDa et 39-kDa en fonction des différentes fractions synaptiques. Les anticorps anti-Synapsine (Syn) et anti-PSD95 ont été utilisés comme marqueurs pré et post-synaptiques, respectivement.

## 2. Le fragment de 57-kDa de Kindline-2 est issu du clivage par la calpaïne

Nous avons ensuite cherché à identifier les protéases responsables de la génération des fragments de Kindline-2 à 57-kDa et 39-kDa.

Puisque ces produits de clivage ont été observés dans les compartiments synaptiques, nous avons étudié le rôle potentiel de la calpaïne, une protéase à cystéine bien connue pour sa régulation de la plasticité synaptique de manière dépendante du calcium (398). Pour déterminer si Kindline-2 est un substrat de la calpaïne, nous avons utilisé des outils de prédiction *in silico*, tel que CALPCLEAV, pour identifier les sites potentiels de clivage (Figure 28). Le score de prédiction le plus élevé pour un site de clivage potentiel par la calpaïne a été obtenu entre les acides aminés 182 et 187, ce qui libérerait un fragment de 57,4-kDa, cohérent avec la bande à 57-kDa observée dans nos profils électrophorétiques.

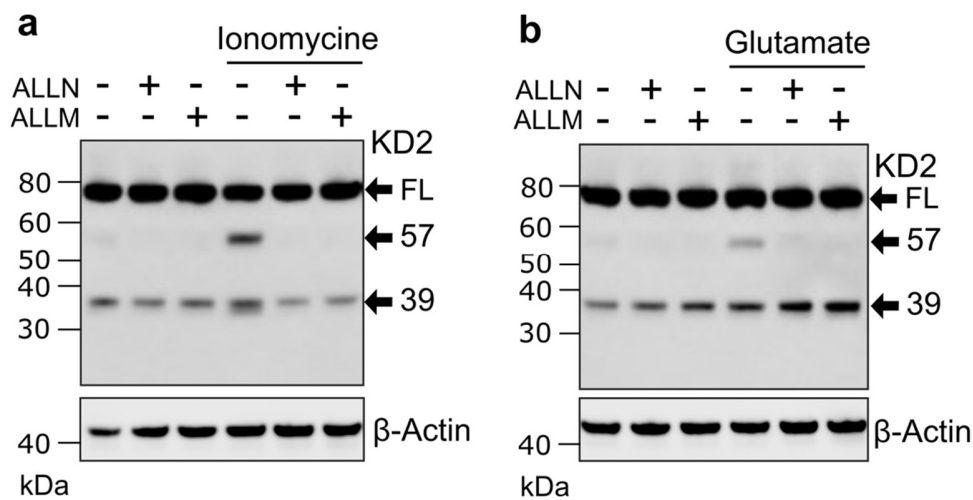


Similarity maxscore	Kindline-2 site	Similarity maxsite	Kindline-2 position	N fragment	C fragment
76.667	PGLY.SK	PSLFSK	182 to 187	21.3 kDa	57.4 kDa
60.714	KKLT.LK	KKLTQS	385 to 390	44.1 kDa	34.6 kDa
59.259	EESS.GT	EKSAAT	411 to 416	47.2 kDa	31.5 kDa
53.846	SEDE.AL	AEIEAI	159 to 164	19.0 kDa	59.7 kDa
53.571	LSTR.AK	LSTFAQ	663 to 668	76.2 kDa	2.5 kDa
46.154	KENE.AL	AEIEAI	265 to 270	30.2 kDa	48.4 kDa
40	EALE.LE	EGTESE	162 to 167	19.3 kDa	59.4 kDa
30	EELS.LL	RELGLG	136 to 141	16.2 kDa	62.4 kDa

**Figure 28** : Schéma de la structure de Kindline-2 et les scores de clivage par la calpaïne obtenus via l'outil CALPCLEAV (<https://calpcleav.szilab.org/>). Le tableau représente les prédictions de sites de clivage par la calpaïne fournies par l'outil <https://www.dnbr.ugent.be/prx/bioit2-public/SitePrediction/>. Le site consensus de la calpaïne (PGLY-SK) présente le score le plus élevé.

Pour confirmer l'implication de la calpaïne dans la production du fragment de 57-kDa, nous avons tout d'abord induit l'activation de la calpaïne dans des cultures primaires neuronales murines en les traitant avec de l'ionomycine, un ionophore calcique qui permet d'induire un influx de calcium. Ce traitement a conduit à une forte accumulation de la bande à 57-kDa (Figure 29a). Cette accumulation a été complètement abolie lorsque les cultures neuronales ont été prétraitées avec les inhibiteurs spécifiques de la calpaïne, ALLN ou ALLM (Figure 29a).

En parallèle, nous avons cherché à induire l'activation de la calpaïne dans le même modèle cellulaire mais cette fois-ci dans un contexte de toxicité due au glutamate. Une sécrétion excessive de glutamate provoque une excitotoxicité, un phénomène associé à divers troubles neurodégénératifs, y compris la MA. Cette excitotoxicité est en partie due à la suractivation des calpaïnes (398). Après l'ajout de glutamate, nous avons observé la génération du fragment de 57-kDa, dont l'apparition a été inhibée par un prétraitement avec les inhibiteurs ALLN ou ALLM (Figure 29b).



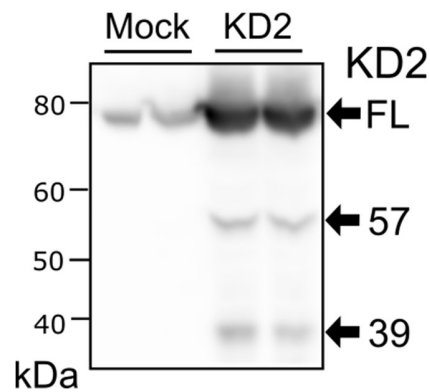
**Figure 29** : Western Blots montrant l'impact du prétraitement avec les inhibiteurs de la calpaïne (ALLN ou ALLM) (20  $\mu$ M ; 30 min) sur la mobilité électrophorétique de Kindline-2, après traitement des neurones primaires avec de (a) l'ionomycine (10  $\mu$ M ; 2 h) ou (b) de glutamate (100  $\mu$ M ; 6 h).

Ces résultats ont permis de confirmer le rôle de la calpaïne dans le clivage de Kindline-2, menant à la production du fragment de 57-kDa. En revanche, la modulation de l'activité de la calpaïne n'a eu aucun effet sur la génération du fragment de 39-kDa, suggérant que d'autres protéases pourraient être impliquées dans l'ensemble du profil électrophorétique de Kindline-2.

### **3. Le fragment de 39-kDa de Kindline-2 est généré par le clivage des caspases**

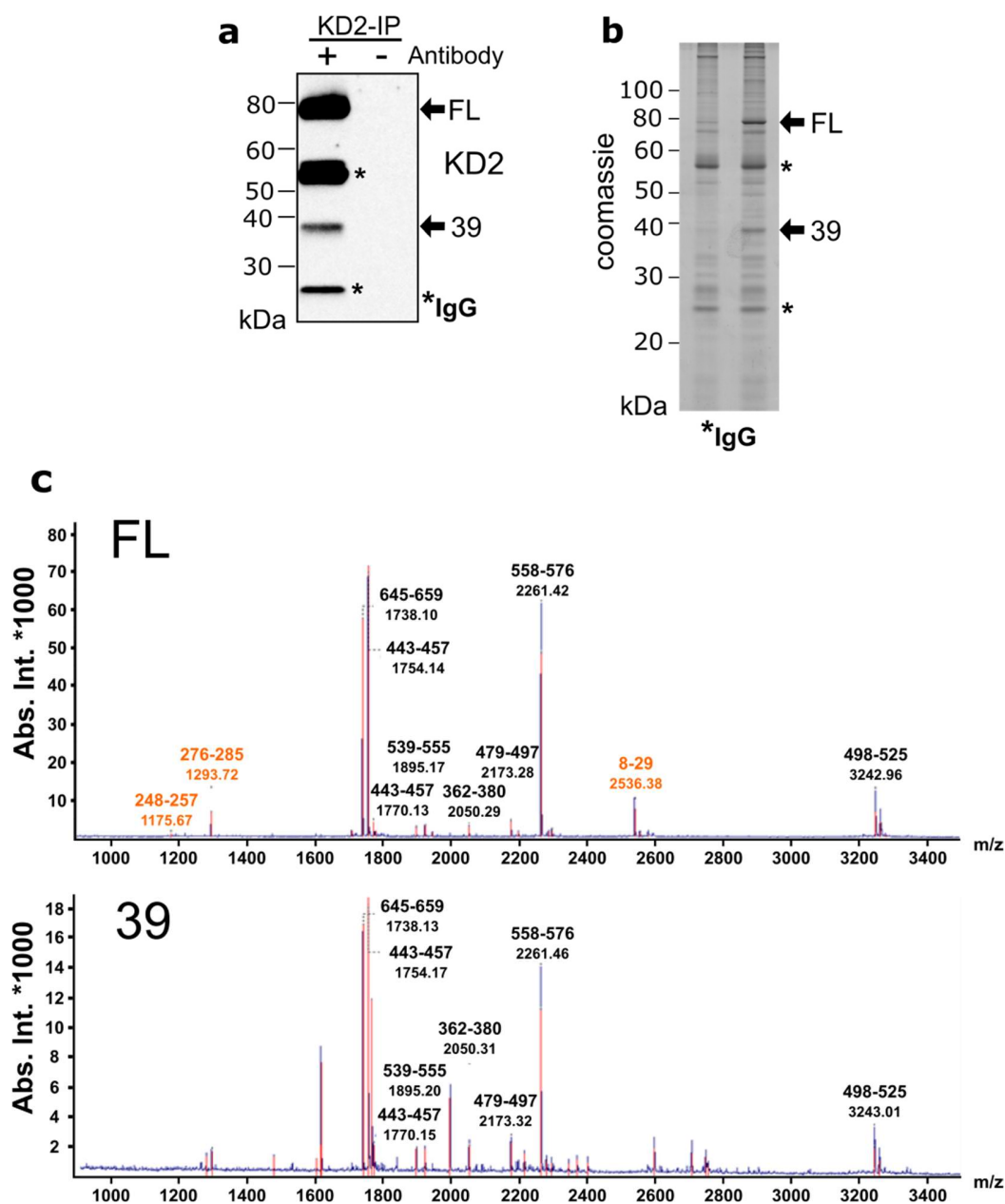
Pour explorer l'implication d'autres protéases dans le métabolisme de Kindline-2, nous avons utilisé la lignée cellulaire HEK293-APP<sup>695WT</sup>, déjà employée pour analyser l'impact de Kindline-2 sur le métabolisme de l'APP (241). En effet, la surexpression de Kindline-2 dans les cellules HEK293 a révélé un profil de mobilité électrophorétique similaire à celui observé dans les cultures primaires neuronales, indiquant que ces cellules disposent de la machinerie cellulaire nécessaire au métabolisme de Kindline-2 (Figure 30).





**Figure 30** : Western blot d'extraits de cellules HEK293-APP<sup>695WT</sup> transfectées avec l'ADNc de Kindline-2 (KD2) ou un vecteur vide (Mock).

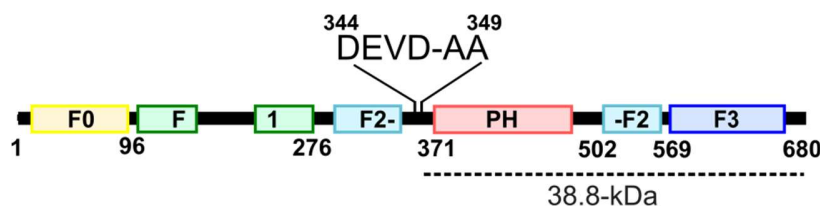
Nous avons cherché à comparer le spectre de masse de la protéine Kindline-2 FL avec ceux de ses produits de clivage afin d'identifier les sites potentiels de coupure. Pour cela, nous avons effectué une immunoprécipitation pour concentrer la protéine Kindline-2 et ses fragments (Figure 31a). Une coloration du gel d'électrophorèse au bleu de Coomassie a été réalisée pour pouvoir les isoler pour une analyse par spectrométrie de masse (Figure 31b). Bien que le fragment de 57-kDa de Kindline-2 ait été trop proche de l'IgG pour être isolé, nous avons pu purifier le fragment de 39-kDa et le comparer à la forme FL via la spectrométrie de masse (Figure 31c).



**Figure 31 :** **a.** Immunoprécipitation d'extraits de cellules HEK293-APP<sup>695WT</sup> surexprimant Kindline-2 en utilisant un anticorps anti-Kindline-2. **b.** Coloration du gel d'électrophorèse au bleu de coomassie, montrant les extraits immunoprécipités avant l'isolation des bandes Kindline-2 FL et 39-kDa pour l'analyse par spectrométrie de masse. **c.** Spectres de masse de Kindline-2 FL ou du fragment de 39-kDa isolés. Les peptides identifiés uniquement pour Kindline-2 FL sont indiqués en orange.

L'analyse par spectrométrie de masse a confirmé que le fragment de 39-kDa correspond à la partie C-terminale de Kindline-2. En comparant les deux spectres, nous avons pu cartographier un site de clivage potentiel entre les acides aminés 286 et 361. Nous avons ensuite utilisé des outils de prédiction *in silico*, tels que PeptideCutter, pour identifier les protéases susceptibles de

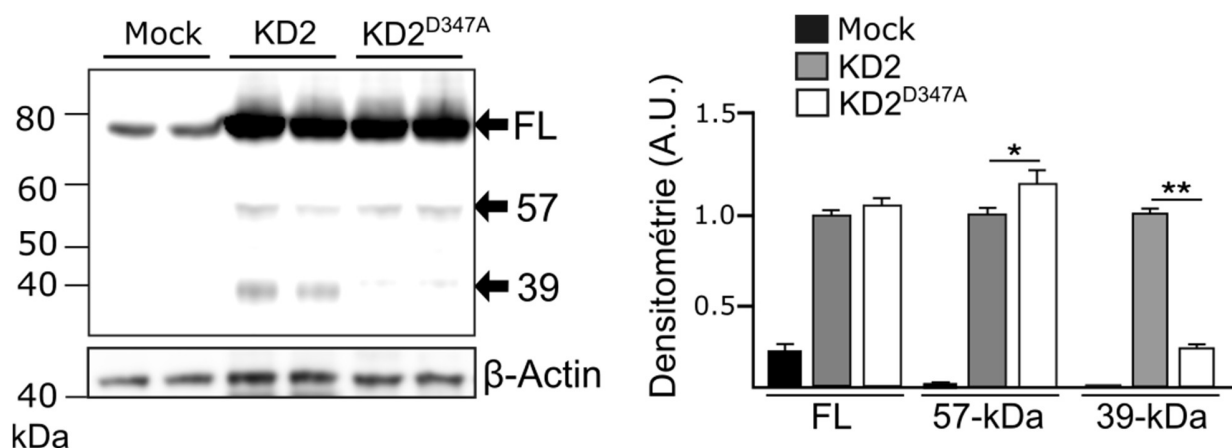
cliver Kindline-2 au niveau de la séquence identifiée. Ces outils nous ont permis d'identifier un site consensus conservé (DEVD-AA), entre les acides aminés 344 et 349, reconnu par les caspases. Ce site de coupure générerait un fragment de 38,8-kDa, en accord avec notre profil électrophorétique (Figure 32).



Similarity maxscore	Kindline-2 site	Similarity maxsite	Kindline-2 position	N fragment	C fragment
72.414	DEVD.AA	DELDAI	344 to 349	39.7 kDa	38.1 kDa
69.697	DAHD.GS	DAQDGN	194 to 199	22.6 kDa	55.2 kDa
64.516	MALD.GI	MDIDGV	1 to 6	0.4 kDa	77.4 kDa
51.613	TEVD.CK	EEVDGK	639 to 644	73.4 kDa	4.4 kDa
48.276	HVTD.LN	STTDLT	23 to 28	2.8 kDa	75 kDa
46.667	DEVR.LS	DETDLA	630 to 635	72.4 kDa	5.4 kDa
59.259	STGD.AI	SESDAV	599 to 604	68.6 kDa	9.3 kDa
50	PTYD.AH	DEYDGH	191 to 196	22.3 kDa	55.5 kDa

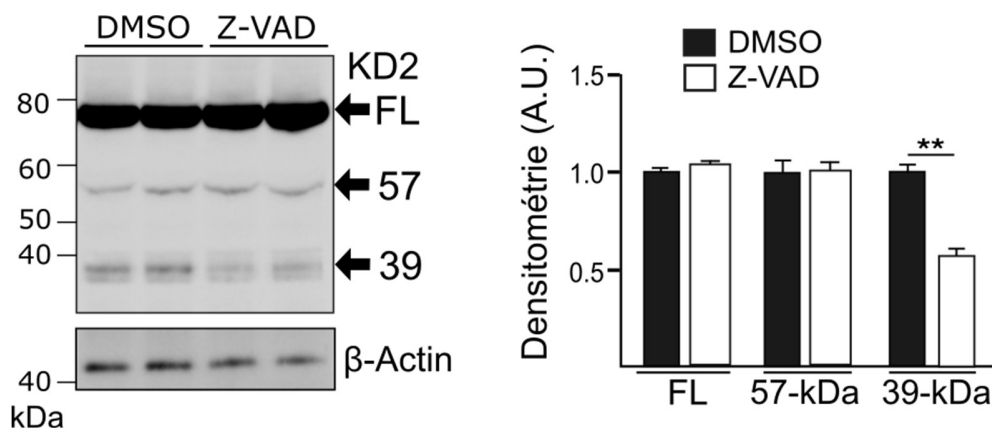
**Figure 32** : Schéma de la structure de Kindline-2 et prédictions des sites de clivage par les caspases fournies par l'outil <https://www.dnbr.ugent.be/prx/bioit2-public/SitePrediction/>. Le site consensus de la caspase (DEVD-AA) présente le score le plus élevé.

Pour valider cette hypothèse, nous avons muté le résidu aspartate de Kindline-2 en position 347 en alanine (D347A) et surexprimé ce mutant dans les cellules HEK293-APP<sup>695WT</sup>. Comparé à la surexpression de la protéine Kindline-2 de type sauvage (WT), la surexpression du mutant D347A a significativement réduit la génération du fragment de 39-kDa, sans affecter la production du fragment de 57-kDa (Figure 33).



**Figure 33** : Western blot des lysats de cellules HEK293-APP<sup>695WT</sup> transfectées avec l'ADNc de Kindline-2 WT (KD2), Kindline-2 avec la mutation D347A (KD2<sup>D347A</sup>) ou un vecteur vide (Mock). L'analyse densitométrique des niveaux du FL, 57-kDa et 39-kDa a été réalisée à partir de trois expériences indépendantes. Les histogrammes montrent la moyenne  $\pm$  SD. a.u., unités arbitraires. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.01$ .

Pour confirmer que le clivage de Kindline-2 est dépendant des caspases, nous avons surexprimé Kindline-2 WT dans des cellules HEK293-APP<sup>695WT</sup> et les avons traitées avec un inhibiteur pan-caspase (Z-VAD-FMK). L'inhibition des caspases a significativement réduit la production du fragment de 39-kDa, sans impacter la génération du fragment de 57-kDa (Figure 34).



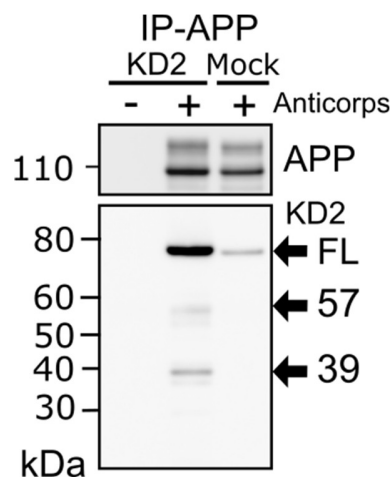
**Figure 34** : Western blot des lysats de cellules HEK293-APP<sup>695WT</sup> traitées avec l'inhibiteur Z-VAD-FMK (10  $\mu$ M, 6 h) ou du DMSO. L'analyse densitométrique des niveaux de FL, 57-kDa et 39-kDa a été réalisée à partir de trois expériences indépendantes. Les histogrammes indiquent la moyenne  $\pm$  SD. a.u., unités arbitraires. \*  $p < 0.05$ .

Ces résultats démontrent que Kindline-2 est également un substrat des caspases, suggérant que Kindline-2 pourrait fonctionner comme une protéine adaptatrice régulée par deux mécanismes indépendants : un clivage médié par les caspases et un autre médié par les calpaïnes.

#### 4. Impact du clivage de Kindline-2 sur le métabolisme de l'APP

Le laboratoire a récemment démontré l'existence d'une interaction directe entre le domaine F3 C-terminal de Kindline-2 et le motif YENPTY de la queue cytosolique de l'APP (306). Nous avons donc voulu évaluer l'impact des deux clivages précédemment identifiés sur la capacité de Kindline-2 à interagir avec l'APP. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation à partir d'extraits protéiques de cellules HEK293-APP<sup>695WT</sup> surexprimant (ou non) la protéine Kindline-2 WT.

Comme attendu, la forme Kindline-2 FL a co-immunoprécipité avec l'APP (Figure 35). De plus, les fragments 57-kDa et 39-kDa ont également co-immunoprécipité avec l'APP, suggérant que les produits de clivage de Kindline-2 conservent leur capacité d'interaction avec l'APP.



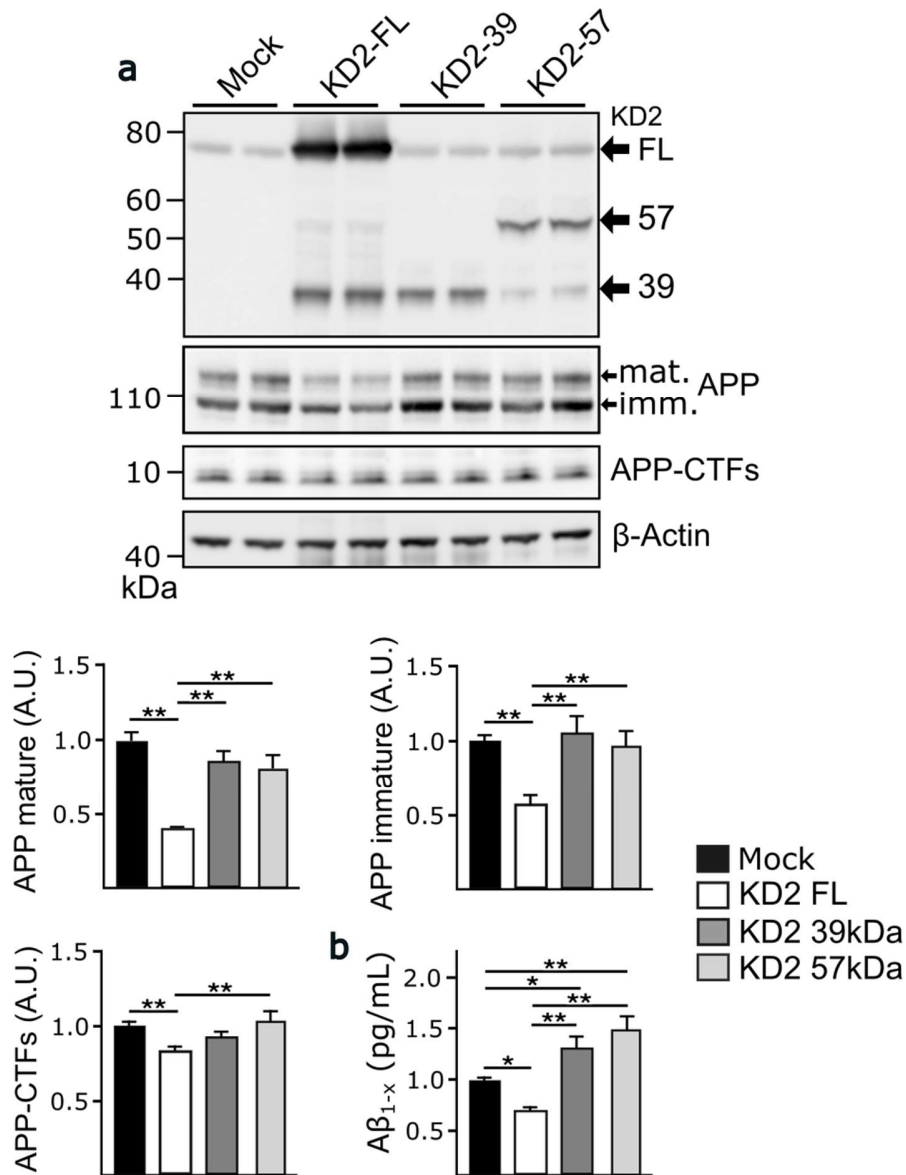
**Figure 35 :** Immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps anti-APP sur des extraits protéiques de cellules HEK293-APP<sup>695WT</sup> transfectées avec l'ADNc de Kindline-2 (KD2) ou un vecteur vide (Mock).

Étant donné que le laboratoire a précédemment montré que Kindline-2 pouvait réguler la dégradation de l'APP en contrôlant la quantité d'APP mature à la surface cellulaire, nous avons étudié l'impact des clivages de Kindline-2 sur cette régulation. Pour ce faire, nous avons généré des constructions permettant la surexpression des fragments de Kindline-2 de 57-kDa (57 C-ter) et 39-kDa (39 C-ter).

Dans un premier temps, la surexpression de Kindline-2 FL a entraîné une réduction des niveaux d'APP mature et immature, ainsi que de ses métabolites, les fragments C-terminaux (CTFs) et les peptides A $\beta$  dans les cellules HEK293-APP<sup>695WT</sup> (Figure 36a,b), ce qui corrobore les résultats antérieurs (241). En revanche, la surexpression des fragments de 57-kDa ou de 39-kDa n'a eu aucun impact sur le métabolisme de l'APP, que ce soit sur l'APP mature, l'APP immature ou les CTFs.

Cependant, nous avons noté un effet dominant négatif de la surexpression de ces fragments sur les niveaux de peptides A $\beta$  dans le milieu de culture (Figure 36b), une augmentation comparable à celle observée lors de la sous-expression de Kindline-2, comme précédemment rapporté (241).

Il est intéressant de noter que la surexpression du fragment de 57-kDa a également conduit à la production du fragment de 39-kDa, ce qui suggère que le clivage par la calpaïne pourrait précéder un clivage par les caspases.

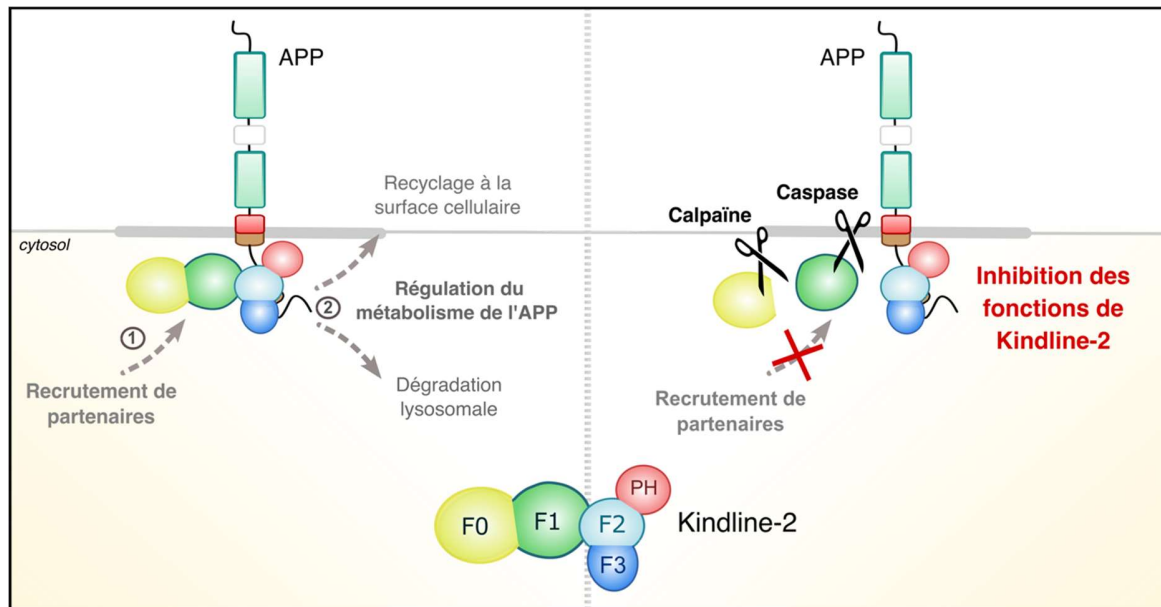


**Figure 36 : Impact de la surexpression des fragments de Kindline-2 sur le métabolisme de l'APP.**

**a.** Western Blot montrant les niveaux de Kindline-2 (KD2) et d'APP dans les lysats de cellules HEK293-APP<sup>695WT</sup> transfectées avec des ADNc permettant l'expression de Kindline-2 FL (KD2-FL), Kindline-2<sup>197-680aa</sup> (KD2-57) ou Kindline-2<sup>348-680aa</sup> (KD2-39) ou un vecteur vide ; et analyse densitométrique de l'APP mature (mat.), immature (imm.) et des CTFs. **b.** Analyse par alpha-lisa des niveaux d'Aβ<sub>1-x</sub> dans le milieu de culture. Statistiques réalisées à partir de trois expériences indépendantes. Les histogrammes indiquent la moyenne ± SD. a.u., unités arbitraires. \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01.

## 5. Conclusion intermédiaire

L'ensemble de ces résultats indiquent que la protéine Kindline-2 est un substrat pour les protéases calpaïne et caspase. Les fragments générés par ces clivages semblent conserver leur capacité à interagir avec l'APP mais perdre en revanche la capacité de réguler son métabolisme. Les calpaïnes et les caspases jouent un rôle clé dans la régulation de la plasticité synaptique, et leur activité est souvent dérégulée dans le contexte de la MA. Nous formulons l'hypothèse que l'augmentation des clivages de Kindline-2 observée dans ce contexte pourrait entraîner une perte de fonction de Kindline-2, favorisant ainsi la dérégulation du métabolisme de l'APP et les dysfonctionnements synaptiques de manière dépendante de l'APP.



**Figure 37 :** Illustration de la régulation du métabolisme de l'APP par Kindline-2 et de l'impact des clivages de Kindline-2 sur ses fonctions.



## **Partie 2 : Perte de fonction de Kindline-2 due à d'autres facteurs de susceptibilité génétique.**

L'une des autres hypothèses est que la perte de fonction de Kindline-2 pourrait être induite par l'action d'autres facteurs de susceptibilité génétique de la MA. Les résultats suivants proviennent de données qui feront l'objet d'un second article, actuellement en préparation.

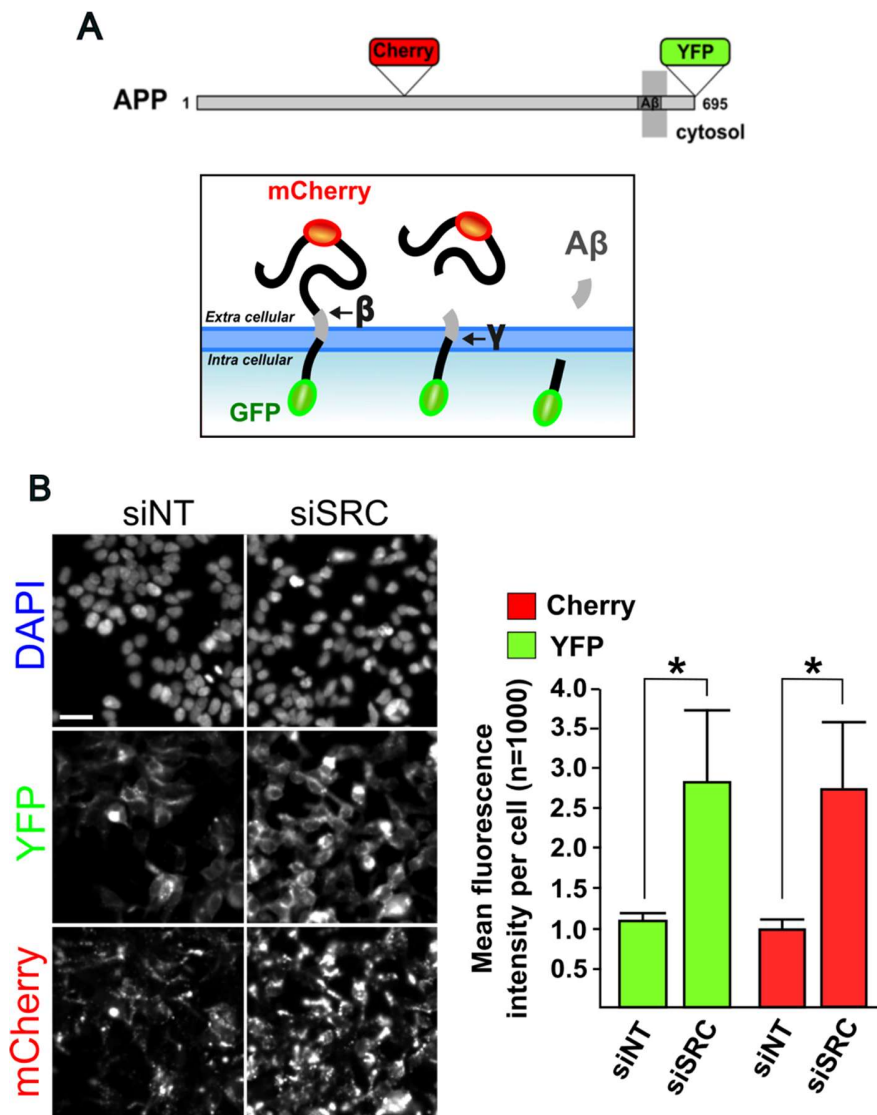
### **1. Kindline-2 régule le métabolisme de l'APP de manière Src dépendante**

Précédemment, nous avons montré que la protéine Kindline-2 est un substrat pour deux protéases : la calpaïne, qui clive Kindline-2 dans son domaine F1, et la caspase, qui clive dans le domaine F2. Les fragments N-terminaux de Kindline-2 issus de ces clivages conservent leur capacité à interagir avec l'APP, mais semblent perdre la capacité de Kindline-2 à réguler son métabolisme.

Kindline-2 est une protéine adaptatrice cruciale pour l'activation des intégrines. Elle est impliquée dans la formation de complexes protéiques essentiels à l'adhésion cellulaire (252), et de nombreux partenaires d'interaction ont déjà été décrits (325,330,332,333,343,354).

Nous émettons l'hypothèse que les clivages que nous avons identifiés pourraient inhiber les fonctions de Kindline-2 en limitant sa capacité à recruter des partenaires via ses domaines F0 et F1, qui sont impliqués dans la régulation du métabolisme de l'APP (Figure 37).

Nous avons donc examiné les interactions de Kindline-2 avec ses partenaires connus, dont plusieurs sont codés par des gènes identifiés comme facteurs de susceptibilité génétique pour la MA (Figure 18). Parmi ces partenaires, la protéine Src, connue pour contrôler l'adhésion cellulaire par son interaction avec Kindline-2, a retenu notre attention. En effet, le criblage à haut contenu réalisé précédemment dans notre laboratoire a montré que Src figure parmi les 5 % de gènes ayant le plus grand impact sur le métabolisme de l'APP à l'échelle du génome (Figure 38) (241). Nous avons constaté que l'inhibition de Src reproduit les effets observés lors de la sous-expression de Kindline-2 sur le métabolisme de l'APP, à savoir une augmentation des métabolites de l'APP. Ces résultats suggèrent que la régulation du métabolisme de l'APP par Kindline-2 pourrait dépendre de l'activité de Src.



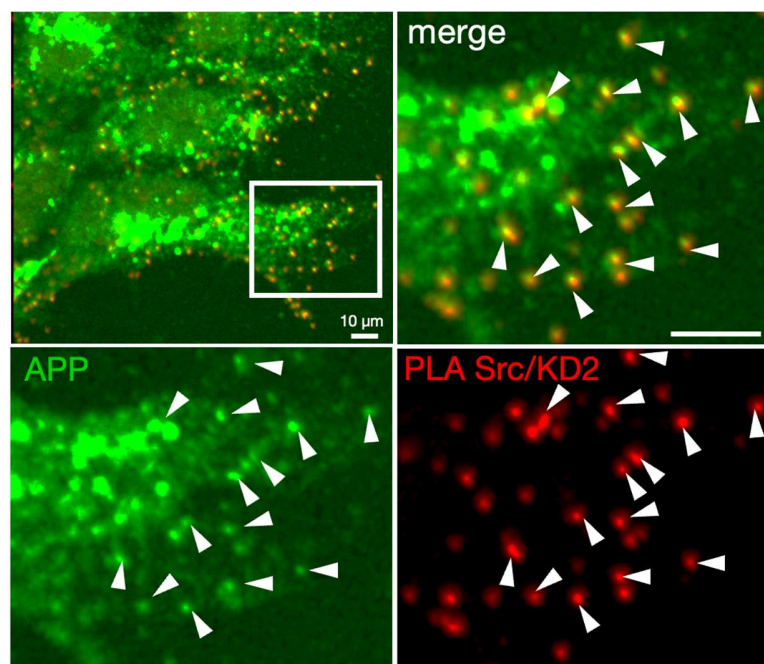
**Figure 38 : Criblage siRNA à haut contenu identifiant des modulateurs du métabolisme de l'APP.**

**A.** Schéma de l'APP montrant les points d'insertion des protéines fluorescentes (mCherry et YFP). **B.** Images de microscopie à fluorescence montrant l'effet de la transfection de siRNA (siNT ou siSrc) sur les signaux mCherry et YFP. Échelle 100  $\mu$ m. Les quantifications représentent l'intensité de fluorescence moyenne relative des signaux mCherry et YFP par cellule après transfection. Les histogrammes indiquent la moyenne  $\pm$  SD, \*p < 0,05, test non paramétrique, d'après Chapuis et al. 2017 (241).

La protéine Src est exprimée de manière ubiquitaire, mais son expression prédomine dans le cerveau, en particulier dans les neurones (399,400). Elle est composée trois domaines : le domaine SH1 ou domaine kinase ; le domaine SH2, impliqué dans la reconnaissance des tyrosines phosphorylées ainsi que les interactions inter- et intramoléculaires ; et le domaine SH3,

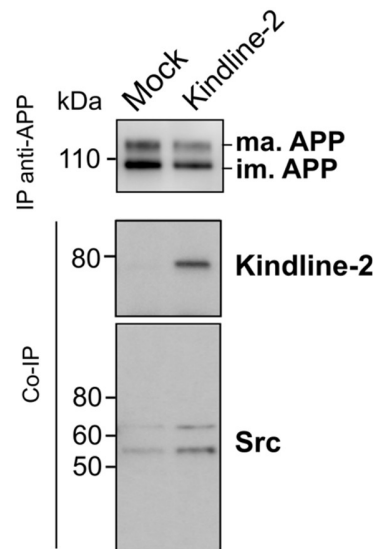
qui joue un rôle dans la reconnaissance des substrats, la localisation membranaire et la régulation de l'activité kinase (401,402).

Il est bien établi que Src interagit avec les domaines F0/F1 de Kindline-2 via son domaine SH2 (325,360). Cette interaction est cruciale pour l'activation des intégrines par Kindline-2. Puisque que notre laboratoire a montré l'existence d'un complexe entre Kindline-2 et l'APP, nous avons cherché à déterminer si Src pouvait être recrutée au sein de ce complexe. Tout d'abord, cette interaction a été suggérée par des expériences de PLA (Proximity Ligation Assay) dans les cellules HEK293-APP<sup>695WT</sup> (Figure 39).



**Figure 39** : Localisation des points de PLA entre Kindline-2 et Src endogènes dans les cellules HEK293-APP<sup>695WT</sup>. Un contre marquage pour l'APP a été réalisé par immunofluorescence.

Ensuite, nous avons cherché à valider la formation d'un complexe potentiel entre les trois protéines en utilisant la technique de co-immunoprécipitation. Pour cela, l'ADNc correspondant à Kindline-2 WT a été exprimé dans la lignée cellulaire HEK293-APP<sup>695WT</sup>, et une co-immunoprécipitation dirigée contre l'APP a été réalisée. Lorsque l'APP est précipitée à l'aide d'un anticorps, nous observons que la surexpression de Kindline-2 entraîne une augmentation du recrutement de Src au niveau de l'APP (Figure 40). Ces résultats suggèrent que Kindline-2 est capable de recruter Src au sein du complexe Kindline-2 / APP.

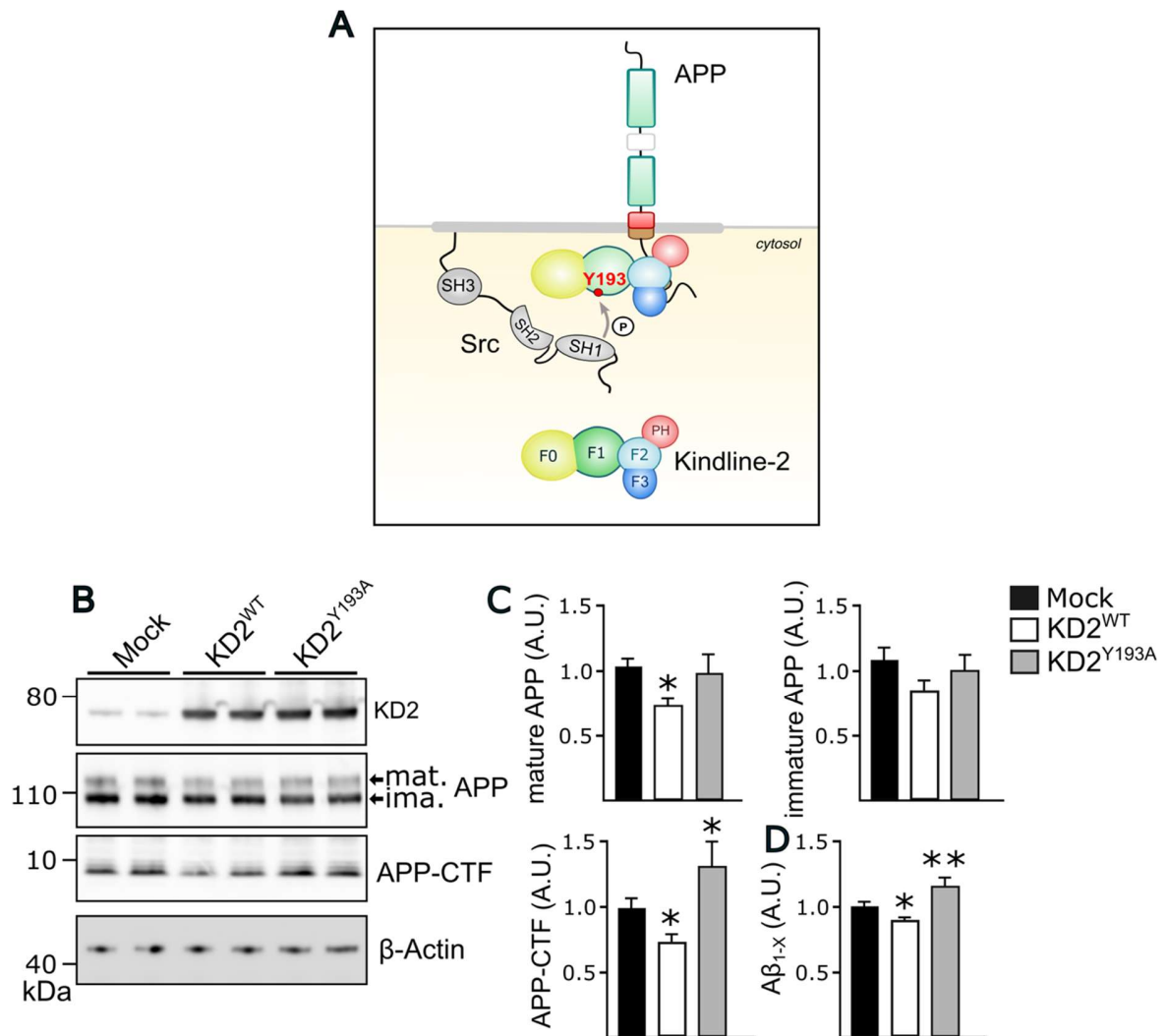


**Figure 40** : Co-immunoprécipitation entre l'APP endogène et Src à partir d'extraits de HEK293-APP<sup>695WT</sup>.

Kindline-2 est une protéine phosphorylée, et parmi ses nombreux sites de phosphorylation potentiels, la tyrosine en position 193 (Y193) semble jouer un rôle clé dans la régulation de son activité. En effet, l'interaction entre Kindline-2 et les intégrines dépend de la phosphorylation de la Y193 par Src, ce qui favorise l'interaction de Kindline-2 avec ses partenaires ainsi que l'activation de la signalisation des intégrines (325,360).

Puisque nos résultats suggèrent l'existence d'un complexe formé par les protéines APP, Kindline-2 et Src, nous avons exploré l'influence de la phosphorylation de la Y193 de Kindline-2 par Src sur la régulation du métabolisme de l'APP (Figure 41A). Pour tester cette hypothèse, nous avons généré un mutant de Kindline-2 phosphodéficient en mutant la tyrosine 193 en alanine (Y193A). Nous avons ensuite évalué l'effet de cette mutation sur le métabolisme de l'APP dans le modèle HEK293-APP<sup>695WT</sup>.

Tout d'abord, nos résultats montrent que la surexpression de Kindline-2 WT entraîne une diminution des niveaux d'APP mature, des CTFs ainsi que des peptides A $\beta$  (Figure 41B,C), ce qui concorde avec les études précédentes (241,306). Cependant, cet effet est aboli lorsque le mutant phosphodéficient de Kindline-2 est surexprimé, suggérant que la phosphorylation de la Y193 est importante pour la régulation du métabolisme de l'APP par Kindline-2. Étant donné que cette tyrosine est connue pour être phosphorylée par Src, nous pouvons émettre l'hypothèse que la régulation du métabolisme de l'APP par Kindline-2 est dépendante de l'activité de Src.



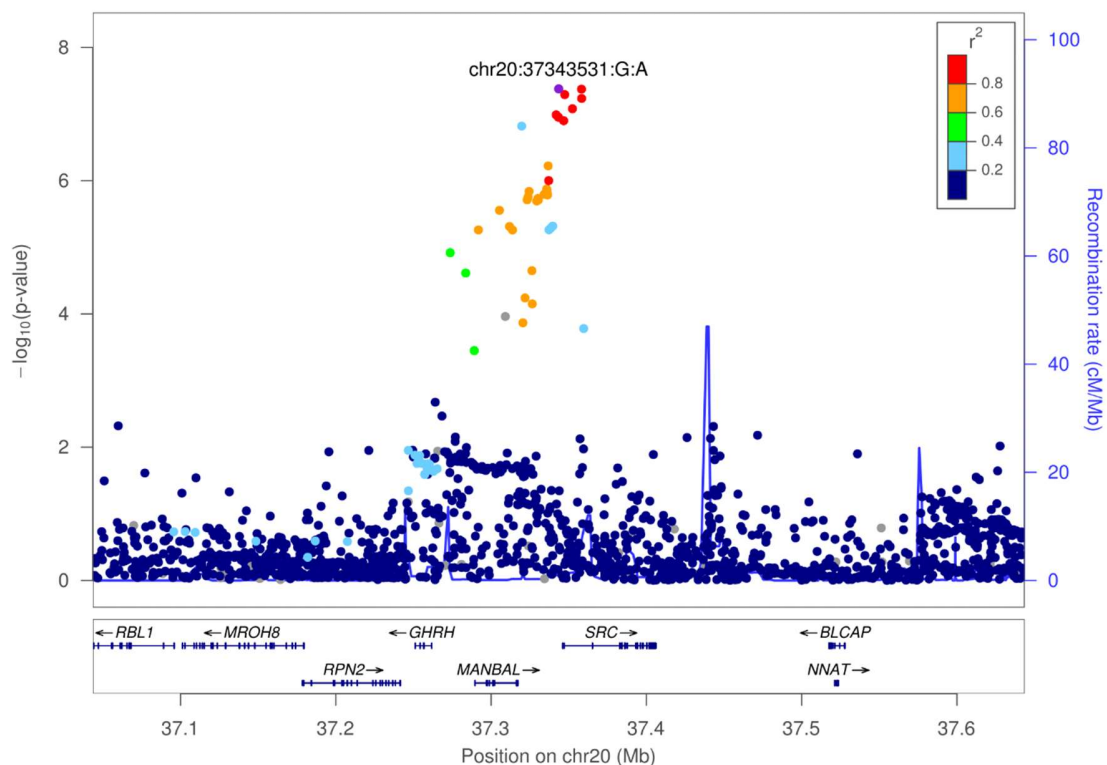
**Figure 41** : **A**. Représentation du complexe APP / Kindline-2 / Src. **B**. Impact de la surexpression de Kindline-2 WT (KD2<sup>WT</sup>), Kindline-2<sup>Y193A</sup> (KD2<sup>Y193A</sup>) ou d'un vecteur vide (Mock) sur le métabolisme de l'APP dans des cellules HEK293-APP<sup>695WT</sup>. **C**. Analyse densitométrique de l'APP mature (mat.), immature (ima.) et des CTFs **D**. Analyse par alpha-lisa des niveaux d'Aβ<sub>1-x</sub> dans le milieu de culture. Les quantifications ont été réalisées à partir de 3 expériences indépendantes. Les histogrammes indiquent la moyenne ± SD. a.u., unités arbitraires. \* p < 0,05 ; \*\* p < 0,01.

## 2. Identification de variants de Src associés au risque de MA.

### 2.1. Src, un nouveau facteur de risque génétique pour la MA

Puisque Src semble jouer un rôle clé dans la régulation de l'activité de Kindline-2, en lien avec le métabolisme de l'APP, nous avons vérifié s'il existait des variants génétiques de *SRC* associés au risque de développer la MA.

Le laboratoire a réalisé la plus vaste méta-analyse européenne de GWAS, en collaboration avec les consortiums EADB, IGAP et PGC, couvrant 128 681 cas de MA et 849 833 témoins. Cette analyse, qui n'a pas encore été publiée, a identifié plusieurs *loci* situés dans le gène *SRC* associés au risque de développer MA (OR = 0,9 IC95%[0,86-0,93],  $p = 4 \times 10^{-8}$ ) atteignant le seuil de significativité à l'échelle du génome (Figure 42). Ces variants sont localisés à proximité du promoteur de *SRC*, ce qui suggère que la modulation de l'expression de Src pourrait être impliquée dans la pathogénèse de la MA.

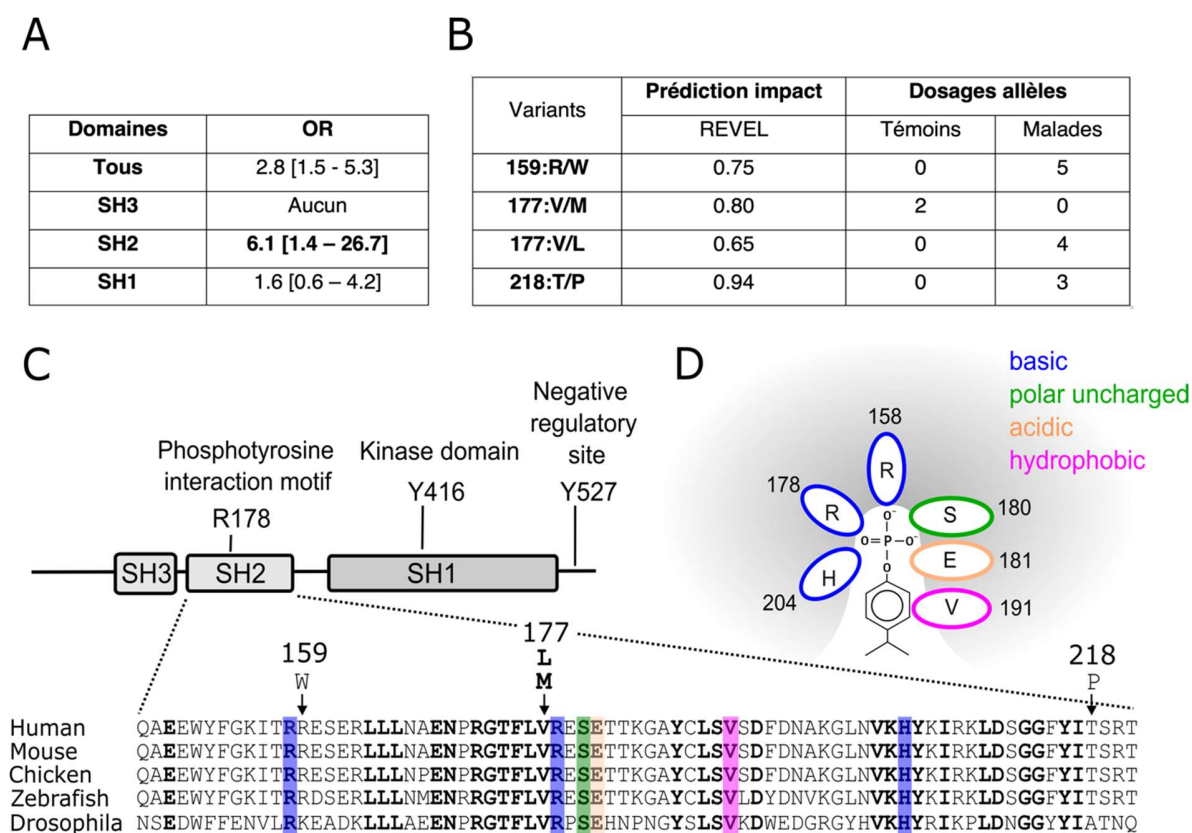


**Figure 42 : Locuszoom montrant les variants localisés dans le gène *SRC* et leur niveau d'association avec le risque de MA.** Sur l'axe des ordonnées (gauche) est indiqué le logarithme négatif de la valeur p d'association avec le

phénotype étudié et (droite) le taux de recombinaison. L'axe des abscisses montre la position chromosomique et le nom des gènes. *Effect allele frequency* = 0.0272 ; OR = 0.9 (0.86-0.93) ; p-value = 4.19E-08.

En complément, une analyse des données de séquençage de l'exome portant sur 32 552 individus d'ascendance européenne a permis de mettre en évidence des variants rares et non synonymes prédits comme étant délétères dans le gène *SRC*, associés au risque de MA (OR = 2,8, IC à 95% [1,5-5,3],  $p < 1,10 \times 10^{-4}$ ) (236). En analysant cette association pour les différents domaines de la protéine Src, il est apparu que les variants responsables de cette association se concentrent principalement dans le domaine SH2 (OR = 6.1 IC à 95% [1.4-26.7],  $p = 3,1 \times 10^{-3}$ ) (Figure 43A). Parmi ces variants, nous nous sommes focalisés sur ceux présentant le score d'impact fonctionnel le plus élevé et qui étaient présents chez au moins deux individus (Figure 43B), à savoir les variants R159W, V177L, V177M et T218P.

Trois de ces variants, R159W, V177L et T218P ont été détectés uniquement chez des patients atteints de MA, ce qui suggère qu'ils pourraient augmenter le risque de la maladie. En revanche, le variant V177M, uniquement présent chez les témoins, pourrait avoir un effet protecteur.



**Figure 43 : Analyse de cluster des variants de SRC associés au risque de développer la MA.** **A.** Répartition des variants rares de SRC associés au risque de la MA en fonction des différents domaines de la protéine. **B.** Variants de SRC présents chez au moins deux individus et présentant le score prédictif sur l'impact sur la fonctionnalité de la protéine le plus élevé. Le score de pathogénicité REVEL (*Rare Exome Variant Ensemble Learner* ; Ensembl) peut varier de 0 à 1, les scores les plus élevés reflètent une plus grande probabilité de pathogénicité des variants. **C.** Représentation des domaines de Src et alignement de séquences multiples des domaines SH2 de différentes espèces incluant la localisation des variants associés au risque de MA. **D.** Représentation des résidus conservés du domaine SH2 impliqués dans l'interaction avec les tyrosines phosphorylées. Les résidus sont colorés selon leur charge : bleu (basique), orange (acide), rose (hydrophobe), et vert (polaire non chargé).

Ces variants sont situées dans le domaine SH2 de Src qui est un domaine hautement conservé (Figure 43C). Il participe à la régulation de l'activité de Src par le biais d'interactions intramoléculaires qui définissent la conformation inactive ou active de la kinase. La phosphorylation de la tyrosine 527 (Y527) à l'extrémité C-terminale stabilise l'interaction entre la queue C-terminale et le domaine SH2, ce qui maintient Src dans sa forme inactive (403). La déphosphorylation de la Y527 entraîne la libération du SH2 et permet l'autophosphorylation par Src de la tyrosine 416 (Y416), ce qui favorise la conformation active de la kinase et l'interaction avec ses substrats (Figure 44A). En effet, en plus de son rôle dans la régulation intramoléculaire, le domaine SH2 participe à la régulation des interactions entre Src et d'autres partenaires, comme la protéine Kindline-2.

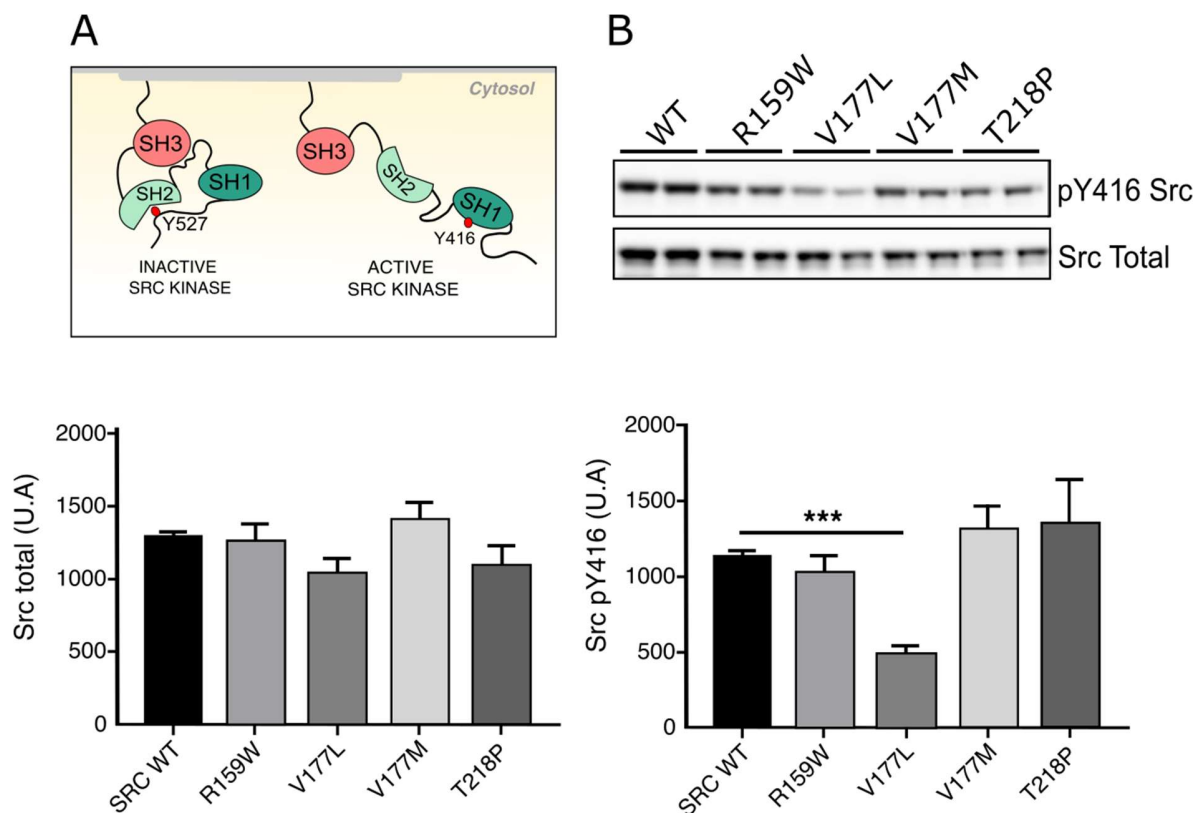
Ainsi, ces variants pourrait altérer la capacité du domaine SH2 à réguler l'activité de Src en (i) modifiant les interactions intramoléculaires qui contrôlent l'équilibre entre les conformations active et inactive de Src, ou (ii) en altérant ses interactions avec d'autres molécules, notamment Kindline-2.

Il est intéressant de noter que le variant V177M, qui semble avoir un effet protecteur contre le risque de MA, a déjà été identifié comme un variant faux-sens impliqué dans l'augmentation de la prolifération cellulaire dans le cancer colorectal, en activant davantage la kinase Src (404). Les auteurs de cette étude suggèrent que ce variant pourrait influencer la dynamique entre les conformations active et inactive de Src. Nous avons donc évalué si les variants étudiés pouvaient modifier cette dynamique.



## 2.2. Le variant V177L impacte l'activité de la kinase Src

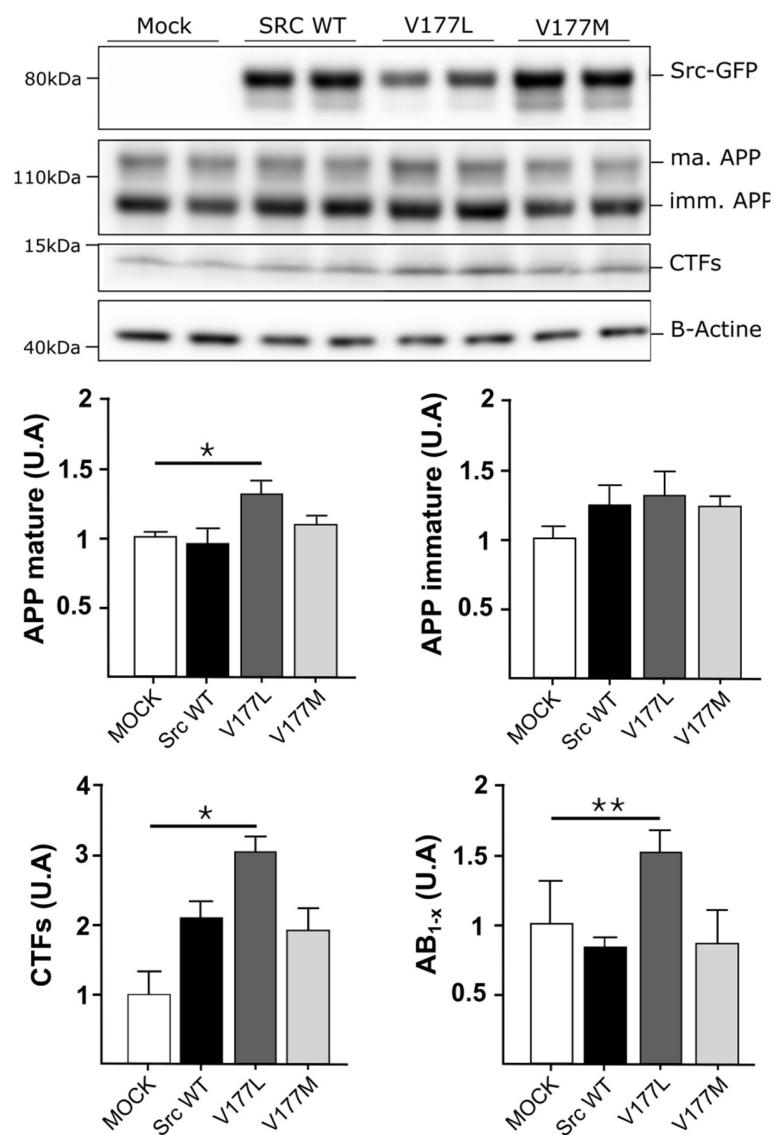
Les prédictions *in silico* sur l'impact des variants rares et délétères de SRC (basées sur les scores REVEL, Figure 43B) ne suffisent pas à prioriser les variants à étudier dans le cadre d'analyses fonctionnelles. C'est pourquoi nous avons généré ces variants par mutagenèse dirigée et mené une analyse fonctionnelle préliminaire. Pour ce faire, nous avons surexprimé la protéine Src humaine porteuse de chacun de ces variants dans des cultures primaires de neurones murins. Nous avons ainsi pu évaluer leur impact sur la phosphorylation de la tyrosine 416 (Y416), un marqueur de l'activité kinase de Src. Nos résultats montrent que, parmi tous les variants étudiés, seul le variant V177L, associé à un risque accru de MA, induit une diminution significative de la phosphorylation de la Y416 par rapport à Src WT, ce qui reflète une réduction de la forme active de Src (Figure 44B). Cela suggère un effet de perte de fonction de ce variant rare sur l'activité de Src. Suite à ces résultats, nous avons décidé de nous concentrer sur le variant V177L, qui présente les effets les plus marqués sur l'activité de Src, ainsi que sur le variant V177M, potentiellement protecteur.



**Figure 44 : Impact des variants sur la forme active de Src dans un modèle de neurones primaires murins.** Les neurones ont été transduits à DIV7 avec des lentivirus exprimant Src (WT ou ses variants), puis lysés à DIV21. La phosphorylation de la Y416, indicateur de la forme active de Src, a été quantifiée par western blot. Les données représentent la moyenne de duplicats issus de 3 expériences indépendantes. Les écart-types sont représentés sur le graphique. \*\*\*p < 0.001. Test statistique Mann-Whitney.

### **2.3. Le variant V177L de Src impacte le métabolisme de l'APP**

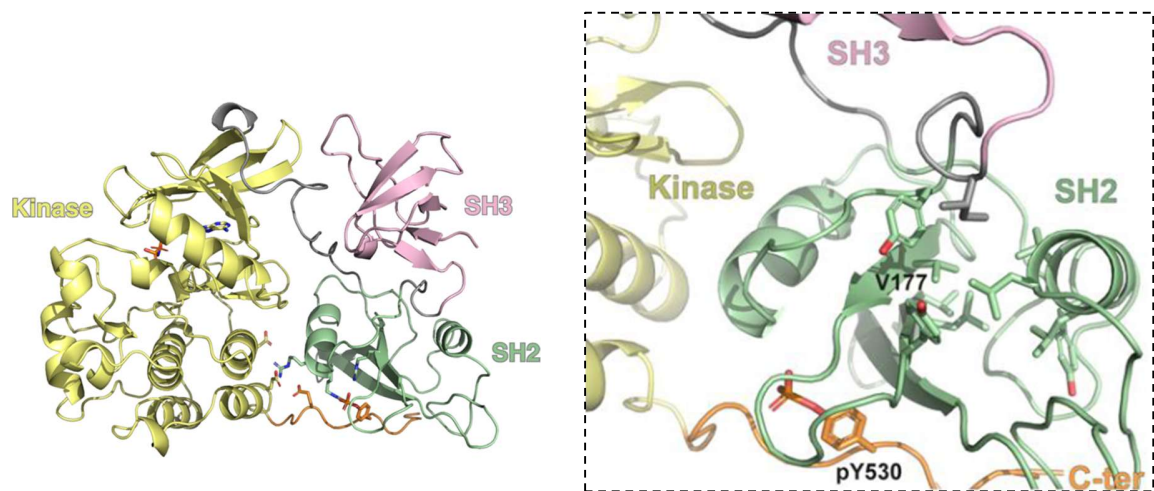
Une étude antérieure menée par notre laboratoire a identifié Src comme un régulateur du métabolisme de l'APP (241). Dans ce cadre, nous avons évalué l'impact des variants V177L et V177M sur ce métabolisme. L'ADNc codant pour Src (WT, V177L ou V177M) a été exprimé dans la lignée cellulaire HEK293-APP<sup>695WT</sup> (Figure 45). Par rapport à la surexpression de Src WT, la surexpression du variant V177L a entraîné une augmentation significative des niveaux d'APP mature et de ses métabolites, les fragments CTFs et les peptides A $\beta$ . Il est intéressant de noter que les effets du variant V177L sur le métabolisme de l'APP sont similaires à ceux observés lors de la sous-expression de Kindline-2, ainsi qu'aux résultats obtenus après surexpression du mutant phosphodéficient Y193A de Kindline-2. Ces résultats suggèrent que l'effet du variant V177L pourrait être dû à une altération de l'activation de Kindline-2.



**Figure 45 : Impact des variants V177L et V177M sur le métabolisme de l'APP dans la lignée HEK293-APP<sup>695WT</sup>.** Des westerns blots ont été réalisés pour quantifier les niveaux d'APP mature, immature ainsi que des CTFs. Une analyse Alpha-LISA a été utilisée pour quantifier les niveaux d'AB<sub>1-x</sub> dans le milieu de culture. Les données représentent la moyenne de duplicats issues de 3 expériences indépendantes. Les écart-types sont représentés sur le graphique. \*p < 0.05 ; \*\*p < 0.01. Test statistique de Mann-Whitney.

## 2.4. Le variant V177L impacte l'interaction entre Src et Kindline-2

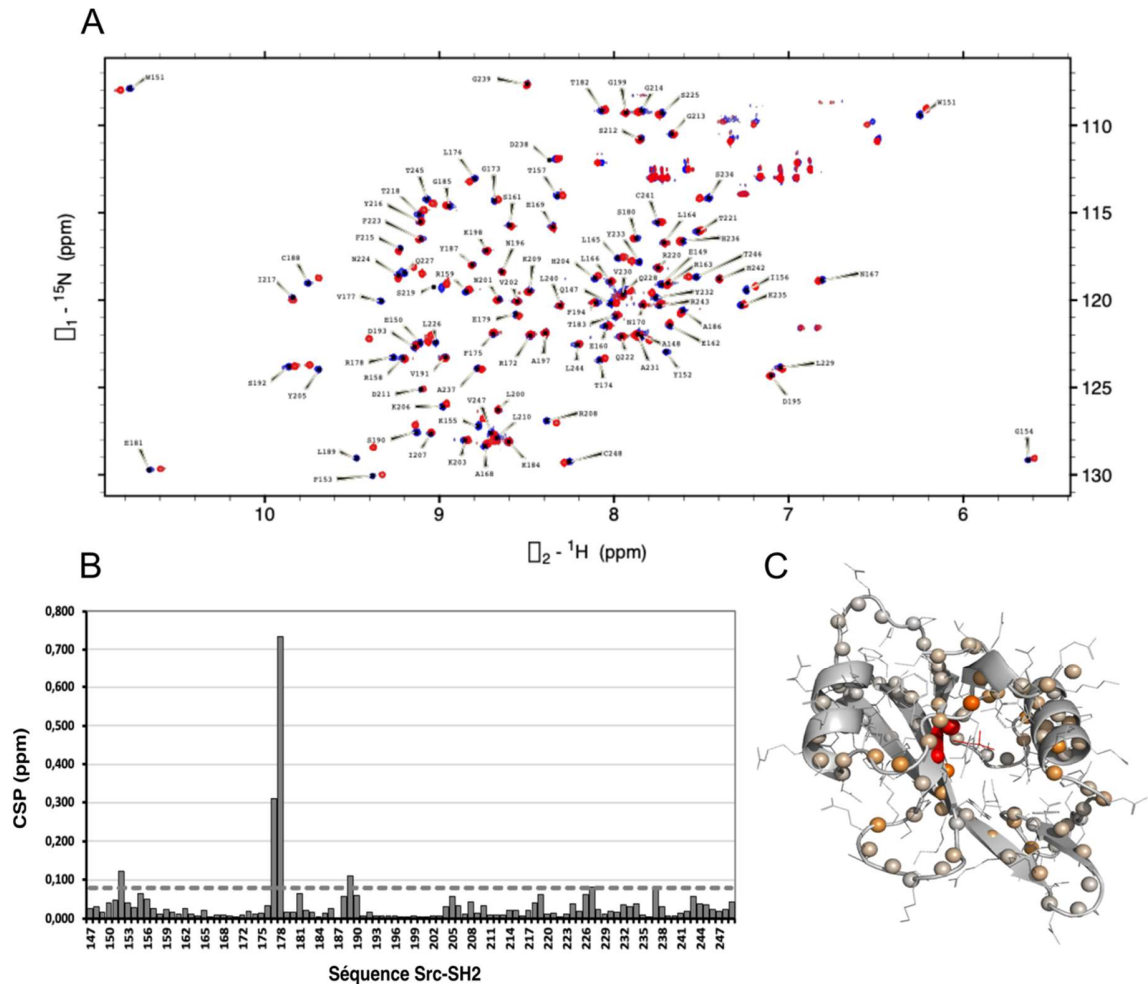
Puisque nos résultats suggèrent que le variant V177L influence l'activité de Src, nous avons étudié son impact potentiel sur la structure de la protéine. D'après les structures disponibles de Src, les variants V177L ou V177M affectent un résidu du domaine SH2, qui établit de nombreuses interactions hydrophobes avec d'autres résidus du même domaine, contribuant ainsi à son bon repliement (Figure 46). Nous émettons donc l'hypothèse que les variants de Src en position 177 pourraient altérer la structure et/ou dynamique de ce domaine, affectant ainsi ses fonctions régulatrices. Pour tester cette hypothèse, nous avons évalué l'effet du variant V177L sur la structure de la protéine par spectroscopie RMN en collaboration avec le Dr Xavier Hanoulle.



**Figure 46** : Structure de la kinase Src dans sa conformation inactive (PDB 2SRC) avec les domaines SH3 (en rose) et SH2 (en vert) repliés sur le domaine catalytique (en jaune). La queue C-terminale, contenant la tyrosine phosphorylée pY530 (ou pY527) est représentée en orange. L'encart montre le résidu V177 du domaine SH2, qui forme des interactions hydrophobes avec les résidus environnants.

Pour mener cette analyse, nous avons validé l'expression des protéines recombinantes Src WT et Src V177L (comprenant tous les domaines de Src) dans des bactéries *E. coli*. Les protéines purifiées ont atteint un niveau d'homogénéité suffisant, de l'ordre du milligramme, répondant ainsi aux critères de pureté et de quantité nécessaires. Les données obtenues montrent que la mutation V177L entraîne des perturbations locales dans le spectre RMN, affectant notamment le résidu arginine 178 de Src (Figure 47). Ce résidu, hautement conservé, se trouve dans la poche de reconnaissance des résidus tyrosines phosphorylées et participe à la formation des interactions électrostatiques requises avec ces tyrosines phosphorylés (Figure 43C,D) (405). Cette poche joue

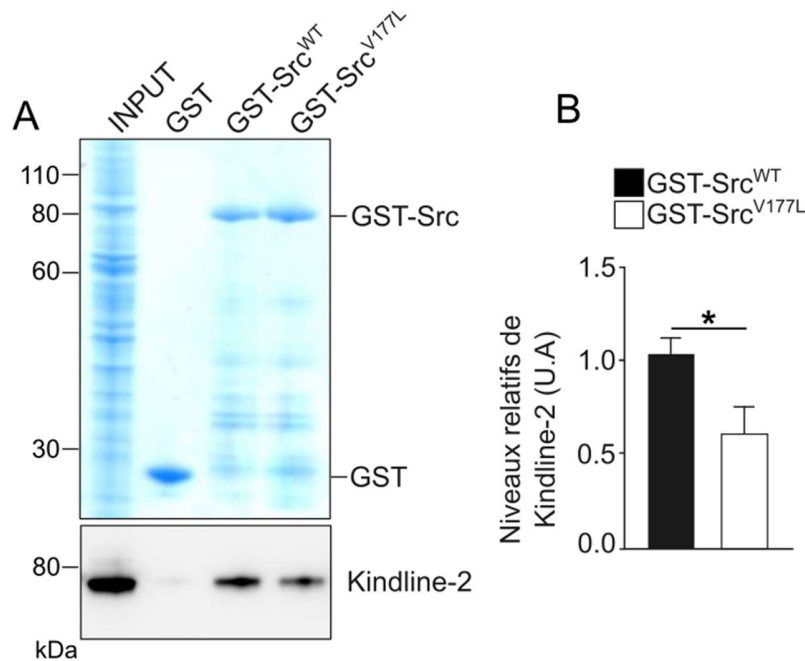
un rôle clé dans la stabilisation de la conformation inactive de Src en interagissant avec le résidu Y527 au niveau de la queue C-terminale (406). Ces résultats suggèrent que le variant V177L pourrait perturber la dynamique du domaine SH2.



**Figure 47** : **A.** Superposition des spectres RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC de Src-SH2 WT et Src-SH2 V177L, en bleu et rouge respectivement. **B.** Perturbations du déplacement chimique (*Chemical Shift Perturbations*, CSP) induites par la mutation V177L. **C.** Perturbations du déplacement chimique induites par la mutation V177L codées en couleur et représentées sur la structure du domaine SH2 de Src.

Nos travaux précédents ont montré que ce variant réduit l'activité de Src, probablement en altérant les interactions intramoléculaires du domaine SH2. Mais ce domaine est également impliqué dans des interactions intermoléculaires, notamment avec la protéine Kindline-2. Nous avons donc cherché à déterminer si le variant V177L affecte également la capacité de Src à interagir avec Kindline-2.

Pour cela, nous avons incubé les protéines recombinantes Src WT ou Src V177L avec des extraits de protéines HEK293-APP<sup>695WT</sup> et réaliser des expériences de pull-down (Figure 48). Nos résultats montrent que la présence du variant V177L réduit significativement la capacité de Src à interagir avec Kindline-2, suggérant que ce variant altère également la capacité du SH2 à interagir avec ses partenaires.

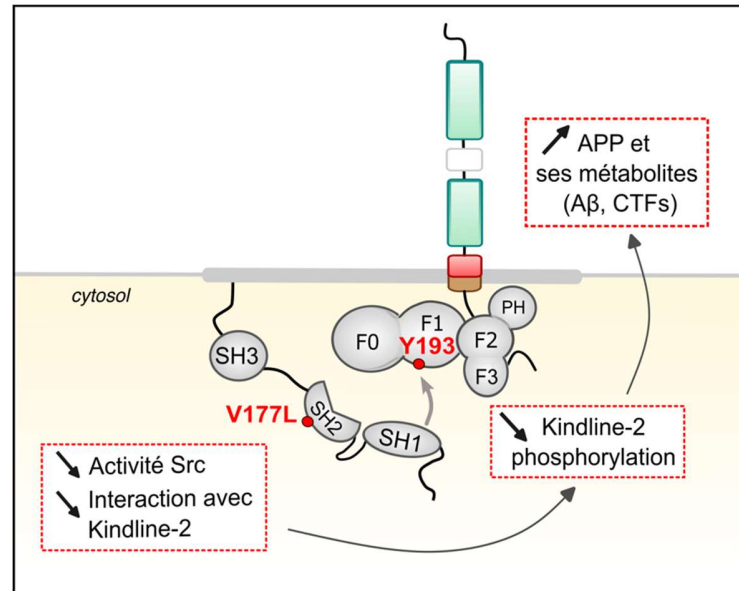


**Figure 48 : A.** Purification de protéines de fusion GST-Src<sup>WT</sup> ou GST-Src<sup>V177L</sup> recombinantes exprimées dans *E. coli* BL21(DE3). Les protéines purifiées sont séparées par SDS-PAGE à 4-20% et colorées au bleu de Coomassie. En dessous, expériences de GST-pull down de Src<sup>WT</sup> ou Src<sup>V177L</sup>. Les protéines sont visualisées par western-blot avec un anticorps anti-Kindline-2. **B.** Quantification des niveaux de Kindline-2 après expériences de pull-down de Src<sup>WT</sup> ou Src<sup>V177L</sup>. Les données représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes. Les écart-types sont représentés sur le graphique. \*p < 0.05. Test statistique de Mann-Whitney.

## 2.5. Conclusion intermédiaire

Nos résultats suggèrent l'existence d'un complexe formé par les protéines APP, Kindline-2 et Src. Nous avons montré que le variant V177L de Src, associé à une augmentation du risque de MA, réduit l'activité de la kinase et diminue également sa capacité à interagir avec Kindline-2. De plus, ce variant conduit à une augmentation des niveaux d'APP mature et de ses métabolites, les fragments CTFs et les peptides A $\beta$ , des effets similaires à ceux observés lors de la sous-expression de Kindline-2. Par ailleurs, nos données indiquent que cet effet du variant V177L sur

le métabolisme de l'APP pourrait être lié à une altération de la phosphorylation de Kindline-2 au niveau du résidu Y193, affectant ainsi sa capacité à réguler le métabolisme de l'APP.

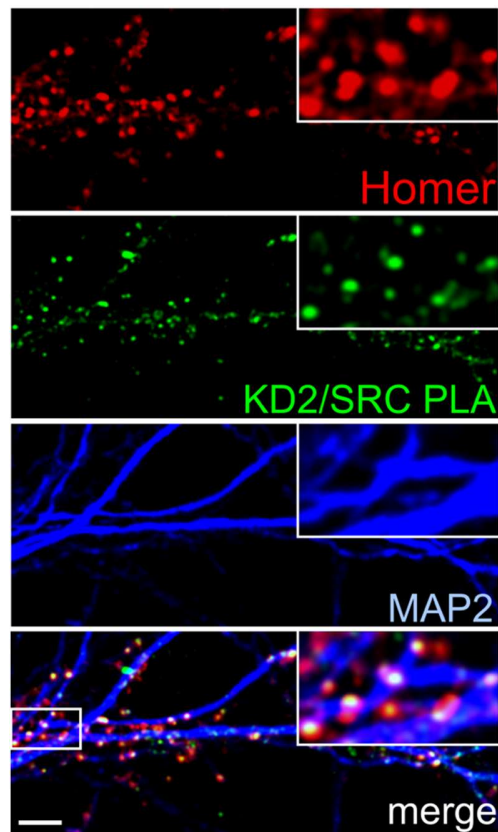


**Figure 49** : Schéma illustrant l'effet du variant V177L. La présence de ce variant diminue l'activité de Src ainsi que sa capacité à interagir avec Kindline-2, ce qui pourrait entraîner une diminution de la phosphorylation de Kindline-2 sur la Y193, et par conséquent, affecter son activité et sa capacité à réguler le métabolisme de l'APP.

### 3. Régulation bidirectionnelle entre Kindline-2 et Src

La protéine Kindline-2 joue un rôle clé dans la signalisation « *outside-in* » en interagissant avec les intégrines, un processus qui implique la tyrosine kinase Src. Des études antérieures ont montré que Src interagit avec Kindline-2 et phosphoryle son résidu Y193 (325,360), cette phosphorylation étant cruciale pour la capacité de Kindline-2 à recruter ses partenaires aux adhésions focales. De plus, la phosphorylation de la Y193 par Src serait également nécessaire pour activer et maintenir l'activité de la kinase.

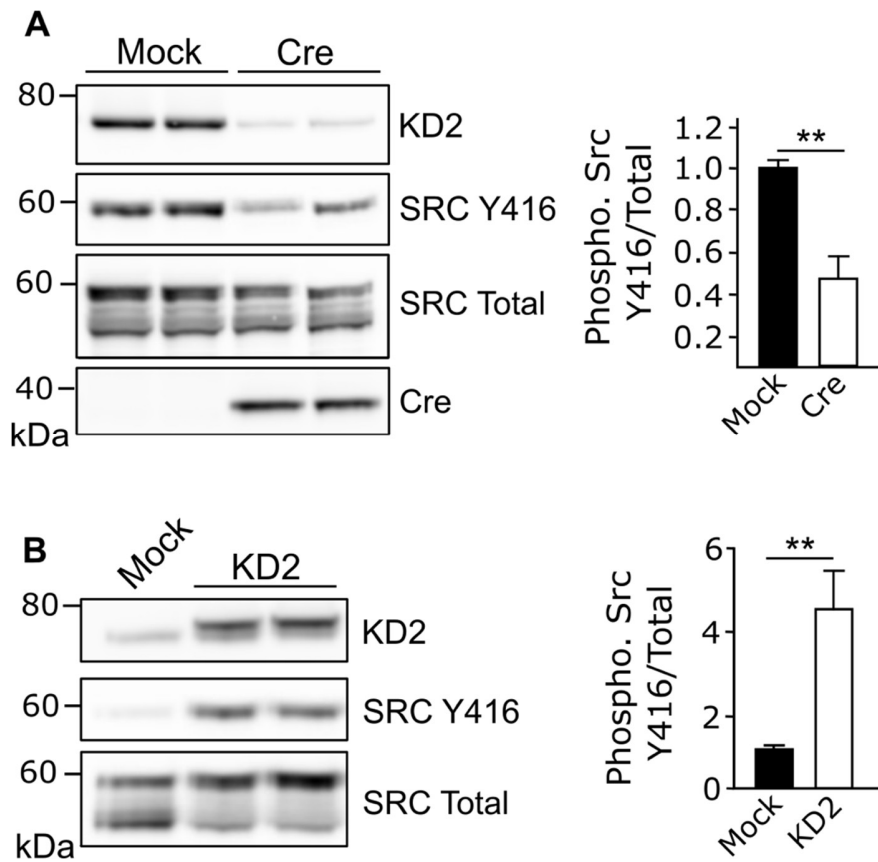
Ces observations ayant été réalisées dans des lignées cellulaires humaines, nous avons cherché à déterminer si une telle interaction pouvait également se produire au niveau synaptique. Pour cela, nous avons mis en place des expériences de PLA dans des cultures primaires de neurones murins. Les signaux de PLA détectant une interaction entre Kindline-2 et Src, colocalisés avec le marqueur synaptique PSD95, suggèrent une interaction potentielle entre ces deux protéines au niveau des synapses (Figure 50).



**Figure 50** : Interaction entre Kindline-2 et Src au niveau synaptique, mise en évidence par PLA et colocalisation avec le marqueur post-synaptique PSD95. Échelle 10  $\mu$ m.

Nous avons ensuite étudié l'effet de la modulation de l'expression de Kindline-2 sur l'activité de Src dans ce modèle neuronal. La sous-expression de Kindline-2, induite par l'expression de la Cre, a entraîné à une diminution de la phosphorylation de la Y416 de Src (Figure 51A). Inversement, la surexpression de Kindline-2 a entraîné une augmentation significative de cette phosphorylation (Figure 51B). Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une régulation mutuelle entre Kindline-2 et Src, où non seulement Kindline-2 recrute Src pour être phosphorylée, mais son niveau d'expression influence également l'activité de Src au niveau neuronal. Pour approfondir ces résultats, des expérimentations sont en cours de réalisation afin d'évaluer l'influence de la modulation de l'expression de Kindline-2 sur les effets précédemment observés du variant V177L sur l'activité de Src.





**Figure 51 : Effet de la modulation de l'expression de Kindline-2 sur l'activité de Src. A.** Impact de la sous-expression de Kindline-2 sur la phosphorylation de la Y416. **B.** Impact de la surexpression de Kindline-2 sur la phosphorylation de la Y416. Les données représentent la moyenne de duplicats de 3 expériences indépendantes. Les écart-types sont représentés sur le graphique. \*\*p < 0 .001. Test statistique de Mann-Whitney.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le domaine intracellulaire de l'APP est essentiel au maintien d'une morphologie et d'une plasticité synaptiques normales, ce qui suggère que son interaction avec des partenaires intracellulaires peut être cruciale pour le bon fonctionnement des synapses (135).

Des études antérieures du laboratoire ont montré que Kindline-2, un partenaire de l'APP, joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme de l'APP et de ses fonctions synaptiques (241,306). Cependant, les mécanismes précis par lesquels Kindline-2 régule ces fonctions, en particulier lors des processus dynamiques impliquant l'APP, comme la densité et l'activité synaptiques, ne sont pas encore entièrement compris (407).

Dans ce travail, nous avons cherché à déterminer les mécanismes par lesquels la régulation des fonctions de l'APP par Kindline-2 pourrait être contrôlée.

### Mécanismes de régulation de l'interaction Kindline-2 / APP

#### 1. Régulation par l'intervention de protéases

Nous avons identifié la protéine Kindline-2 comme un nouveau substrat pour deux classes de protéases à cystéine bien connues pour leur rôle dans la régulation des fonctions synaptiques : la calpaïne et la caspase.

En culture primaire de neurones, nous avons observé que le fragment de Kindline-2 produit par le clivage de la caspase (39-kDa) est présent même en condition basale, alors que celui généré par la calpaïne (57-kDa) apparaît principalement en réponse à des concentrations élevées de glutamate. Un excès de glutamate provoque un phénomène d'excitotoxicité, un processus toxique pour les neurones associé à la neurodégénération (408). Cette excitotoxicité survient *via* une entrée massive de calcium et la suractivation subséquente de protéases calcium-dépendantes, notamment les calpaïnes. Il semblerait donc que ces clivages interviennent dans des conditions distinctes : le clivage par la calpaïne semble être plus présents en condition pathologique, tandis que le clivage par la caspase apparaît comme un processus constitutif.

## 1.1. Comment ces clivages sont-ils régulés ?

### En condition physiologique ?

Il est intéressant de noter que l'isoforme Kindline-3, exprimée principalement dans les cellules d'origine hématopoïétique, est également un substrat de la calpaïne et de la caspase (caspase-3) (281,409,410). Sabino et *al.* ont montré que le clivage de Kindline-3 par la caspase contribue à l'inactivation des intégrines, accélérant ainsi l'apoptose des cellules inflammatoires pendant la cicatrisation. Zhao et *al.*, quant à eux, ont montré que la calpaïne clive Kindline-3 au niveau de la Y373, participant ainsi à la régulation de l'adhésion et de la migration des cellules hématopoïétiques en modulant l'interaction de Kindline-3 avec les intégrines. Étant donné que Kindline-2 est ubiquitaire, il est probable que les clivages que nous avons identifiés jouent également un rôle dans la régulation des processus d'adhésion cellulaire médiés par les intégrines dans d'autres tissus.

Kindline-2 est connu pour interagir avec les intégrines  $\beta$  et déclencher leur signalisation par le recrutement et l'activation des kinases d'adhésion focale (252). Pour explorer l'influence de cette voie sur le clivage de Kindline-2, nous avons activé la signalisation des intégrines dans des cellules HEK293 en les traitant avec du manganèse ( $Mn^{2+}$ ), qui par sa liaison à l'ectodomaine des sous-unités  $\beta$  fait directement passer les intégrines à l'état de haute affinité sans nécessiter de signalisation « *inside-out* » (411). Nos résultats préliminaires montrent que l'activation des intégrines entraîne une diminution du clivage de Kindline-2 par la caspase. À l'inverse, l'inhibition des deux principales kinases d'adhésion focale (FAK et PTK2B) par siRNA conduit à une accumulation du fragment de Kindline-2 produit par la caspase, avec un effet cumulatif lorsque l'on inhibe simultanément FAK et PTK2B. En revanche, le fragment de Kindline-2 issu du clivage par la calpaïne n'a pas été détecté dans ces expériences. Ces données suggèrent que le clivage de Kindline-2 par la caspase pourrait être un mécanisme de régulation de l'adhésion cellulaire en conditions physiologiques.

## **Dans la physiopathologie de la MA ?**

Les calpaïnes et les caspases jouent un rôle essentiel dans la plasticité synaptique en tronquant partiellement plusieurs protéines pré- et post-synaptiques. Leur activité, restreinte dans l'espace et dans le temps, contribue à la dynamique de l'assemblage et du désassemblage du cytosquelette, modulant ainsi la structure et la fonction synaptique en réponse à l'activité neuronale. L'activation de la calpaïne est, par exemple, nécessaire à l'induction de la LTP (412), tandis que l'activité non apoptotique de la caspase-3 intervient principalement dans la dépression à long terme (LTD) (413).

Des travaux menés au laboratoire ont montré que l'inhibition de Kindline-2 altère la LTP de manière dépendante de l'APP (306). Nous émettons donc l'hypothèse que les clivages de Kindline-2 pourrait jouer un rôle dans la plasticité synaptique, aussi bien en contexte physiologique que physiopathologique.

Kindline-2 est prédite comme étant un substrat potentiel de la calpaïne I ( $\mu$ -calpaïne) et II (m-calpaïne), les deux isoformes les plus présentes dans le cerveau. Elles sont activées à des concentrations calciques distinctes, la calpaïne I étant sensible à des concentrations relativement basses de calcium, de l'ordre du micromolaire, tandis que la calpaïne II nécessite des concentrations plus élevées, de l'ordre du millimolaire. De plus, elles semblent présenter des fonctions opposées dans le cerveau. Des études montrent que l'activation de la calpaïne I jouerait un rôle neuroprotecteur pendant le développement postnatal et à l'âge adulte, en participant à la régulation de la plasticité synaptique, notamment dans l'hippocampe et le cervelet. En revanche, l'activation de la calpaïne II semble limiter l'étendue de la plasticité synaptique et participer à la neurodégénérescence (414–416). Ces différences d'affinité impliquent que les deux isoformes peuvent jouer des rôles distincts selon les fluctuations calciques intracellulaires.

Dans un contexte pathologique, comme lors de l'excitotoxicité, où des concentrations de calcium anormalement élevées sont atteintes, les calpaïnes se trouvent suractivées, contribuant alors aux dysfonctionnements synaptiques. En effet, une suractivation des calpaïnes a été observé dans les cerveaux de patients atteints de la MA (417–420), et une dysrégulation de leur activité est associée à la formation d'agrégats toxiques (421,422) ainsi qu'au dysfonctionnement synaptique (423). Une étude a notamment montré que l'activation de la calpaïne, en l'occurrence la calpaïne II, était responsable de l'excitotoxicité induite par les NMDAR (424).

Dans nos expériences, nous avons reproduit des conditions d'excitotoxicité, en utilisant notamment des concentrations élevées de glutamate. Bien que cela ne nous permette pas d'examiner ce qui se passe à des concentrations plus faibles, ces données, combinées à la faible présence du fragment de Kindline-2 clivé par la calpaïne en condition basale, suggèrent que Kindline-2 pourrait n'être un substrat des calpaïnes que dans des conditions de suractivation. Cela pourrait expliquer pourquoi le clivage de Kindline-2 par la calpaïne n'est observé qu'en cas de surcharge calcique, comme cela est observé au cours des processus neurodégénératifs (425). Bien que nous n'ayons pas observé de différence significative dans la quantité de fragments de Kindline-2 entre les patients atteints de la MA (n=20) et les témoins (n=8) (Figure 24), une tendance ( $p=0,09$ ) indique une plus grande présence du fragment de 57-kDa, issu du clivage par la calpaïne, dans l'hippocampe des patients par rapport aux témoins.

De même, une dérégulation du clivage de Kindline-2 par la caspase pourrait survenir au cours des processus physiopathologiques de la MA. En effet, une activation anormale des caspases a été détectée dans les cerveaux de patients atteints de MA (426,427), et il a été montré qu'elles peuvent affecter la structure et l'activité des neurones (428,429).

De plus, une augmentation de l'expression de Kindline-2 a été relevée dans le cortex temporal de patients post-mortem atteints de MA, comparativement à des témoins sains (306,430). Cependant, les approches utilisées ne permettent pas de quantifier les sous-produits de Kindline-2. Des études supplémentaires seront donc nécessaires pour évaluer l'association potentielle entre le clivage de Kindline-2 et les processus physiopathologiques de la MA.

## **1.2. Quel est l'impact de ces clivages sur les fonctions de Kindline-2 ?**

### **Inhibition du recrutement de partenaires**

Les clivages de Kindline-2 par la calpaïne et la caspase entraînent la séparation des domaines F0 et F1, essentiels au recrutement de divers partenaires (Figure 20). La protéine résultante conserve le domaine PH, qui permet l'association avec la membrane plasmique, et le domaine F3, responsable de la liaison de Kindline-2 avec le motif NxxY, nécessaire à ses interactions avec les intégrines ou l'APP.

Nos résultats actuels indiquent que ces clivages inhibent la capacité de Kindline-2 à réguler le métabolisme de l'APP, même lorsque le domaine F3 est présent. De plus, la surexpression des fragments C-terminaux de 57-kDa et de 39-kDa, issus du clivage par la calpaïne et la caspase respectivement, montre un effet dominant négatif sur les niveaux de peptides A $\beta$ , un résultat cohérent avec les observations faites lors de l'inhibition de Kindline-2 (241). Ces données suggèrent que ces fragments pourraient conserver leur capacité à interagir avec l'APP mais induire un blocage du mécanisme de régulation de son métabolisme.

Ces observations soulignent également l'importance des domaines F0 et F1 dans la régulation des niveaux de peptides A $\beta$  par Kindline-2. De manière intéressante, une étude a montré que le domaine F1 de Kindline-2 est capable de recruter la protéine Smurf1, une E3 ubiquitine ligase, ce qui permet l'ubiquitination et la dégradation du récepteur transmembranaire LRP1 (332,354). Puisque nous avons précédemment rapporté que Kindline-2 contrôle la dégradation de l'APP (306), il est possible que le domaine F1 soit aussi crucial pour l'influence de Kindline-2 sur cette dégradation. Le clivage de Kindline-2 pourrait donc limiter le recrutement de ses partenaires, déviant ainsi l'APP de sa voie de dégradation et favorisant son recyclage à la surface cellulaire et la production d'A $\beta$ . De plus, l'APP à la surface est essentielle pour la régulation de la morphologie et la plasticité synaptique. En perturbant le métabolisme de l'APP, ces clivages pourraient altérer les fonctions synaptiques dépendantes de l'APP. De plus, ces protéases étant dérégulées dans le cerveau des patients atteints de MA (420,431), l'inhibition de Kindline-2 pourrait être exacerbée dans un contexte pathologique.

### **Impact sur la capacité de dimérisation de Kindline-2**

Des expériences de cristallographie montrent que Kindline-2 peut former des homodimères *via* son domaine F2, ce qui permet son recrutement au niveau des sites d'adhésion et l'activation subséquente de l'intégrine (251,357). L'étude de Li et *al.* montre que l'introduction de mutations ponctuelles empêchant la dimérisation de Kindline-2 est corrélée à une baisse de l'activation des intégrines, et que la dimérisation de Kindline-2 pourrait participer à l'activation des intégrines en favorisant leur *clustering*. Il est intéressant de noter que plusieurs études ont également observé un *clustering* de l'APP (432–434). Ce phénomène pourrait soit favoriser une activité locale en concentrant les composants, soit protéger les domaines actifs des protéines. Ce clustering de l'APP semble aussi jouer un rôle dans son trafic et son traitement endocytaire (433,434). Dans ce contexte, il pourrait être intéressant d'évaluer comment les clivages de Kindline-2 influencent

sa capacité à se dimériser et à exécuter ses différentes fonctions telles que la régulation du traitement de l'APP.

## **2. Régulation par l'effet d'un autre facteur de risque de la MA**

### **2.1. Est-ce que la protéine Src est impliquée dans la régulation du métabolisme de l'APP ?**

Notre étude, bien qu'encore fragmentaire, examine pour la première fois l'influence de la protéine Src sur l'APP et l'existence possible d'une interaction fonctionnelle entre les protéines APP, Src et Kindline-2. Cette hypothèse repose sur l'observation que Src, identifié récemment comme un facteur de risque pour la MA, contrôlerait l'activation de Kindline-2, influençant ainsi la régulation du métabolisme de l'APP.

Nos résultats montrent que Src et Kindline-2 interagissent à la synapse et suggèrent l'existence d'un complexe APP/Kindline-2/Src. Des premières expériences de PLA en culture primaire de neurones murins n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction entre les protéines APP et Src. En revanche, nous avons observé par immunofluorescence classique une colocalisation entre ces deux protéines. Ces résultats suggèrent que l'interaction entre l'APP et Src n'est pas directe, et que la protéine Kindline-2 serait nécessaire au recrutement de Src au niveau de l'APP.

D'autre part, en accord avec des recherches antérieures qui soulignent l'importance de la phosphorylation de la Y193 de Kindline-2 par Src pour son activation et sa fonctionnalité au niveau des adhésions focales (325,360), nos expériences indiquent que cette phosphorylation semble également cruciale pour la régulation du métabolisme de l'APP. Puisque nos données suggèrent qu'une perte de fonction de Kindline-2 serait délétère et que cette phosphorylation est décrite comme essentielle à ses fonctions, il serait intéressant de comparer les niveaux de phosphorylation de Kindline-2 dans les cerveaux de patients atteints de MA avec ceux retrouvés dans le cerveau de sujets sains. Dans ce contexte, un niveau plus faible de phosphorylation de Kindline-2 pourrait être envisagé comme un nouveau marqueur de la maladie.

## **2.2. Le variant V177L de Src : un variant perte de fonction ?**

Grâce aux analyses WES, nous avons identifié un nouveau variant non synonyme dans le gène *SRC*, V177L, qui pourrait favoriser le développement de la MA. Src est un proto-oncogène bien connu, dont l'activation aberrante résultant d'une dérégulation pathologique joue un rôle important au cours du développement et la progression de tumeurs, et est souvent un facteur de mauvais pronostic. Cependant, notre étude suggère que le variant V177L pourrait agir comme un variant de prédisposition à la MA en conduisant à une perte de fonction de la kinase Src.

Dans nos expériences, nous avons montré que la présence du variant V177L entraîne non seulement une diminution de la phosphorylation de Src phospho-Y416, correspondant à la conformation active de Src, mais aussi une diminution de la capacité de Src à interagir avec Kindline-2. Ces altérations sont associées à une augmentation des niveaux d'APP mature et de ses métabolites, les CTFs et les peptides A $\beta$ . Ces effets sont similaires à ceux observés avec la sous-expression de Kindline-2 ou l'expression du mutant phosphodéficient Y193A de Kindline-2. Ainsi, en modifiant la phosphorylation ou l'interaction de Src avec Kindline-2, le variant V177L pourrait entraîner des altérations similaires à celles observées en cas de dérégulation de Kindline-2 sur le métabolisme de l'APP. Ces observations renforcent l'hypothèse d'une interaction fonctionnelle entre les protéines Src et Kindline-2 dans les processus de la MA.

Bien que l'impact du variant V177L sur la phosphorylation de la Y193 de Kindline-2 n'ait pas encore pu être démontré en raison du manque d'anticorps spécifique, nos données suggèrent que l'effet du variant V177L sur le métabolisme de l'APP passerait par une altération de l'activité de Kindline-2, et notamment une altération de sa phosphorylation.

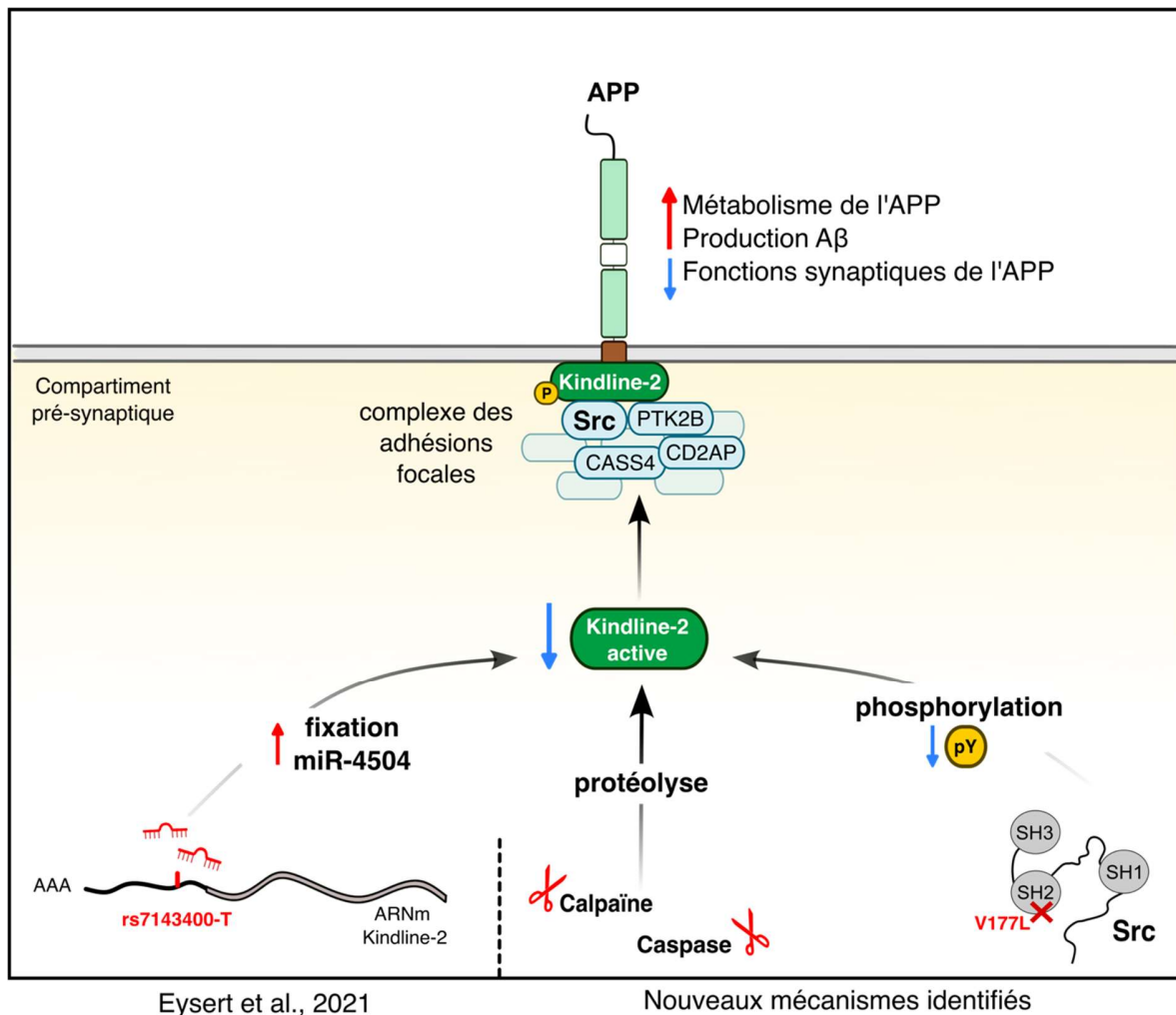
Nous proposons donc un modèle dans lequel la cascade de signalisation dépendant du complexe APP-Kindline-2-Src jouerait un rôle dans la plasticité synaptique et dont la dérégulation pourrait favoriser le développement de la MA : Src, lorsqu'elle est activée et ancrée à la membrane, se lie à Kindline-2 et la phosphoryle au niveau de la Y193, permettant ainsi l'activation de Kindline-2. Cette activation favoriserait le recrutement par Kindline-2 de partenaires nécessaires à la régulation du métabolisme de l'APP.



### 2.3. Régulation mutuelle entre Src et Kindline-2 ?

Nos résultats, en accord avec l'étude de Liu et *al.*, montrent que Kindline-2 participe à la régulation de l'activité de Src, cette fois dans un modèle de culture primaire neuronale (360). La surexpression de Kindline-2 augmente de manière significative l'activité de Src (pY416), tandis que son inhibition la diminue. Ces données soulèvent la question de l'impact de la modulation de l'expression de Kindline-2 sur l'effet du variant V177L de Src. Nos expériences en culture primaire neuronale montrent que, lorsque Kindline-2 est exprimée à des niveaux endogènes, la surexpression du variant V177L, comparé à Src WT, réduit la phosphorylation de la Y416. En revanche, la surexpression du variant V177M, potentiellement protecteur, n'a pas d'effet notable. Dans ce contexte, nous pourrions envisager d'augmenter l'expression de Kindline-2 pour compenser la baisse d'activité de Src observée en présence du variant V177L. De manière intéressante, nos premières expériences indiquent que la surexpression de Kindline-2 WT semble effectivement compenser cette diminution de l'activité de Src causée par le variant V177L.

Sur la base de ces observations et de rapports antérieurs, nous proposons un mécanisme de rétroaction positive par lequel Src interagit et phosphoryle Kindline-2 sur la Y193, ce qui conduit à l'activation de Kindline-2, et en retour participe au maintien de l'activité de Src. Cette boucle Src-Kindline-2-Src serait importante pour stabiliser l'activité de Src. De plus, les variants du gène *FERMT2* associés au risque de MA sont corrélés à une baisse d'expression de Kindline-2. La présence de ces variants pourraient ainsi exacerber les effets délétères du variant V177L de Src.



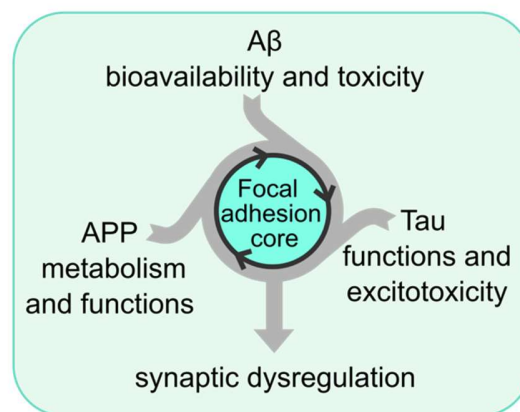
**Figure 52 :** Schéma illustrant les mécanismes qui régulent l'expression de Kindline-2 dans le contexte physiopathologique de la MA. (i) Le miR-4504, surexprimé dans le cerveau des patients atteints de la MA, se fixe sur la région 3'UTR de l'ARNm de Kindline-2 contenant le variant *rs7143400-T*, ce qui inhibe la traduction de la protéine (306). (ii) Le clivage de Kindline-2 au niveau de ses domaines F0 et F1, induit par les calpaïnes ou les caspases, dont l'activité est dérégulée dans la MA, entraîne une inhibition des fonctions de Kindline-2. (iii) Le variant V177L de Src réduit l'activité de la kinase et perturbe les fonctions de Kindline-2 en inhibant sa phosphorylation sur la Y193. Ces 3 mécanismes conduisent à une diminution de l'activité de Kindline-2 et à une perturbation de son interaction avec l'APP, ce qui entraîne plusieurs dysfonctionnements au niveau de la synapse. Le métabolisme de l'APP est altéré, augmentant ainsi la production de peptides Aβ. De plus, l'APP ne remplit plus son rôle de molécule d'adhésion, ce qui provoque une perte de stabilisation des synapses et une diminution de la plasticité synaptique.

Étant donné que la sous-expression ou perte de fonction de Kindline-2 est associée à des effets délétères, une surexpression de cette protéine pourrait avoir un effet protecteur. Dans un contexte physiopathologique, cela pourrait permettre de restaurer le métabolisme ainsi que les fonctions liées à l'APP, en compensant la baisse d'expression induite par le miR-4504, en contrant la perte de fonction due aux clivages, ou en neutralisant l'effet du variant V177L sur l'activité de Src.

Cependant, Kindline-2 est une protéine pléiotrope, impliquée dans de multiples fonctions biologiques. De plus, sa surexpression est associée à la progression de divers types de cancers, ce qui en fait une cible thérapeutique potentiellement risquée. Il serait donc intéressant d'identifier avec précision les acteurs et les voies biologiques dépendantes de Kindline-2. Cela pourrait permettre de découvrir de nouveaux mécanismes physiopathologiques liés à la MA, ainsi que d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

## 2.4. Preuves supplémentaires de l'implication des protéines des adhésions focales dans la physiopathologie de la MA

Un modèle récent de notre laboratoire propose que la voie des adhésions focales occupe une place centrale dans le processus physiopathologique de la MA (Figure 53) (307). Cette hypothèse repose sur un ensemble croissant d'éléments montrant le rôle physiologique de l'APP dans les fonctions synaptiques, possiblement *via* son rôle en tant que molécule d'adhésion. En effet, il a été démontré que les fonctions de l'APP sont étroitement liées à la signalisation des adhésions focales dont plusieurs protéines clés sont codées par des gènes qui ont été identifiés comme facteurs de susceptibilité génétique de la MA.



**Figure 53** : Réévaluation de l'hypothèse de la cascade amyloïde dans un modèle circulaire. Dans ce nouveau modèle, le dysfonctionnement de la voie d'adhésion focale au niveau des synapses pourrait être à l'origine d'un cercle vicieux avec de multiples points d'entrée reliant les caractéristiques de la MA au dysfonctionnement synaptique, à la perte des synapses et au déclin cognitif qui s'ensuit, d'après Dourlen et *al.* 2019 (307).

Par exemple, l'équipe de Xu et *al.* a montré que le ciblage de l'APP à la surface cellulaire par des anticorps pouvait induire des lésions neuronales, en perturbant cette signalisation (435). Plus

précisément, l'utilisation d'un anticorps anti-APP sur des cultures neuronales primaires a provoqué des dommages neuronaux et des changements morphologiques aberrants des neurites, accompagnés d'une dérégulation des protéines des adhésions focales telles que FAK et la Paxilline, qui présentent alors une phosphorylation accrue. Cependant, le prétraitement des cultures avec un inhibiteur de la famille des tyrosines kinases Src (PP2) a empêché l'augmentation de cette phosphorylation ainsi que les lésions neuronales induites par l'anticorps anti-APP, suggérant un rôle clé de la famille de kinases Src dans la signalisation des adhésions focales induite par l'APP.

Par ailleurs, l'équipe de Sheng a montré que la mutation « *Swedish* » de l'APP, associée aux formes monogéniques de la MA, réduit l'adhésion et la migration des cellules N2a, en passant notamment par une régulation de l'activité de FAK (436). La connexion entre l'APP et la MEC était affaiblie en présence de la mutation « *Swedish* », en raison de la diminution du niveau de l'APP à la surface cellulaire. Cela suggère un lien entre le clivage anormal de l'APP et la dérégulation des voies liées à l'adhésion cellulaire dans la MA.

Nos résultats renforcent l'importance des protéines des adhésions focales dans la régulation de l'APP. Nous avons mis en évidence une interaction fonctionnelle entre Kindline-2 et Src, deux protéines des adhésions focales également identifiées comme des facteurs de risque pour la MA, et leur rôle dans la régulation du métabolisme de l'APP et potentiellement ses fonctions synaptiques.

De manière intéressante, des études ont révélé un lien fonctionnel entre Kindline-2, Src, FAK et la Paxilline (437,438). Il a été montré que Kindline-2 joue un rôle direct dans la régulation de la phosphorylation de la Paxilline, un effecteur important de la signalisation des intégrines, voir également de l'APP. De plus, FAK pourrait être impliquée dans la régulation du complexe Kindline-2 / Src, relayant ainsi les signaux d'adhésion entre la cellule et la MEC du complexe Kindline-2 / Src vers la Paxilline.

Ces résultats apportent des éléments supplémentaires du rôle central des adhésions focales dans la régulation des fonctions de l'APP. Le rôle de Kindline-2 et Src dans la modulation des signaux d'adhésion, associés à la régulation de protéines comme FAK et la paxilline, pourrait ouvrir de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MA.

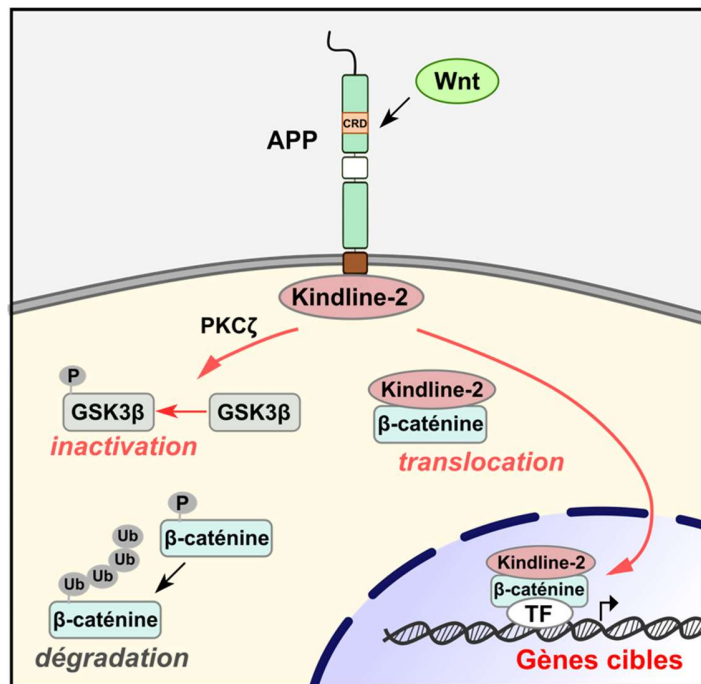
## Perspectives

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche, aboutissant à l'obtention de financements supplémentaires pour poursuivre et approfondir nos travaux.

### 1. Caractériser les voies régulées par Kindline-2

Notre laboratoire a rapporté que Kindline-2 contrôlait le métabolisme de l'APP, ainsi que la plasticité synaptique de manière dépendante de l'APP (241,306). Nos données suggèrent que la sous-expression ou la perte de fonction de Kindline-2 serait délétère, en entraînant des dysfonctionnements synaptiques. Cette dérégulation de Kindline-2 pourrait survenir par plusieurs mécanismes, une régulation miR dépendante comme montré dans l'étude d'Eysert et *al.* ou comme nous l'avons identifié, par des clivages et des MPT (phospho-Y193).

Le projet, financé par France Alzheimer, vise à tester l'hypothèse selon laquelle la sous-expression ou la perte de fonction de Kindline-2 contribue au dysfonctionnement synaptique et au processus physiopathologique de la MA. Dans ce projet, l'objectif est d'étudier les mécanismes complémentaires liés à la fonction transcriptionnelle de Kindline-2. En effet, Kindline-2 est aussi impliquée dans la régulation d'expression des gènes en formant un complexe transcriptionnel avec la  $\beta$ -caténine, un effecteur clé de la signalisation Wnt (333). Yu et *al.* ont montré que Kindline-2 est essentielle pour stabiliser la  $\beta$ -caténine, soit en interagissant avec elle, soit en inhibant la GSK3 $\beta$  (439) qui favorise normalement la dégradation de la  $\beta$ -caténine. De manière intéressante, nous avons observé que la sous-expression de Kindline-2 augmente l'expression de la forme active de GSK3 $\beta$  dans les neurones. Plus récemment, l'APP a été caractérisée comme un récepteur Wnt conservé, nécessaire à la régulation de la croissance des neurites par Wnt (440). Ainsi, l'effet de Kindline-2 sur l'APP pourrait être lié à la capacité de l'APP à se lier à Wnt et à réguler ainsi sa signalisation (Figure 54). Pour identifier les gènes cibles de Kindline-2, le modèle de souris Cre/loxP disponible au laboratoire sera utilisé pour inactiver Kindline-2 dans les neurones. Un traitement Wnt pourra également être testé, et le séquençage de l'ARN (RNA-seq) sera utilisé pour identifier les gènes différentiellement exprimés.



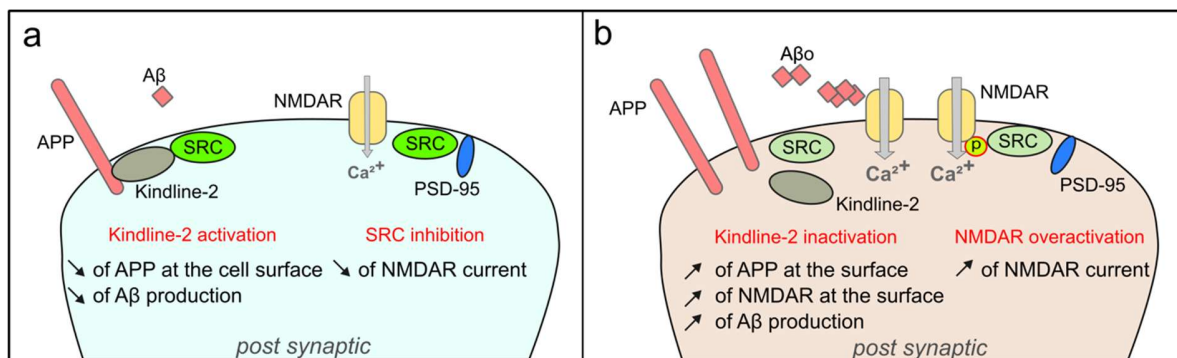
**Figure 54** : Le domaine riche en cystéine (CRD) dans la partie extracellulaire de l'APP est nécessaire à la liaison Wnt pour contrôler la croissance axonale et dendritique (440). Dans le cerveau mature, la signalisation Wnt est nécessaire pour assurer la connectivité synaptique structurelle et fonctionnelle (441). D'autre part, Kindline-2 est connu pour contrôler la signalisation Wnt par la régulation de l'activation de GSK3 et d'un complexe transcriptionnel pour contrôler l'expression des gènes (442). Dans ce contexte, nous pourrions émettre l'hypothèse que les gènes ciblés par Kindline-2 pourraient jouer un rôle clé dans la physiopathologie.

En identifiant les gènes régulés par Kindline-2, nous espérons clarifier comment la dérégulation de Kindline-2 influence le processus physiopathologique de la MA et dévoiler de nouvelles voies liées aux dysfonctionnements synaptiques, indépendantes ou non de la production de peptides A $\beta$ .

## **2. Impact des variants de Src dans le processus physiopathologie de la MA**

Dans cette étude, nous avons identifié la kinase Src comme un nouveau gène dont les variants communs et rares sont associés à un risque de MA. Nous montrons que Src semble être impliquée dans la régulation du métabolisme de l'APP par l'intermédiaire de la protéine Kindline-2. Bien que Src agisse comme une plaque tournante moléculaire sur laquelle convergent diverses voies de signalisation, son rôle dans le cerveau reste peu caractérisé, malgré son implication connue dans la régulation de l'activité synaptique. De nombreuses données se sont accumulées montrant que l'une des principales fonctions de Src est de réguler l'activité des récepteurs N-méthyl-D-aspartate

(NMDA) (443–449). Les récepteurs NMDA (NMDAR) sont un sous-type principal de récepteurs du glutamate, qui assurent la médiation de la transmission synaptique excitatrice rapide. En régulant la fonction des NMDAR, Src régule la LTP et la plasticité synaptique dépendante des NMDAR. Ainsi, Src pourrait jouer un rôle essentiel dans les processus qui sous-tendent la plasticité physiologique, y compris l'apprentissage et la mémoire.



**Figure 55 :** Schéma représentant notre hypothèse impliquant Src dans la plasticité synaptique dans des contextes physiologiques (a) et pathophysiologiques (b).

Compte tenu de tous ces éléments, nous émettons l'hypothèse que les variants de Src que nous avons identifiés pourraient contribuer au dysfonctionnement synaptique au cours de la pathogenèse de la MA. Nous avons déjà observé un déficit de la LTP dans des tranches d'hippocampe après l'induction de la sous-expression de Kindline-2 (306). Ce déficit était aboli lorsque l'APP et Kindline-2 étaient tous deux sous-exprimés, ce qui suggère un rôle de l'APP dans le mécanisme par lequel Kindline-2 affecte la LTP. L'APP peut en effet être associée aux récepteurs NMDAR et favoriser leur expression à la surface des cellules. En favorisant la localisation de l'APP à la surface des cellules, Src pourrait accroître l'expression des NMDAR et contribuer à l'hyperactivité neuronale.

Pour évaluer l'impact des variants de Src, des réseaux de microélectrodes (MEA) seront utilisés pour mesurer l'activité électrique spontanée des réseaux neuronaux en culture. Nos données préliminaires montrent que la surexpression du variant V177L de Src augmente l'activité électrique neuronale, plus particulièrement le nombre moyen de potentiels de champs (« *spikes* »), ainsi que la durée et la fréquence des « *bursts* » (cluster de *spikes*), suggérant un impact potentiel de ce variant sur la fonction synaptique.

L'effet du variant V177L de Src sera aussi étudié dans un contexte pathologique par exposition aux peptides A $\beta$ . Étant donné que ce variant favorise la production d'A $\beta$ , il pourrait renforcer le dysfonctionnement synaptique lié à ce peptide, caractéristique précoce de la maladie. De plus, des études montrent que les peptides A $\beta$  modulent directement la fonction électrophysiologique des NMDAR (450), ce qui pourrait exacerber les effets du variant V177L dans le contexte d'une exposition chronique à l'A $\beta$ .

Pour tester cette hypothèse, le laboratoire a développé un dispositif de co-culture microfluidique qui permet une exposition chronique des synapses à des concentrations physiologiques d'A $\beta$  (396). Ce dispositif sera adapté pour être compatible avec la MEA. Dans ce modèle, des lignées cellulaires CHO seront utilisées, surexprimant de manière stable l'APP humaine soit de type WT (CHO-APP<sup>WT</sup>) soit avec la mutation V717I (*London*) (CHO-APP<sup>LDN</sup>) qui sécrètent en continu des formes physiologiquement pertinentes de molécules A $\beta$  et fournissent des oligomères A $\beta$  toxiques. L'impact de l'exposition à l'A $\beta$  sur le profil électrique sera évalué sur des neurones issus d'iPSC (*Induced Pluripotent Stem Cells*) exprimant ou non le variant V177L de Src. Cette approche permettra d'évaluer l'effet synergique potentiel entre l'exposition aux peptides A $\beta$  et la transmission glutamatergique, connue pour être altérée dans la MA.

### **3. Étude de l'impact de la voie APP/KD2/Src sur la pathologie Tau**

Très peu de données sont actuellement disponibles pour relier les gènes définis par GWAS à la pathologie Tau et aux synapses. La drosophile a été utilisée 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 (451). Cette approche a permis d'identifier plusieurs gènes impliqués dans les adhésions focales, et notamment *FERMT2*, comme modulateurs de la pathologie Tau. Cette observation est cohérente avec une autre étude ayant décrit Kindline-2 comme un potentiel modulateur de la neurotoxicité médiée par Tau chez la drosophile (452). De plus, une étude chez la souris a montré que la sous-expression de Kindline-2 conduisait à l'activation de GSK3 $\beta$  (439), une kinase bien décrite pour phosphoryler Tau (453). De manière intéressante, nous avons observé que la sous-expression de Kindline-2 augmente l'activation de GSK3 $\beta$  dans les neurones. Ainsi, la sous-expression de Kindline-2 pourrait expliquer, en partie, le lien entre les pathologies amyloïdes et Tau.



De plus, plusieurs études suggèrent que Tau et A $\beta$  agissent de concert dans la dégénérescence des synapses (454–456). En effet, Tau a été impliquée dans la synaptotoxicité induite par l'exposition à l'A $\beta$  (457). La perte des épines dendritiques induite par l'A $\beta$  et la mort neuronale dépendrait de la phosphorylation de Tau (458,459). L'exposition à l'A $\beta$  modifierait l'état de phosphorylation de Tau et mènerait à une localisation anormale de Tau après l'activation synaptique (397). Comme nos résultats montrent l'existence d'une interaction fonctionnelle entre Kindline-2 et Src dans la régulation du métabolisme de l'APP, et que l'inhibition de Kindline-2 ou de Src augmente la production des peptides A $\beta$ , nous pourrions émettre l'hypothèse que la voie de signalisation APP / Kindline-2 / Src pourrait jouer un rôle clé dans l'effet néfaste sur la plasticité synaptique associé à l'APP et Tau. Ainsi, une perspective de ce projet de recherche pourrait se porter sur l'impact de la modulation de la voie APP / Kindline-2 / Src sur la pathologie Tau.

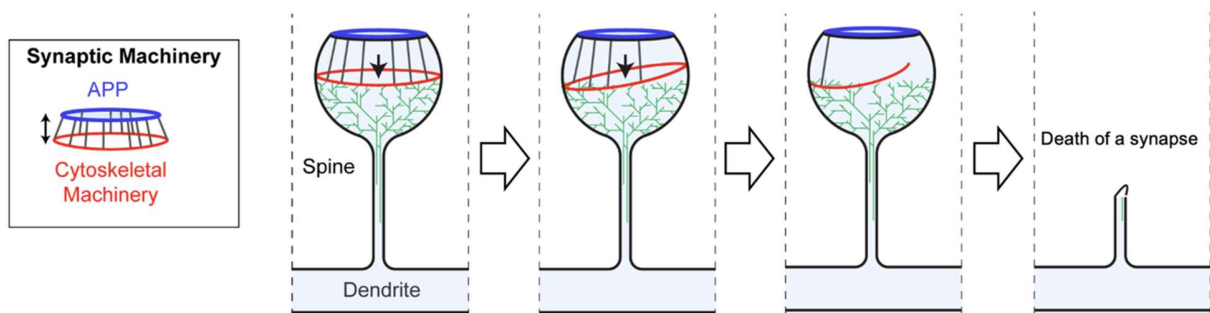
#### **4. Implication de Kindline-2 et APP dans la mécano-transduction synaptique**

Les cellules sont constamment soumises à des forces mécaniques qui influencent leur structure cellulaire, l'expression des gènes et des processus cellulaires tels que la migration et l'adhésion. Depuis quelques décennies, l'étude de ces signaux mécaniques a montré qu'ils jouaient un rôle crucial dans la régulation des fonctions cérébrales et le développement des maladies neurodégénératives (460–463). Il est établi que de nombreux événements mécaniques se produisent dans les neurones. En effet, les neurones possèdent des mécano-senseurs membranaires capables de convertir les forces physiques en signaux biochimiques à travers un processus appelé mécano-transduction. Par exemple, des études ont révélé que les forces mécaniques influencent l'activité du réseau neuronal (464), l'extension axonale (461) et les interactions neuronales en fonction des substrats (465). Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces dynamiques mécaniques restent encore à élucider.

Les adhésions focales basées sur les intégrines sont connues pour agir comme des mécano-senseurs spécialisés, régulant la motilité et le comportement des cellules (466,467). Des expériences cristallographiques ont montré que Kindline-2 peut former des dimères capables de se lier simultanément à deux intégrines, ce qui permet mécaniquement de renforcer l'activation et le regroupement des intégrines (251). En se basant sur cette structure moléculaire, une étude utilisant des simulations de dynamique moléculaire a modélisé la réponse du dimère de Kindline-2 en complexe avec l'intégrine aux forces mécaniques du cytosquelette (357). Ils ont montré que les forces appliquées sur les intégrines sont directement transmises au site de dimérisation de

Kindline-2, renforçant ainsi le lien, selon un mécanisme similaire à celui des « *catch-bond* » observés précédemment dans d'autres molécules d'adhésion (468). Kindline-2, en tant que protéine adaptatrice, jouerait un rôle essentiel dans la mécano-transduction par sa capacité à se dimériser et à renforcer les *clusters* d'intégrines sous l'effet des forces mécaniques (357).

Une étude récente suggère également un nouveau rôle pour l'APP en tant que « mécano-coupleur », fournissant un moyen physique de synchroniser des mécanismes de génération de force pré- et post-synaptiques (469). L'APP, en tant que molécule d'adhésion synaptique, serait capable de s'oligomériser pour former un réseau extracellulaire reliant directement la machinerie mécano-sensible des deux côtés de la synapse, assurant l'homéostasie mécanique synaptique.



**Figure 56 : Modèle conceptuel de la mécano-homéostasie et de la dyshoméostasie entraînant des changements synaptiques.** Le couplage de la machinerie de génération de force à la fente synaptique permet de contrôler l'activité synaptique. Des signaux mécaniques perturbés et la déstabilisation du complexe d'adhésion entraînent une augmentation du clivage de l'APP et la perte de la connexion entre la fente synaptique et le cytosquelette, une perte d'informations mais aussi une dyshoméostasie. Finalement, la perte des liaisons mécaniques entraîne la mort de la synapse, d'après Goult et *al.* (469).

Sur la base de ces études et du fait que Kindline-2 interagit avec l'APP, nous émettons l'hypothèse que le dimère de Kindline-2 pourrait exercer un rôle similaire à celui observé avec les intégrines, en soutenant la plasticité synaptique par un mécanisme de *clustering* de l'APP.

Par ailleurs, les mécanismes de régulation de Kindline-2 que nous avons identifiés, notamment son clivage par la caspase et la calpaïne, ainsi que son interaction fonctionnelle avec la kinase Src, pourraient avoir des impacts significatifs sur les processus de mécano-transduction décrits précédemment. D'une part, les clivages de Kindline-2 pourraient altérer sa capacité à se dimériser, perturbant ainsi son rôle dans le renforcement des *clusters* de l'APP en réponse aux forces mécaniques. Ces clivages pourraient réduire la stabilité ou la fonctionnalité de Kindline-2 dans les complexes d'adhésion focale, compromettant le soutien et la transmission de la force

dans les cellules. D'autre part, l'interaction fonctionnelle avec la kinase Src pourrait moduler directement l'activité de Kindline-2 dans la transmission des forces mécaniques. Une activation ou une inhibition de Src pourrait influencer sur la capacité de Kindline-2 à stabiliser les complexes d'adhésion, impactant ainsi le renforcement des *clusters* d'APP sous contrainte mécanique. Cela pourrait à la fois affecter les processus mécano-sensibles d'adhésion cellulaire et de plasticité synaptique, avec des implications potentielles dans les pathologies comme la MA, mais aussi dans les mécanismes plus généraux de signalisation synaptique dépendant des forces mécaniques.

Ainsi, au-delà de leurs implications dans la MA, une caractérisation précise des mécanismes de régulation de Kindline-2 pourrait apporter des données fondamentales sur le fonctionnement de la plasticité synaptique à la base des processus de mémorisation.

## Conclusion

Les résultats issus de cette thèse ont permis d'identifier de nouveaux mécanismes de régulation de la protéine Kindline-2 et du métabolisme de l'APP.

Les fonctions de Kindline-2 seraient régulées par des clivages au niveau des ses domaines F0 et F1, par les protéases caspase et calpaïne. Nos données suggèrent que les clivages de Kindline-2 pourraient être un mécanisme moléculaire impliqué dans la régulation du métabolisme de l'APP en inhibant la capacité de Kindline-2 à interagir avec ses partenaires. Les calpaïnes et les caspases sont connues pour être dérégulées au cours de la MA. Ainsi, au-delà des gens porteurs des variants de Kindline-2 associés au risque de MA, tel que le rs7143400-T, ces mécanismes de clivage pourraient être des mécanismes pertinents pour l'ensemble des cas de MA et conduire à de nombreuses perturbations synaptiques et ce, de façon dépendante de l'expression de l'APP.

De plus, pour la première fois, nos données suggèrent un lien entre trois déterminants génétiques de la MA, Src, Kindline-2 et APP, par le biais d'un mécanisme commun de régulation et d'interactions intermoléculaires directes. Nos données suggèrent que des variants rares de *SRC* pourraient jouer un rôle dans les processus dynamiques associés à l'APP, en passant par une régulation de l'activité de Kindline-2.

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

## RÉFÉRENCES

1. Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, Brodaty H, et al. Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol.* 1 avr 2016;15(5):455-532.
2. Berchtold NC, Cotman CW. Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease: Greco-Roman Period to the 1960s. *Neurobiol Aging.* 1 mai 1998;19(3):173-89.
3. Alzheimer A. Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters: (On certain peculiar diseases of old age. *Hist Psychiatry.* mars 1991;2(5):74-101.
4. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 16 mai 1984;120(3):885-90.
5. Brion JP, Couck AM, Passareiro E, Flament-Durand J. Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J Submicrosc Cytol.* janv 1985;17(1):89-96.
6. 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 J Alzheimers Assoc.* avr 2018;14(4):535-62.
7. Bateman RJ, Xiong C, Benzinger TLS, Fagan AM, Goate A, Fox NC, et al. Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease. *N Engl J Med.* 30 août 2012;367(9):795-804.
8. Li TR, Yang Q, Hu X, Han Y. Biomarkers and Tools for Predicting Alzheimer's Disease in the Preclinical Stage. *Curr Neuropharmacol.* 28 mars 2022;20(4):713-37.
9. Porsteinsson AP, Isaacson RS, Knox S, Sabbagh MN, Rubino I. Diagnosis of Early Alzheimer's Disease: Clinical Practice in 2021. *J Prev Alzheimers Dis.* 1 juill 2021;8(3):371-86.
10. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc.* mai 2011;7(3):263-9.
11. Jack CR, Petersen RC, Xu Y, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, et al. Rates of hippocampal atrophy correlate with change in clinical status in aging and AD. *Neurology.* 22 août 2000;55(4):484-90.
12. Du AT, Schuff N, Zhu XP, Jagust WJ, Miller BL, Reed BR, et al. Atrophy rates of entorhinal cortex in AD and normal aging. *Neurology.* 11 févr 2003;60(3):481-6.
13. Scott SA, Sparks DL, Scheff SW, Dekosky ST, Knox CA. Amygdala cell loss and atrophy in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1992;32(4):555-63.

14. Laakso MP, Partanen K, Riekkinen P, Lehtovirta M, Helkala EL, Hallikainen M, et al. Hippocampal volumes in Alzheimer's disease, Parkinson's disease with and without dementia, and in vascular dementia: An MRI study. *Neurology*. mars 1996;46(3):678-81.
15. Rosen HJ, Gorno-Tempini ML, Goldman WP, Perry RJ, Schuff N, Weiner M, et al. Patterns of brain atrophy in frontotemporal dementia and semantic dementia. *Neurology*. 22 janv 2002;58(2):198-208.
16. Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res*. déc 1986;387(3):271-80.
17. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. juill 1986;83(13):4913-7.
18. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. mai 1975;72(5):1858-62.
19. Barbier P, Zejneli O, Martinho M, Lasorsa A, Belle V, Smet-Nocca C, et al. Role of Tau as a Microtubule-Associated Protein: Structural and Functional Aspects. *Front Aging Neurosci*. 7 août 2019;11:204.
20. Mondragón-Rodríguez S, Trillaud-Doppia E, Dudilot A, Bourgeois C, Lauzon M, Leclerc N, et al. Interaction of Endogenous Tau Protein with Synaptic Proteins Is Regulated by N-Methyl-D-aspartate Receptor-dependent Tau Phosphorylation. *J Biol Chem*. 14 sept 2012;287(38):32040-53.
21. 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.
22. Cicognola C, Brinkmalm G, Wahlgren J, Portelius E, Gobom J, Cullen NC, et al. Novel tau fragments in cerebrospinal fluid: relation to tangle pathology and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2019;137(2):279-96.
23. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1991;82(4):239-59.
24. Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, et al. Early A $\beta$  accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*. 23 mars 2004;62(6):925-31.
25. Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussi re T, Bouras C, Kovari E, Perl DP, et al. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology*. 13 mai 2003;60(9):1495-500.
26. Goedert M. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A $\beta$ , tau, and  $\alpha$ -synuclein. *Science*. 7 août 2015;349(6248):1255555.

27. Buée L, Delacourte A. La maladie d'Alzheimer : une tauopathie parmi d'autres ? médecine/sciences. 1 juin 2002;18(6-7):727-36.
28. Cataldo AM, Nixon RA. Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain. *Proc Natl Acad Sci*. mai 1990;87(10):3861-5.
29. Iwamoto N, Thangnipon W, Crawford C, Emson PC. Localization of calpain immunoreactivity in senile plaques and in neurones undergoing neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 4 oct 1991;561(1):177-80.
30. Mori T, Paris D, Town T, Rojiani AM, Sparks DL, Delledonne A, et al. Cholesterol accumulates in senile plaques of Alzheimer disease patients and in transgenic APP(SW) mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. août 2001;60(8):778-85.
31. Dickson TC, Saunders HL, Vickers JC. Relationship between apolipoprotein E and the amyloid deposits and dystrophic neurites of Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. déc 1997;23(6):483-91.
32. Eikelenboom P, Hack CE, Rozemuller JM, Stam FC. Complement activation in amyloid plaques in Alzheimer's dementia. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1989;56(4):259-62.
33. Querol-Vilaseca M, Colom-Cadena M, Pegueroles J, Nuñez-Llaves R, Luque-Cabecerans J, Muñoz-Llahuna L, et al. Nanoscale structure of amyloid- $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 26 mars 2019;9(1):5181.
34. 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.
35. Braak H, Del Tredici K. Neuroanatomy and pathology of sporadic Alzheimer's disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2015;215:1-162.
36. Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, et al. Amyloid  $\beta$  deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol*. avr 2013;12(4):357-67.
37. Jack CR, Wiste HJ, Lesnick TG, Weigand SD, Knopman DS, Vemuri P, et al. Brain  $\beta$ -amyloid load approaches a plateau. *Neurology*. 5 mars 2013;80(10):890-6.
38. Meyer PF, McSweeney M, Gonneaud J, Villeneuve S. 1ci - AD molecular: PET amyloid imaging across the Alzheimer's disease spectrum: From disease mechanisms to prevention. In: Becker JT, Cohen AD, éditeurs. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. Academic Press; 2019 [cité 6 juill 2024]. p. 63-106. (Brain Imaging; vol. 165). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877117319300791>
39. Gao C, Jiang J, Tan Y, Chen S. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther*. 22 sept 2023;8(1):1-37.
40. Pannasch U, Rouach N. Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends Neurosci*. 1 juill 2013;36(7):405-17.

41. Kaur D, Sharma V, Deshmukh R. Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*. 1 août 2019;27(4):663-77.
42. Kloske CM, Wilcock DM. The Important Interface Between Apolipoprotein E and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Front Immunol*. 30 avr 2020;11:754.
43. Sun Z, Zhang X, So KF, Jiang W, Chiu K. Targeting Microglia in Alzheimer's Disease: Pathogenesis and Potential Therapeutic Strategies. *Biomolecules*. juill 2024;14(7):833.
44. Dursun E, Gezen-Ak D, Hanağası H, Bilgiç B, Lohmann E, Ertan S, et al. The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *J Neuroimmunol*. 15 juin 2015;283:50-7.
45. Park JC, Han SH, Mook-Jung I. Peripheral inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease: a brief review. *BMB Rep*. janv 2020;53(1):10-9.
46. Leung R, Proitsi P, Simmons A, Lunnon K, Güntert A, Kronenberg D, et al. Inflammatory Proteins in Plasma Are Associated with Severity of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*. 10 juin 2013;8(6):e64971.
47. Motta M, Imbesi R, Di Rosa M, Stivala F, Malaguarnera L. Altered plasma cytokine levels in Alzheimer's disease: Correlation with the disease progression. *Immunol Lett*. 30 nov 2007;114(1):46-51.
48. Wang WY, Tan MS, Yu JT, Tan L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med*. juin 2015;3(10):136-136.
49. Doens D, Fernández PL. Microglia receptors and their implications in the response to amyloid  $\beta$  for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation*. 13 mars 2014;11:48.
50. Lawlor PA, Young D. A $\beta$  Infusion and Related Models of Alzheimer Dementia. In: De Deyn PP, Van Dam D, éditeurs. *Animal Models of Dementia* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [cité 18 août 2024]. p. 347-70. Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-898-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-898-0_17)
51. Das R, Balmik AA, Chinnathambi S. Phagocytosis of full-length Tau oligomers by Actin-remodeling of activated microglia. *J Neuroinflammation*. 8 janv 2020;17(1):10.
52. Leyns CEG, Holtzman DM. Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies. *Mol Neurodegener*. 29 juin 2017;12(1):50.
53. Quintanilla RA, Orellana DI, González-Billault C, Maccioni RB. Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway. *Exp Cell Res*. 15 avr 2004;295(1):245-57.
54. DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. *Ann Neurol*. 1990;27(5):457-64.



55. Mecca AP, O'Dell RS, Sharp ES, Banks ER, Bartlett HH, Zhao W, et al. Synaptic density and cognitive performance in Alzheimer's disease: A PET imaging study with [11C]UCB-J. *Alzheimers Dement*. 2022;18(12):2527-36.
56. 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 Austria* 1996. 1996;103(5):603-18.
57. 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.
58. 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.
59. Scheff SW, Price DA, Ansari MA, Roberts KN, Schmitt FA, Ikonovic MD, et al. Synaptic Change in the Posterior Cingulate Gyrus in the Progression of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis JAD*. 2015;43(3):1073-90.
60. Davies CA, Mann DM, 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. *J Neurol Sci*. avr 1987;78(2):151-64.
61. 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.
62. B D, J T, F P, Pj O, B V, B M. ["The 5 words": a simple and sensitive test for the diagnosis of Alzheimer's disease]. *Presse Medicale Paris Fr* 1983 [Internet]. 11 sept 2002 [cité 29 juin 2024];31(36). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12467149/>
63. H B, G K, M K, Wf S, Mj S, Hm E, et al. Screening for dementia with the memory impairment screen. *Neurology* [Internet]. 15 janv 1999 [cité 29 juin 2024];52(2). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9932936/>
64. Stroop JR. Studies of interference in serial verbal reactions. *J Exp Psychol*. 1935;18(6):643-62.
65. Reitan RM. Validity of the Trail Making Test as an indicator of organic brain damage. *Percept Mot Skills*. 1958;8:271-6.
66. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. « Mini-mental state ». A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. nov 1975;12(3):189-98.
67. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bédirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc*. avr 2005;53(4):695-9.

68. Cummings JL, Mega M, Gray K, Rosenberg-Thompson S, Carusi DA, Gornbein J. The Neuropsychiatric Inventory: Comprehensive assessment of psychopathology in dementia. *Neurology*. 1994;44(12):2308-14.
69. Reisberg B, Borenstein J, Salob SP, Ferris SH, et al. Behavioral symptoms in Alzheimer's disease: Phenomenology and treatment. *J Clin Psychiatry*. 1987;48(5, Suppl):9-15.
70. Barberger-Gateau P, Commenges D, Gagnon M, Letenneur L, Sauvel C, Dartigues JF. Instrumental activities of daily living as a screening tool for cognitive impairment and dementia in elderly community dwellers. *J Am Geriatr Soc*. nov 1992;40(11):1129-34.
71. Galasko D, Bennett D, Sano M, Ernesto C, Thomas R, Grundman M, et al. An inventory to assess activities of daily living for clinical trials in Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1997;11 Suppl 2:S33-39.
72. Vemuri P, Jack CR. Role of structural MRI in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 31 août 2010;2(4):23.
73. 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.
74. Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, et al. CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 1 juin 2016;15(7):673-84.
75. ten Kate M, Ingala S, Schwarz AJ, Fox NC, Chételat G, van Berckel BNM, et al. Secondary prevention of Alzheimer's dementia: neuroimaging contributions. *Alzheimers Res Ther*. 30 oct 2018;10:112.
76. Zhang B, Zhang C, Wang Y, Chen L, Qiao Y, Wang Y, et al. Effect of renal function on the diagnostic performance of plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*. 15 mars 2023;15:1150510.
77. Wu J, Xiao Z, Wang M, Wu W, Ma X, Liang X, et al. The impact of kidney function on plasma neurofilament light and phospho-tau 181 in a community-based cohort: the Shanghai Aging Study. *Alzheimers Res Ther*. 12 févr 2024;16(1):32.
78. Martínez-Dubarbíe F, Guerra-Ruiz A, López-García S, Irure-Ventura J, Lage C, Fernández-Matarrubia M, et al. Influence of Physiological Variables and Comorbidities on Plasma A $\beta$ 40, A $\beta$ 42, and p-tau181 Levels in Cognitively Unimpaired Individuals. *Int J Mol Sci*. 25 janv 2024;25(3):1481.
79. Jansen WJ, Ossenkoppelaar R, Knol DL, Tijms BM, Scheltens P, Verhey FRJ, et al. Prevalence of Cerebral Amyloid Pathology in Persons Without Dementia. *JAMA*. 19 mai 2015;313(19):1924-38.
80. Rossom R, Adityanjee, Dysken M. Efficacy and tolerability of memantine in the treatment of dementia. *Am J Geriatr Pharmacother*. 1 déc 2004;2(4):303-12.

81. Mimica N, Presecki P. Side effects of approved antidementives. *Psychiatr Danub*. mars 2009;21(1):108-13.
82. Zucchella C, Sinforiani E, Tamburin S, Federico A, Mantovani E, Bernini S, et al. The Multidisciplinary Approach to Alzheimer's Disease and Dementia. A Narrative Review of Non-Pharmacological Treatment. *Front Neurol* [Internet]. 13 déc 2018 [cité 2 juill 2024];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/neurology/articles/10.3389/fneur.2018.01058/full>
83. Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- $\beta$  Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *J Neurosci*. 14 mars 2007;27(11):2866-75.
84. Lacor PN, Buniel MC, Furlow PW, Sanz Clemente A, Velasco PT, Wood M, et al. A $\beta$  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.
85. Selkoe DJ. Soluble Oligomers of the Amyloid  $\beta$ -Protein Impair Synaptic Plasticity and Behavior. *Behav Brain Res*. 1 sept 2008;192(1):106-13.
86. van Dyck Christopher H., Swanson Chad J., Aisen Paul, Bateman Randall J., Chen Christopher, Gee Michelle, et al. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 4 janv 2023;388(1):9-21.
87. Sims JR, Zimmer JA, Evans CD, Lu M, Ardayfio P, Sparks J, et al. Donanemab in Early Symptomatic Alzheimer Disease. *JAMA*. 8 août 2023;330(6):512-27.
88. Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol*. déc 2010;23(4):213-27.
89. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. févr 1991;349(6311):704-6.
90. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 18 août 1995;269(5226):973-7.
91. Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. juin 1995;375(6534):754-60.
92. Rohan de Silva HA, Jen A, Wickenden C, Jen LS, Wilkinson SL, Patel AJ. Cell-specific expression of  $\beta$ -amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Mol Brain Res*. 1 juill 1997;47(1):147-56.
93. Delport A, Hewer R. The amyloid precursor protein: a converging point in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 1 juill 2022;59(7):4501-16.

94. Zheng H, Koo EH. The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener.* 2006;1:5.
95. Hoe HS, Lee KJ, Carney RSE, Lee J, Markova A, Lee JY, et al. Interaction of Reelin with Amyloid Precursor Protein Promotes Neurite Outgrowth. *J Neurosci.* 10 juin 2009;29(23):7459-73.
96. Small D, Nurcombe V, Reed G, Clarris H, Moir R, Beyreuther K, et al. A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci.* 1 avr 1994;14(4):2117-27.
97. Ho A, Südhof TC. Binding of F-spondin to amyloid- $\beta$  precursor protein: A candidate amyloid- $\beta$  precursor protein ligand that modulates amyloid- $\beta$  precursor protein cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 févr 2004;101(8):2548.
98. Rossjohn J, Cappai R, Feil SC, Henry A, McKinstry WJ, Galatis D, et al. Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat Struct Biol.* avr 1999;6(4):327-31.
99. Soba P, Eggert S, Wagner K, Zentgraf H, Siehl K, Kreger S, et al. Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J.* 19 oct 2005;24(20):3624-34.
100. Takai Y, Shimizu K, Ohtsuka T. The roles of cadherins and nectins in interneuronal synapse formation. *Curr Opin Neurobiol.* 1 oct 2003;13(5):520-6.
101. Baumkötter F, Wagner K, Eggert S, Wild K, Kins S. Structural aspects and physiological consequences of APP/APLP trans-dimerization. *Exp Brain Res.* 2012;217(3):389-95.
102. Wang Z, Wang B, Yang L, Guo Q, Aithmitti N, Songyang Z, et al. Presynaptic and Postsynaptic Interaction of the Amyloid Precursor Protein Promotes Peripheral and Central Synaptogenesis. *J Neurosci.* 2 sept 2009;29(35):10788-801.
103. 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.
104. 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.
105. Deyts C, Thinakaran G, Parent AT. APP receptor? To be or not to be.... *Trends Pharmacol Sci.* mai 2016;37(5):390-411.
106. Sabo SL, Ikin AF, Buxbaum JD, Greengard P. The Amyloid Precursor Protein and Its Regulatory Protein, FE65, in Growth Cones and Synapses In Vitro and In Vivo. *J Neurosci.* 2 juill 2003;23(13):5407-15.
107. Guénette SY, Chen J, Ferland A, Haass C, Capell A, Tanzi RE. hFE65L Influences Amyloid Precursor Protein Maturation and Secretion. *J Neurochem.* 1999;73(3):985-93.

108. Sabo SL, Lanier LM, Ikin AF, Khorkova O, Sahasrabudhe S, Greengard P, et al. Regulation of beta-amyloid secretion by FE65, an amyloid protein precursor-binding protein. *J Biol Chem*. 19 mars 1999;274(12):7952-7.
109. Ashley J, Packard M, Ataman B, Budnik V. Fasciclin II signals new synapse formation through amyloid precursor protein and the scaffolding protein dX11/Mint. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 22 juin 2005;25(25):5943-55.
110. Rogelj B, Mitchell JC, Miller CCJ, McLoughlin DM. The X11/Mint family of adaptor proteins. *Brain Res Rev*. 1 sept 2006;52(2):305-15.
111. Sullivan SE, Dillon GM, Sullivan JM, Ho A. Mint Proteins Are Required for Synaptic Activity-dependent Amyloid Precursor Protein (APP) Trafficking and Amyloid  $\beta$  Generation\*. *J Biol Chem*. 30 mai 2014;289(22):15374-83.
112. Young-Pearse TL, Chen AC, Chang R, Marquez C, Selkoe DJ. Secreted APP regulates the function of full-length APP in neurite outgrowth through interaction with integrin beta1. *Neural Develop*. 23 juin 2008;3:15.
113. Perez RG, Zheng H, Van der Ploeg LHT, Koo EH. The  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein of Alzheimer's Disease Enhances Neuron Viability and Modulates Neuronal Polarity. *J Neurosci*. 15 déc 1997;17(24):9407-14.
114. Small DH, Clarris HL, Williamson TG, Reed G, Key B, Mok SS, et al. Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD*. nov 1999;1(4-5):275-85.
115. Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, LoTurco JJ, Selkoe DJ. A Critical Function for  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein in Neuronal Migration Revealed by In Utero RNA Interference. *J Neurosci*. 26 déc 2007;27(52):14459-69.
116. 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*. 14 mai 2013;8(5):e64521.
117. Kibbey MC, Jucker M, Weeks BS, Neve RL, Van Nostrand WE, Kleinman HK. beta-Amyloid precursor protein binds to the neurite-promoting IKVAV site of laminin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 nov 1993;90(21):10150-3.
118. Clarris HJ, Cappai R, Heffernan D, Beyreuther K, Masters CL, Small DH. Identification of heparin-binding domains in the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease by deletion mutagenesis and peptide mapping. *J Neurochem*. mars 1997;68(3):1164-72.
119. Behr D, Hesse L, Masters CL, Multhaup G. Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J Biol Chem*. 19 janv 1996;271(3):1613-20.
120. Clarris HJ, Key B, Beyreuther K, Masters CL, Small DH. Expression of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease in the developing rat olfactory system. *Brain Res Dev Brain Res*. 28 août 1995;88(1):87-95.

121. Dawkins E, Small DH. Insights into the physiological function of the  $\beta$ -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem*. juin 2014;129(5):756-69.
122. Ludewig S, Korte M. Novel Insights into the Physiological Function of the APP (Gene) Family and Its Proteolytic Fragments in Synaptic Plasticity. *Front Mol Neurosci*. 20 janv 2017;9:161.
123. Gentleman SM, Nash MJ, Sweeting CJ, Graham DI, Roberts GW.  $\beta$ -Amyloid precursor protein ( $\beta$ APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci Lett*. 1 oct 1993;160(2):139-44.
124. Corrigan F, Thornton E, Roisman LC, Leonard AV, Vink R, Blumbergs PC, et al. The neuroprotective activity of the amyloid precursor protein against traumatic brain injury is mediated via the heparin binding site in residues 96-110. *J Neurochem*. janv 2014;128(1):196-204.
125. Corrigan F, Pham CLL, Vink R, Blumbergs PC, Masters CL, van den Heuvel C, et al. The neuroprotective domains of the amyloid precursor protein, in traumatic brain injury, are located in the two growth factor domains. *Brain Res*. 10 mars 2011;1378:137-43.
126. Itoh T, Satou T, Nishida S, Tsubaki M, Hashimoto S, Ito H. Expression of amyloid precursor protein after rat traumatic brain injury. *Neurol Res*. févr 2009;31(1):103-9.
127. Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, et al. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Neuroscience*. 5 févr 1999;90(1):1-13.
128. Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJ, Hopkins R, Smith DW, et al. beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell*. 19 mai 1995;81(4):525-31.
129. Phinney AL, Calhoun ME, Wolfer DP, Lipp HP, Zheng H, Jucker M. No hippocampal neuron or synaptic bouton loss in learning-impaired aged beta-amyloid precursor protein-null mice. *Neuroscience*. 1999;90(4):1207-16.
130. Seabrook GR, Smith DW, Bowery BJ, Easter A, Reynolds T, Fitzjohn SM, et al. Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology*. 14 mars 1999;38(3):349-59.
131. Lee KJ, Moussa CEH, Lee Y, Sung Y, Howell BW, Turner RS, et al. Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. *Neuroscience*. 11 août 2010;169(1):344-56.
132. Senechal Y, Kelly PH, Dev KK. Amyloid precursor protein knockout mice show age-dependent deficits in passive avoidance learning. *Behav Brain Res*. 10 janv 2008;186(1):126-32.
133. Gabriele RMC, Abel E, Fox NC, Wray S, Arber C. Knockdown of Amyloid Precursor Protein: Biological Consequences and Clinical Opportunities. *Front Neurosci*. 14 mars 2022;16:835645.

134. Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, et al. The Secreted  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Ectodomain APP $\alpha$  Is Sufficient to Rescue the Anatomical, Behavioral, and Electrophysiological Abnormalities of APP-Deficient Mice. *J Neurosci*. 18 juill 2007;27(29):7817-26.
135. 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*. 9 déc 2015;35(49):16018-33.
136. Müller UC, Zheng H. Physiological Functions of APP Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med*. févr 2012;2(2):a006288.
137. Lorenzen A, Samosh J, Vandewark K, Anborgh PH, Seah C, Magalhaes AC, et al. Rapid and Direct Transport of Cell Surface APP to the Lysosome defines a novel selective pathway. *Mol Brain*. 21 avr 2010;3:11.
138. Vetrivel KS, Zhang Y, Xu H, Thinakaran G. Pathological and physiological functions of presenilins. *Mol Neurodegener*. 12 juin 2006;1:4.
139. Toh WH, Gleeson PA. Dysregulation of intracellular trafficking and endosomal sorting in Alzheimer's disease: controversies and unanswered questions. *Biochem J*. 15 juill 2016;473(14):1977-93.
140. Lichtenthaler SF. Alpha-secretase in Alzheimer's disease: molecular identity, regulation and therapeutic potential. *J Neurochem*. 2011;116(1):10-21.
141. Suh YH, Checler F. Amyloid Precursor Protein, Presenilins, and  $\alpha$ -Synuclein: Molecular Pathogenesis and Pharmacological Applications in Alzheimer's Disease. *Pharmacol Rev*. 1 sept 2002;54(3):469-525.
142. Gowing E, Roher AE, Woods AS, Cotter RJ, Chaney M, Little SP, et al. Chemical characterization of A $\beta$  17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Biol Chem*. 15 avr 1994;269(15):10987-90.
143. Penke B, Bogár F, Fülöp L.  $\beta$ -Amyloid and the Pathomechanisms of Alzheimer's Disease: A Comprehensive View. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem*. 10 oct 2017;22(10):1692.
144. Wolfe MS. Structure and Function of the  $\gamma$ -Secretase Complex. *Biochemistry*. 9 juill 2019;58(27):2953-66.
145. Nalivaeva NN, Turner AJ. The amyloid precursor protein: A biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett*. 2013;587(13):2046-54.
146. LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. juill 2007;8(7):499-509.
147. Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry*. 11 mai 1993;32(18):4693-7.

148. Sgourakis NG, Yan Y, McCallum SA, Wang C, Garcia AE. The Alzheimer's peptides Abeta40 and 42 adopt distinct conformations in water: a combined MD / NMR study. *J Mol Biol.* 18 mai 2007;368(5):1448-57.
149. Gravina SA, Ho L, Eckman CB, Long KE, Otvos L, Younkin LH, et al. Amyloid beta protein (A beta) in Alzheimer's disease brain. Biochemical and immunocytochemical analysis with antibodies specific for forms ending at A beta 40 or A beta 42(43). *J Biol Chem.* 31 mars 1995;270(13):7013-6.
150. Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron.* juill 1994;13(1):45-53.
151. Zhang Z, Song M, Liu X, Su Kang S, Duong DM, Seyfried NT, et al. Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 9 nov 2015;6:8762.
152. Baranger K, Marchalant Y, Bonnet AE, Crouzin N, Carrete A, Paumier JM, et al. MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 23 juill 2015;73(1):217-36.
153. Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovsepian SV, Chafai M, Kootar S, et al.  $\eta$ -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature.* oct 2015;526(7573):443-7.
154. Afram E, Lauritzen I, Bourgeois A, El Manaa W, Duplan E, Chami M, et al. The  $\eta$ -secretase-derived APP fragment  $\eta$ CTF is localized in Golgi, endosomes and extracellular vesicles and contributes to A $\beta$  production. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 17 mars 2023;80(4):97.
155. Jefferson T, Čaušević M, auf dem Keller U, Schilling O, Isbert S, Geyer R, et al. Metalloprotease Meprin  $\beta$  Generates Nontoxic N-terminal Amyloid Precursor Protein Fragments in Vivo. *J Biol Chem.* 5 août 2011;286(31):27741-50.
156. Marengo L, Armbrust F, Schoenherr C, Storck SE, Schmitt U, Zampar S, et al. Meprin  $\beta$  knockout reduces brain A $\beta$  levels and rescues learning and memory impairments in the APP/Ion mouse model for Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2 mars 2022;79(3):168.
157. Lu DC, Soriano S, Bredesen DE, Koo EH. Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid beta-protein toxicity. *J Neurochem.* nov 2003;87(3):733-41.
158. Bredesen DE, John V, Galvan V. Importance of the Caspase Cleavage Site in Amyloid- $\beta$  Protein Precursor. *J Alzheimers Dis JAD.* 2010;22(1):57-63.
159. Tackenberg C, Nitsch RM. The secreted APP ectodomain sAPP $\alpha$ , but not sAPP $\beta$ , protects neurons against A $\beta$  oligomer-induced dendritic spine loss and increased tau phosphorylation. *Mol Brain.* 29 mars 2019;12:27.
160. Dorard E, Chasseigneaux S, Gorisse-Hussonnois L, Broussard C, Pillot T, Allinquant B. Soluble Amyloid Precursor Protein Alpha Interacts with alpha3-Na, K-ATPase to Induce



Axonal Outgrowth but Not Neuroprotection: Evidence for Distinct Mechanisms Underlying these Properties. *Mol Neurobiol.* juill 2018;55(7):5594-610.

161. Rice HC, de Malmazet D, Schreurs A, Frere S, Van Molle I, Volkov AN, et al. Secreted Amyloid- $\beta$  Precursor Protein Functions as a GABABR1a Ligand to Modulate Synaptic Transmission. *Science.* 11 janv 2019;363(6423):eaao4827.
162. Obregon D, Hou H, Deng J, Giunta B, Tian J, Darlington D, et al. sAPP- $\alpha$  modulates  $\beta$ -secretase activity and amyloid- $\beta$  generation. *Nat Commun.* 10 avr 2012;3:777.
163. Peters-Libeu C, Campagna J, Mitsumori M, Poksay KS, Spilman P, Sabogal A, et al. sA $\beta$ PP $\alpha$  is a Potent Endogenous Inhibitor of BACE1. *J Alzheimers Dis JAD.* 2015;47(3):545-55.
164. Mockett BG, Guévremont D, Elder MK, Parfitt KD, Peppercorn K, Morrissey J, et al. Glutamate Receptor Trafficking and Protein Synthesis Mediate the Facilitation of LTP by Secreted Amyloid Precursor Protein-Alpha. *J Neurosci.* 24 avr 2019;39(17):3188-203.
165. Tian Y, Crump CJ, Li YM. Dual Role of  $\alpha$ -Secretase Cleavage in the Regulation of  $\gamma$ -Secretase Activity for Amyloid Production. *J Biol Chem.* 15 oct 2010;285(42):32549-56.
166. Jäger S, Leuchtenberger S, Martin A, Czirr E, Wesselowski J, Dieckmann M, et al. alpha-secretase mediated conversion of the amyloid precursor protein derived membrane stub C99 to C83 limits Abeta generation. *J Neurochem.* déc 2009;111(6):1369-82.
167. Kuhn AJ, Raskatov J. Is the p3 (A $\beta$ 17–40, A $\beta$ 17–42) peptide relevant to the pathology of Alzheimer's Disease? *J Alzheimers Dis JAD.* 2020;74(1):43-53.
168. Pardossi-Piquard R, Checler F. The physiology of the  $\beta$ -amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem.* 2012;120(s1):109-24.
169. Takasugi N, Komai M, Kaneshiro N, Ikeda A, Kamikubo Y, Uehara T. The Pursuit of the "Inside" of the Amyloid Hypothesis—Is C99 a Promising Therapeutic Target for Alzheimer's Disease? *Cells.* 31 janv 2023;12(3):454.
170. Bourgeois A, Lauritzen I, Lorivel T, Bauer C, Checler F, Pardossi-Piquard R. Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3 $\times$ TgAD and 2 $\times$ TgAD mice. *Neurobiol Aging.* 1 nov 2018;71:21-31.
171. Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, et al. Picomolar Amyloid- $\beta$  Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus. *J Neurosci.* 31 déc 2008;28(53):14537-45.
172. Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I. Amyloid- $\beta$  as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci.* déc 2009;12(12):1567-76.
173. Cai W, Li L, Sang S, Pan X, Zhong C. Physiological Roles of  $\beta$ -amyloid in Regulating Synaptic Function: Implications for AD Pathophysiology. *Neurosci Bull.* 28 nov 2022;39(8):1289-308.

174. Kent SA, Spires-Jones TL, Durrant CS. The physiological roles of tau and A $\beta$ : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1 oct 2020;140(4):417-47.
175. Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, et al. The Alzheimer's Disease-Associated Amyloid  $\beta$ -Protein Is an Antimicrobial Peptide. *PLoS ONE*. 3 mars 2010;5(3):e9505.
176. Moir RD, Lathe R, Tanzi RE. The antimicrobial protection hypothesis of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 1 déc 2018;14(12):1602-14.
177. Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci*. mars 2012;15(3):349-57.
178. Mucke L, Selkoe DJ. Neurotoxicity of Amyloid  $\beta$ -Protein: Synaptic and Network Dysfunction. *Cold Spring Harb Perspect Med*. juill 2012;2(7):a006338.
179. Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL. The Amyloid- $\beta$  Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J Alzheimers Dis*. 64(Suppl 1):S567-610.
180. Park G, Nhan HS, Tyan SH, Kawakatsu Y, Zhang C, Navarro M, et al. Caspase Activation and Caspase-Mediated Cleavage of APP Is Associated with Amyloid  $\beta$ -Protein-Induced Synapse Loss in Alzheimer's Disease. *Cell Rep*. 30 juin 2020;31(13):107839.
181. Fanutza T, Del Prete D, Ford MJ, Castillo PE, D'Adamio L. APP and APLP2 interact with the synaptic release machinery and facilitate transmitter release at hippocampal synapses. De Strooper B, éditeur. *eLife*. 9 nov 2015;4:e09743.
182. Madeira A, Pommet JM, Prochiantz A, Allinquant B. SET protein (TAF1 $\beta$ , I2PP2A) is involved in neuronal apoptosis induced by an amyloid precursor protein cytoplasmic subdomain. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. nov 2005;19(13):1905-7.
183. Schönherr C, Bien J, Isbert S, Wichert R, Prox J, Altmeyden H, et al. Generation of aggregation prone N-terminally truncated amyloid  $\beta$  peptides by meprin  $\beta$  depends on the sequence specificity at the cleavage site. *Mol Neurodegener*. 19 févr 2016;11:19.
184. Mensch M, Dunot J, Yishan SM, Harris SS, Blstein A, Avdiu A, et al. A $\eta$ - $\alpha$  and A $\eta$ - $\beta$  peptides impair LTP ex vivo within the low nanomolar range and impact neuronal activity in vivo. *Alzheimers Res Ther*. 8 juill 2021;13:125.
185. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*. août 1995;376(6543):775-8.
186. De Strooper B. Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin Generate an Active  $\gamma$ -Secretase Complex. *Neuron*. 10 avr 2003;38(1):9-12.
187. Sun Y, Islam S, Michikawa M, Zou K. Presenilin: A Multi-Functional Molecule in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. janv 2024;25(3):1757.

188. Zhang X, Li Y, Xu H, Zhang Y, Wu. The  $\gamma$ -secretase complex: from structure to function. *Front Cell Neurosci.* 11 déc 2014;8:427.
189. Steiner H, Fukumori A, Tagami S, Okochi M. Making the final cut: pathogenic amyloid- $\beta$  peptide generation by  $\gamma$ -secretase. *Cell Stress.* 28 oct 2018;2(11):292-310.
190. De Jonghe C, Esselens C, Kumar-Singh S, Craessaerts K, Serneels S, Checler F, et al. Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and APP C-terminal fragment stability. *Hum Mol Genet.* 1 août 2001;10(16):1665-71.
191. Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, et al. A New Pathogenic Mutation in the APP Gene (I716V) Increases the Relative Proportion of A $\beta$ 42(43). *Hum Mol Genet.* 1 nov 1997;6(12):2087-9.
192. Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, et al. The « Arctic » APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced A $\beta$  protofibril formation. *Nat Neurosci.* sept 2001;4(9):887-93.
193. Pagnon de la Vega M, Giedraitis V, Michno W, Kilander L, Güner G, Zielinski M, et al. The Uppsala APP deletion causes early onset autosomal dominant Alzheimer's disease by altering APP processing and increasing amyloid  $\beta$  fibril formation. *Sci Transl Med.* 11 août 2021;13(606):eabc6184.
194. Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Meur NL, 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.
195. 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.* août 2012;488(7409):96-9.
196. Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* avr 1997;20(4):154-9.
197. Lott IT, Head E. Dementia in Down syndrome: unique insights for Alzheimer disease research. *Nat Rev Neurol.* mars 2019;15(3):135-47.
198. Herrup K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci.* juin 2015;18(6):794-9.
199. Bryan KJ, Lee H, Gon, Perry G, Smith MA, Casadesus G. Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease: Behavioral Testing and Considerations. In: Buccafusco JJ, éditeur. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience* [Internet]. 2nd éd. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009 [cité 15 août 2024]. (Frontiers in Neuroscience). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5231/>
200. Schwab C, Hosokawa M, McGeer PL. Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease. *Exp Neurol.* 1 juill 2004;188(1):52-64.

201. Kitazawa M, Medeiros R, LaFerla FM. Transgenic Mouse Models of Alzheimer Disease: Developing a Better Model as a Tool for Therapeutic Interventions. *Curr Pharm Des.* 2012;18(8):1131-47.
202. Livingston G, Huntley J, Liu KY, Costafreda SG, Selbæk G, Alladi S, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2024 report of the *Lancet* standing Commission. *The Lancet.* 10 août 2024;404(10452):572-628.
203. Li R, Cui J, Shen Y. Brain Sex Matters: estrogen in cognition and Alzheimer's disease. *Mol Cell Endocrinol.* 25 mai 2014;389(0):13-21.
204. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry.* févr 2006;63(2):168-74.
205. Lambert JC, Amouyel P. Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Curr Opin Genet Dev.* 1 juin 2011;21(3):295-301.
206. Ramos AA, Galiano-Castillo N, Machado L. Cognitive Functioning of Unaffected First-degree Relatives of Individuals With Late-onset Alzheimer's Disease: A Systematic Literature Review and Meta-analysis. *Neuropsychol Rev.* 1 déc 2023;33(4):659-74.
207. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 8 juill 1999;234(2):177-86.
208. Mullaney JM, Mills RE, Pittard WS, Devine SE. Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes. *Hum Mol Genet.* 15 oct 2010;19(R2):R131-6.
209. Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 8 févr 1991;541(1):163-6.
210. Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, et al. Linkage studies in familial Alzheimer disease: Evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet.* juin 1991;48(6):1034-50.
211. Schellenberg GD, Deeb SS, Boehnke M, Bryant EM, Martin GM, Lampe TH, et al. Association of an apolipoprotein CII allele with familial dementia of the Alzheimer type. *J Neurogenet.* avr 1987;4(2-3):97-108.
212. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci.* mars 1993;90(5):1977-81.
213. Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA, Mayeux R, et al. Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA.* 22 oct 1997;278(16):1349-56.
214. Genin E, Hannequin D, Wallon D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, et al. APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry.* sept 2011;16(9):903-7.

215. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 13 août 2009;63(3):287-303.
216. 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.
217. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. oct 2015;526(7571):68-74.
218. Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. oct 2007;449(7164):851-61.
219. Taliun D, Harris DN, Kessler MD, Carlson J, Szpiech ZA, Torres R, et al. Sequencing of 53,831 diverse genomes from the NHLBI TOPMed Program. *Nature*. févr 2021;590(7845):290-9.
220. 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. *Nat Genet*. oct 2009;41(10):1094-9.
221. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere M, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease, and shows evidence for additional susceptibility genes. *Nat Genet*. oct 2009;41(10):1088-93.
222. 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.
223. Schwartzenruber J, Cooper S, Liu JZ, Barrio-Hernandez I, Bello E, Kumasaka N, et al. Genome-wide meta-analysis, fine-mapping and integrative prioritization implicate new Alzheimer's disease risk genes. *Nat Genet*. mars 2021;53(3):392-402.
224. Wightman DP, Jansen IE, Savage JE, Shadrin AA, Bahrami S, Holland D, et al. Author Correction: A genome-wide association study with 1,126,563 individuals identifies new risk loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*. juill 2022;54(7):1062-1062.
225. de Rojas I, Moreno-Grau S, Tesi N, Grenier-Boley B, Andrade V, Jansen IE, et al. Common variants in Alzheimer's disease and risk stratification by polygenic risk scores. *Nat Commun*. 7 juin 2021;12(1):1-16.
226. Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC, et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A $\beta$ , tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet*. mars 2019;51(3):414-30.
227. 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.

228. Liu JZ, Erlich Y, Pickrell JK. Case–control association mapping by proxy using family history of disease. *Nat Genet.* mars 2017;49(3):325-31.
229. Marioni RE, Harris SE, Zhang Q, McRae AF, Hagenaars SP, Hill WD, et al. Correction: GWAS on family history of Alzheimer’s disease. *Transl Psychiatry.* 6 juin 2019;9(1):1-2.
230. Bellenguez C, Küçükali F, Jansen IE, Kleineidam 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.
231. Grozeva D, Saad S, Menzies GE, Sims R. Benefits and Challenges of Rare Genetic Variation in Alzheimer’s Disease. *Curr Genet Med Rep.* 1 mars 2019;7(1):53-62.
232. Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci.* 10 nov 2009;106(45):19096-101.
233. 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.
234. 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.
235. Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, et al. Variant of TREM2 Associated with the Risk of Alzheimer’s Disease. *N Engl J Med.* 10 janv 2013;368(2):107-16.
236. 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.
237. Bis JC, Jian X, Kunkle BW, Chen Y, Hamilton-Nelson KL, Bush WS, et al. Correction: 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):1901-3.
238. 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.* 1 nov 2017;59:220.e1-220.e9.
239. 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.
240. 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.

241. 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 (Berl)*. 2017;133(6):955-66.
242. Willnow TE, Andersen OM. Sorting receptor SORLA – a trafficking path to avoid Alzheimer disease. *J Cell Sci*. 1 juill 2013;126(13):2751-60.
243. Schmidt V, Baum K, Lao A, Rateitschak K, Schmitz Y, Teichmann A, et al. Quantitative modelling of amyloidogenic processing and its influence by SORLA in Alzheimer's disease. *EMBO J*. 4 janv 2012;31(1):187-200.
244. Ubelmann F, Burrinha 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.
245. Satoh K, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, St George-Hyslop P, Fraser PE. ATP-binding Cassette Transporter A7 (ABCA7) Loss of Function Alters Alzheimer Amyloid Processing\*. *J Biol Chem*. 2 oct 2015;290(40):24152-65.
246. Tian Y, Chang JC, Fan EY, Flajolet M, Greengard P. Adaptor complex AP2/PICALM, through interaction with LC3, targets Alzheimer's APP-CTF for terminal degradation via autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 oct 2013;110(42):17071-6.
247. Ando K, Nagaraj S, Küçükali F, de Fisenne MA, Kosa AC, Doeraene E, et al. PICALM and Alzheimer's Disease: An Update and Perspectives. *Cells*. 10 déc 2022;11(24):3994.
248. 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.
249. Tang VW, Brieher WM. FSGS3/CD2AP is a barbed-end capping protein that stabilizes actin and strengthens adherens junctions. *J Cell Biol*. 9 déc 2013;203(5):815-33.
250. van Duijn TJ, Anthony EC, Hensbergen PJ, Deelder AM, Hordijk PL. Rac1 Recruits the Adapter Protein CMS/CD2AP to Cell-Cell Contacts. *J Biol Chem*. 25 juin 2010;285(26):20137-46.
251. 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*. 29 août 2017;114(35):9349-54.
252. 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*. 27 janv 2016;5:e10130.
253. Sosa LJ, Cáceres A, Dupraz S, Oksdath M, Quiroga S, Lorenzo A. The physiological role of the amyloid precursor protein as an adhesion molecule in the developing nervous system. *J Neurochem*. 2017;143(1):11-29.

254. Guénette S, Strecker P, Kins S. APP Protein Family Signaling at the Synapse: Insights from Intracellular APP-Binding Proteins. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2017 [cité 3 avr 2023];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2017.00087>
255. Al-Fahad D, Alyaseen F, Al-Amery A, Ibeas Bin C. Regulation of Focal Adhesion Dynamics and Cell Migration by PLC/PI3K-Mediated Metabolism of PtdIns (4,5) P2 in a Breast Cancer Cell Line. *Rep Biochem Mol Biol*. juill 2022;11(2):270-81.
256. Schumacher S, Vazquez Nunez R, Biertümpfel C, Mizuno N. Bottom-up reconstitution of focal adhesion complexes. *FEBS J*. 2022;289(12):3360-73.
257. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res*. 2010;339(1):269-80.
258. Vicente-Manzanares M, Horwitz AR. Adhesion dynamics at a glance. *J Cell Sci*. 1 déc 2011;124(23):3923-7.
259. Rottner K, Hall A, Small JV. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol CB*. 17 juin 1999;9(12):640-8.
260. Sun Z, Costell M, Fässler R. Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nat Cell Biol*. janv 2019;21(1):25-31.
261. Kolasangiani R, Bidone TC, Schwartz MA. Integrin Conformational Dynamics and Mechanotransduction. *Cells*. 12 nov 2022;11(22):3584.
262. Calderwood DA, Huttenlocher A, Kiosses WB, Rose DM, Woodside DG, Schwartz MA, et al. Increased filamin binding to  $\beta$ -integrin cytoplasmic domains inhibits cell migration. *Nat Cell Biol*. déc 2001;3(12):1060-8.
263. Wegener KL, Partridge AW, Han J, Pickford AR, Liddington RC, Ginsberg MH, et al. Structural Basis of Integrin Activation by Talin. *Cell*. 12 janv 2007;128(1):171-82.
264. Anthis NJ, Wegener KL, Ye F, Kim C, Goult BT, Lowe ED, et al. The structure of an integrin/talin complex reveals the basis of inside-out signal transduction. *EMBO J*. 18 nov 2009;28(22):3623-32.
265. Calderwood DA, Campbell ID, Critchley DR. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. août 2013;14(8):503-17.
266. Haydari Z, Shams H, Jahed Z, Mofrad MRK. Kindlin Assists Talin to Promote Integrin Activation. *Biophys J*. 21 avr 2020;118(8):1977-91.
267. Ezratty EJ, Bertaux C, Marcantonio EE, Gundersen GG. Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J Cell Biol*. 30 nov 2009;187(5):733-47.
268. Ezratty EJ, Partridge MA, Gundersen GG. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nat Cell Biol*. juin 2005;7(6):581-90.
269. Chao WT, Kunz J. Focal adhesion disassembly requires clathrin-dependent endocytosis of integrins. *FEBS Lett*. 17 avr 2009;583(8):1337-43.



270. Wang Y, Cao H, Chen J, McNiven MA. A direct interaction between the large GTPase dynamin-2 and FAK regulates focal adhesion dynamics in response to active Src. *Mol Biol Cell*. 1 mai 2011;22(9):1529-38.
271. Moreno-Layseca P, Icha J, Hamidi H, Ivaska J. Integrin trafficking in cells and tissues. *Nat Cell Biol*. févr 2019;21(2):122-32.
272. De Franceschi N, Arjonen A, Elkhatib N, Denessiouk K, Wrobel AG, Wilson TA, et al. Selective integrin endocytosis is driven by interactions between the integrin  $\alpha$ -chain and AP2. *Nat Struct Mol Biol*. févr 2016;23(2):172-9.
273. Ilić D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, et al. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*. 12 oct 1995;377(6549):539-44.
274. Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, et al. FAK–Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol*. févr 2004;6(2):154-61.
275. Nobes CD, Lauritzen I, Mattei MG, Paris S, Hall A, Chardin P. A New Member of the Rho Family, Rnd1, Promotes Disassembly of Actin Filament Structures and Loss of Cell Adhesion. *J Cell Biol*. 6 avr 1998;141(1):187-97.
276. Guasch RM, Scambler P, Jones GE, Ridley AJ. RhoE Regulates Actin Cytoskeleton Organization and Cell Migration. *Mol Cell Biol*. 1 août 1998;18(8):4761-71.
277. Beckerle MC, Burridge K, DeMartino GN, Croall DE. Colocalization of calcium-dependent protease II and one of its substrates at sites of cell adhesion. *Cell*. 20 nov 1987;51(4):569-77.
278. Dourdin N, Bhatt AK, Dutt P, Greer PA, Arthur JSC, Elce JS, et al. Reduced Cell Migration and Disruption of the Actin Cytoskeleton in Calpain-deficient Embryonic Fibroblasts \*. *J Biol Chem*. 21 déc 2001;276(51):48382-8.
279. Franco SJ, Rodgers MA, Perrin BJ, Han J, Bennin DA, Critchley DR, et al. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat Cell Biol*. oct 2004;6(10):977-83.
280. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 5 juill 2004;1692(2):103-19.
281. Zhao Y, Malinin NL, Meller J, Ma Y, West XZ, Bledzka K, et al. Regulation of Cell Adhesion and Migration by Kindlin-3 Cleavage by Calpain. *J Biol Chem*. 16 nov 2012;287(47):40012-20.
282. Connolly PF, Jäger R, Fearnhead HO. New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes. *Front Physiol* [Internet]. 16 avr 2014 [cité 25 juill 2024];5. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2014.00149/full>
283. Wen LP, Fahrni JA, Troie S, Guan JL, Orth K, Rosen GD. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem*. 10 oct 1997;272(41):26056-61.

284. Helfer B, Boswell BC, Finlay D, Cipres A, Vuori K, Bong Kang T, et al. Caspase-8 Promotes Cell Motility and Calpain Activity under Nonapoptotic Conditions. *Cancer Res.* 17 avr 2006;66(8):4273-8.
285. Fischer U, Jänicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* janv 2003;10(1):76-100.
286. Barbero S, Mielgo A, Torres V, Teitz T, Shields DJ, Mikolon D, et al. Caspase-8 Association with the Focal Adhesion Complex Promotes Tumor Cell Migration and Metastasis. *Cancer Res.* 30 avr 2009;69(9):3755-63.
287. Tawil N, Wilson P, Carbonetto S. Integrins in point contacts mediate cell spreading: factors that regulate integrin accumulation in point contacts vs. focal contacts. *J Cell Biol.* 1 janv 1993;120(1):261-71.
288. Arregui CO, Carbonetto S, McKerracher L. Characterization of neural cell adhesion sites: point contacts are the sites of interaction between integrins and the cytoskeleton in PC12 cells. *J Neurosci.* 1 nov 1994;14(11):6967-77.
289. Woo S, Gomez TM. Rac1 and RhoA Promote Neurite Outgrowth through Formation and Stabilization of Growth Cone Point Contacts. *J Neurosci.* 1 févr 2006;26(5):1418-28.
290. Levy AD, Omar MH, Koleske AJ. Extracellular matrix control of dendritic spine and synapse structure and plasticity in adulthood. *Front Neuroanat.* 20 oct 2014;8:116.
291. Wlodarczyk J, Mukhina I, Kaczmarek L, Dityatev A. Extracellular matrix molecules, their receptors, and secreted proteases in synaptic plasticity. *Dev Neurobiol.* 2011;71(11):1040-53.
292. Hu W, An C, Chen WJ. Molecular Mechanoneurobiology: An Emerging Angle to Explore Neural Synaptic Functions. *BioMed Res Int.* 2015;2015:486827.
293. Shi Y, Ethell IM. Integrins Control Dendritic Spine Plasticity in Hippocampal Neurons through NMDA Receptor and Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II-Mediated Actin Reorganization. *J Neurosci.* 8 févr 2006;26(6):1813-22.
294. Ning L, Tian L, Smirnov S, Vihinen H, Llano O, Vick K, et al. Interactions between ICAM-5 and  $\beta$ 1 integrins regulate neuronal synapse formation. *J Cell Sci.* 1 janv 2013;126(1):77-89.
295. Kramár EA, Lin B, Rex CS, Gall CM, Lynch G. Integrin-driven actin polymerization consolidates long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 avr 2006;103(14):5579-84.
296. Bourgin C, Murai KK, Richter M, Pasquale EB. The EphA4 receptor regulates dendritic spine remodeling by affecting  $\beta$ 1-integrin signaling pathways. *J Cell Biol.* 17 sept 2007;178(7):1295-307.
297. Renaudin A, Lehmann M, Girault JA, McKerracher L. Organization of point contacts in neuronal growth cones. *J Neurosci Res.* 1999;55(4):458-71.
298. Myers JP, Santiago-Medina M, Gomez TM. Regulation of axonal outgrowth and pathfinding by integrin-ECM interactions. *Dev Neurobiol.* nov 2011;71(11):901-23.

299. Myers JP, Gomez TM. Focal Adhesion Kinase Promotes Integrin Adhesion Dynamics Necessary for Chemotropic Turning of Nerve Growth Cones. *J Neurosci*. 21 sept 2011;31(38):13585-95.
300. Robles E, Gomez TM. Focal adhesion kinase signaling at sites of integrin-mediated adhesion controls axon pathfinding. *Nat Neurosci*. oct 2006;9(10):1274-83.
301. Woo S, Rowan DJ, Gomez TM. Retinotopic Mapping Requires Focal Adhesion Kinase-Mediated Regulation of Growth Cone Adhesion. *J Neurosci*. 4 nov 2009;29(44):13981-91.
302. Dehkordi MH, Munn RGK, Fearnhead HO. Non-Canonical Roles of Apoptotic Caspases in the Nervous System. *Front Cell Dev Biol*. 23 févr 2022;10:840023.
303. Kerstein PC, Patel KM, Gomez TM. Calpain-Mediated Proteolysis of Talin and FAK Regulates Adhesion Dynamics Necessary for Axon Guidance. *J Neurosci*. 8 févr 2017;37(6):1568-80.
304. Yamazaki T, Koo EH, Selkoe DJ. Cell Surface Amyloid  $\beta$ -Protein Precursor Colocalizes with  $\beta$ 1 Integrins at Substrate Contact Sites in Neural Cells. *J Neurosci*. 1 févr 1997;17(3):1004-10.
305. Storey E, Beyreuther K, Masters CL. Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components. *Brain Res*. 7 oct 1996;735(2):217-31.
306. 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*. 2021;26(10):5592-607.
307. 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 Neuropathol (Berl)*. août 2019;138(2):221-36.
308. Ristori E, Cicaloni V, Salvini L, Tinti L, Tinti C, Simons M, et al. Amyloid- $\beta$  Precursor Protein APP Down-Regulation Alters Actin Cytoskeleton-Interacting Proteins in Endothelial Cells. *Cells*. 19 nov 2020;9(11):2506.
309. Kindler T. Congenital poikiloderma with traumatic bulla formation and progressive cutaneous atrophy. *Br J Dermatol*. mars 1954;66(3):104-11.
310. Siegel DH, Ashton GHS, Penagos HG, Lee JV, Feiler HS, Wilhelmsen KC, et al. Loss of Kindlin-1, a Human Homolog of the *Caenorhabditis elegans* Actin-Extracellular-Matrix Linker Protein UNC-112, Causes Kindler Syndrome. *Am J Hum Genet*. juill 2003;73(1):174-87.
311. Jobard F, Bouadjar B, Caux F, Hadj-Rabia S, Has C, Matsuda F, et al. Identification of mutations in a new gene encoding a FERM family protein with a pleckstrin homology domain in Kindler syndrome. *Hum Mol Genet*. 15 avr 2003;12(8):925-35.
312. Khan AA, Janke A, Shimokawa T, Zhang H. Phylogenetic Analysis of Kindlins Suggests Subfunctionalization of an Ancestral Unduplicated Kindlin into Three Paralogs in Vertebrates. *Evol Bioinforma Online*. 22 mars 2011;7:7-19.

313. Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutchman M, Hanspal M, Jindal H, et al. The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci.* 1 août 1998;23(8):281-2.
314. Hirbawi J, Bialkowska K, Bledzka KM, Liu J, Fukuda K, Qin J, et al. The extreme C-terminal region of kindlin-2 is critical to its regulation of integrin activation. *J Biol Chem.* 25 août 2017;292(34):14258-69.
315. Kloeker S, Major MB, Calderwood DA, Ginsberg MH, Jones DA, Beckerle MC. The Kindler Syndrome Protein Is Regulated by Transforming Growth Factor- $\beta$  and Involved in Integrin-mediated Adhesion \*. *J Biol Chem.* 1 févr 2004;279(8):6824-33.
316. Qu H, Tu Y, Shi X, Larjava H, Saleem MA, Shattil SJ, et al. Kindlin-2 regulates podocyte adhesion and fibronectin matrix deposition through interactions with phosphoinositides and integrins. *J Cell Sci.* 15 mars 2011;124(6):879-91.
317. Perera HD, Ma YQ, Yang J, Hirbawi J, Plow EF, Qin J. Membrane targeting of the N-terminal ubiquitin-like domain of kindlin-2 is crucial for its regulation of integrin activation. *Struct Lond Engl* 1993. 9 nov 2011;19(11):1664-71.
318. Bouaouina M, Goult BT, Huet-Calderwood C, Bate N, Brahme NN, Barsukov IL, et al. A Conserved Lipid-binding Loop in the Kindlin FERM F1 Domain Is Required for Kindlin-mediated  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 Integrin Coactivation. *J Biol Chem.* 2 mars 2012;287(10):6979-90.
319. Ussar S, Wang HV, Linder S, Fässler R, Moser M. The Kindlins: Subcellular localization and expression during murine development. *Exp Cell Res.* 1 oct 2006;312(16):3142-51.
320. Bu W, Levitskaya Z, Tan SM, Gao YG. Emerging evidence for kindlin oligomerization and its role in regulating kindlin function. *J Cell Sci [Internet].* 20 avr 2021 [cité 9 juill 2021];134(8). Disponible sur: <https://doi.org/10.1242/jcs.256115>
321. Chua GL, Tan SM, Bhattacharjya S. NMR Characterization and Membrane Interactions of the Loop Region of Kindlin-3 F1 Subdomain. *PloS One.* 2016;11(4):e0153501.
322. Liu J, Fukuda K, Xu Z, Ma YQ, Hirbawi J, Mao X, et al. Structural Basis of Phosphoinositide Binding to Kindlin-2 Protein Pleckstrin Homology Domain in Regulating Integrin Activation. *J Biol Chem.* 16 déc 2011;286(50):43334-42.
323. Bledzka K, Bialkowska K, Sossey-Alaoui K, Vaynberg J, Pluskota E, Qin J, et al. Kindlin-2 directly binds actin and regulates integrin outside-in signaling. *J Cell Biol.* 11 avr 2016;213(1):97-108.
324. Klapproth S, Bromberger T, Türk C, Krüger M, Moser M. A kindlin-3–leupaxin–paxillin signaling pathway regulates podosome stability. *J Cell Biol.* 7 oct 2019;218(10):3436-54.
325. Qu H, Tu Y, Guan JL, Xiao G, Wu C. Kindlin-2 Tyrosine Phosphorylation and Interaction with Src Serve as a Regulatable Switch in the Integrin Outside-in Signaling Circuit. *J Biol Chem.* 7 nov 2014;289(45):31001-13.

326. Böttcher RT, Veelders M, Rombaut P, Faix J, Theodosiou M, Stradal TE, et al. Kindlin-2 recruits paxillin and Arp2/3 to promote membrane protrusions during initial cell spreading. *J Cell Biol.* 14 sept 2017;216(11):3785-98.
327. Nguyen HTT, Xu Z, Shi X, Liu S, Schulte ML, White GC, et al. Paxillin binding to the PH domain of kindlin-3 in platelets is required to support integrin  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  outside-in signaling. *J Thromb Haemost.* 1 déc 2021;19(12):3126-38.
328. Feng C, Li YF, Yau YH, Lee HS, Tang XY, Xue ZH, et al. Kindlin-3 Mediates Integrin  $\alpha\text{L}\beta 2$  Outside-in Signaling, and It Interacts with Scaffold Protein Receptor for Activated-C Kinase 1 (RACK1)\*. *J Biol Chem.* 30 mars 2012;287(14):10714-26.
329. Fukuda K, Bledzka K, Yang J, Perera HD, Plow EF, Qin J. Molecular Basis of Kindlin-2 Binding to Integrin-linked Kinase Pseudokinase for Regulating Cell Adhesion\*. *J Biol Chem.* 10 oct 2014;289(41):28363-75.
330. Huet-Calderwood C, Brahme NN, Kumar N, Stiegler AL, Raghavan S, Boggon TJ, et al. Differences in binding to the ILK complex determines kindlin isoform adhesion localization and integrin activation. *J Cell Sci.* 1 oct 2014;127(19):4308-21.
331. Wei X, Xia Y, Li F, Tang Y, Nie J, Liu Y, et al. Kindlin-2 mediates activation of TGF- $\beta$ /Smad signaling and renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol JASN.* sept 2013;24(9):1387-98.
332. Wei X, Wang X, Zhan J, Chen Y, Fang W, Zhang L, et al. Smurf1 inhibits integrin activation by controlling Kindlin-2 ubiquitination and degradation. *J Cell Biol.* 1 mai 2017;216(5):1455-71.
333. Yu Y, Wu J, Wang Y, Zhao T, Ma B, Liu Y, et al. Kindlin 2 forms a transcriptional complex with  $\beta$ -catenin and TCF4 to enhance Wnt signalling. *EMBO Rep.* août 2012;13(8):750-8.
334. Kong J, Du J, Wang Y, Yang M, Gao J, Wei X, et al. Focal adhesion molecule Kindlin-1 mediates activation of TGF- $\beta$  signaling by interacting with TGF- $\beta$ RI, SARA and Smad3 in colorectal cancer cells. *Oncotarget.* 20 oct 2016;7(46):76224-37.
335. Pluskota E, Ma Y, Bledzka KM, Bialkowska K, Soloviev DA, Szpak D, et al. Kindlin-2 regulates hemostasis by controlling endothelial cell-surface expression of ADP/AMP catabolic enzymes via a clathrin-dependent mechanism. *Blood.* 3 oct 2013;122(14):2491-9.
336. Montanez E, Ussar S, Schifferer M, Bösl M, Zent R, Moser M, et al. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev.* 15 mai 2008;22(10):1325-30.
337. Bialkowska K, Ma YQ, Bledzka K, Sossey-Alaoui K, Izem L, Zhang X, et al. The Integrin Co-activator Kindlin-3 Is Expressed and Functional in a Non-hematopoietic Cell, the Endothelial Cell. *J Biol Chem.* 11 juin 2010;285(24):18640-9.
338. Duperret EK, Ridky TW. Kindler syndrome in mice and men. *Cancer Biol Ther.* 1 sept 2014;15(9):1113-6.
339. Ussar S, Moser M, Widmaier M, Rognoni E, Harrer C, Genzel-Boroviczeny O, et al. Loss of Kindlin-1 Causes Skin Atrophy and Lethal Neonatal Intestinal Epithelial Dysfunction. *PLoS Genet.* 5 déc 2008;4(12):e1000289.

340. Svensson L, Howarth K, McDowall A, Patzak I, Evans R, Ussar S, et al. Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nat Med.* mars 2009;15(3):306-12.
341. Mory A, Feigelson SW, Yarali N, Kilic SS, Bayhan GI, Gershoni-Baruch R, et al. Kindlin-3: a new gene involved in the pathogenesis of LAD-III. *Blood.* 15 sept 2008;112(6):2591.
342. 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.* 29 févr 2008;102(4):423-31.
343. Tu Y, Wu S, Shi X, Chen K, Wu C. Migfilin and Mig-2 Link Focal Adhesions to Filamin and the Actin Cytoskeleton and Function in Cell Shape Modulation. *Cell.* 4 avr 2003;113(1):37-47.
344. Orré T, Joly A, Karatas Z, Kastberger B, Cabriel C, Böttcher RT, et al. Molecular motion and tridimensional nanoscale localization of kindlin control integrin activation in focal adhesions. *Nat Commun.* 25 mai 2021;12(1):3104.
345. Rogalski TM, Mullen GP, Gilbert MM, Williams BD, Moerman DG. The UNC-112 Gene in *Caenorhabditis elegans* Encodes a Novel Component of Cell-Matrix Adhesion Structures Required for Integrin Localization in the Muscle Cell Membrane. *J Cell Biol.* 10 juill 2000;150(1):253-64.
346. Bai J, Binari R, Ni JQ, Vijayakanthan M, Li HS, Perrimon N. RNA interference screening in *Drosophila* primary cells for genes involved in muscle assembly and maintenance. *Dev Camb Engl.* avr 2008;135(8):1439.
347. Pluskota E, Dowling JJ, Gordon N, Golden JA, Szpak D, West XZ, et al. The integrin coactivator Kindlin-2 plays a critical role in angiogenesis in mice and zebrafish. *Blood.* 5 mai 2011;117(18):4978-87.
348. Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci.* 15 janv 2009;122(2):159-63.
349. Ma YQ, Qin J, Wu C, Plow EF. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of  $\beta 3$  integrins. *J Cell Biol.* 5 mai 2008;181(3):439-46.
350. Shi X, Ma YQ, Tu Y, Chen K, Wu S, Fukuda K, et al. The MIG-2/Integrin Interaction Strengthens Cell-Matrix Adhesion and Modulates Cell Motility\*. *J Biol Chem.* 13 juill 2007;282(28):20455-66.
351. Bledzka K, Liu J, Xu Z, Perera HD, Yadav SP, Bialkowska K, et al. Spatial Coordination of Kindlin-2 with Talin Head Domain in Interaction with Integrin  $\beta$  Cytoplasmic Tails. *J Biol Chem.* 13 juill 2012;287(29):24585-94.
352. Chen C, Manso AM, Ross RS. Talin and Kindlin as Integrin-Activating Proteins: Focus on the Heart. *Pediatr Cardiol.* oct 2019;40(7):1401-9.
353. Bodescu MA, Aretz J, Grison M, Rief M, Fässler R. Kindlin stabilizes the talin-integrin bond under mechanical load by generating an ideal bond. *Proc Natl Acad Sci.* 27 juin 2023;120(26):e2218116120.

354. Wujak L, Böttcher RT, Pak O, Frey H, El Agha E, Chen Y, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 couples  $\beta$ 1 integrin activation to degradation. *Cell Mol Life Sci CMLS*. mai 2018;75(9):1671-85.
355. Chen A, Moy VT. Cross-Linking of Cell Surface Receptors Enhances Cooperativity of Molecular Adhesion. *Biophys J*. 1 juin 2000;78(6):2814-20.
356. Hato T, Pampori N, Shattil SJ. Complementary Roles for Receptor Clustering and Conformational Change in the Adhesive and Signaling Functions of Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *J Cell Biol*. 29 juin 1998;141(7):1685-95.
357. Jahed Z, Haydari Z, Rathish A, Mofrad MRK. Kindlin Is Mechanosensitive: Force-Induced Conformational Switch Mediates Cross-Talk among Integrins. *Biophys J*. 19 mars 2019;116(6):1011-24.
358. Kadry YA, Maisuria EM, Huet-Calderwood C, Calderwood DA. Differences in self-association between kindlin-2 and kindlin-3 are associated with differential integrin binding. *J Biol Chem*. 7 août 2020;295(32):11161-73.
359. Kadry YA, Huet-Calderwood C, Simon B, Calderwood DA. Kindlin-2 interacts with a highly conserved surface of ILK to regulate focal adhesion localization and cell spreading. *J Cell Sci*. 15 oct 2018;131(20):jcs221184.
360. Liu Z, Lu D, Wang X, Wan J, Liu C, Zhang H. Kindlin-2 phosphorylation by Src at Y193 enhances Src activity and is involved in Migfilin recruitment to the focal adhesions. *FEBS Lett*. 2015;589(15):2001-10.
361. 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*. 8 juill 2008;9:36.
362. Yu Y, Qi L, Wu J, Wang Y, Fang W, Zhang H. Kindlin 2 Regulates Myogenic Related Factor Myogenin via a Canonical Wnt Signaling in Myogenic Differentiation. *PLoS ONE*. 22 mai 2013;8(5):e63490.
363. Wang P, Chu W, Zhang X, Li B, Wu J, Qi L, et al. Kindlin-2 interacts with and stabilizes DNMT1 to promote breast cancer development. *Int J Biochem Cell Biol*. 1 déc 2018;105:41-51.
364. Yu Y, Wu J, Guan L, Qi L, Tang Y, Ma B, et al. Kindlin 2 promotes breast cancer invasion via epigenetic silencing of the microRNA200 gene family. *Int J Cancer*. 2013;133(6):1368-79.
365. Qi L, Chi X, Zhang X, Feng X, Chu W, Zhang S, et al. Kindlin-2 suppresses transcription factor GATA4 through interaction with SUV39H1 to attenuate hypertrophy. *Cell Death Dis*. 26 nov 2019;10(12):890.
366. 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*. 15 juill 2019;10(8):539.
367. Tan HF, Tan SM. The focal adhesion protein kindlin-2 controls mitotic spindle assembly by inhibiting histone deacetylase 6 and maintaining  $\alpha$ -tubulin acetylation. *J Biol Chem*. 1 mai 2020;295(18):5928-43.

368. Song J, Wang T, Chi X, Wei X, Xu S, Yu M, et al. Kindlin-2 Inhibits the Hippo Signaling Pathway by Promoting Degradation of MOB1. *Cell Rep.* 10 déc 2019;29(11):3664-3677.e5.
369. Gao H, Zhong Y, Zhou L, Lin S, Hou X, Ding Z, et al. Kindlin-2 inhibits TNF/NF- $\kappa$ B-caspase 8 pathway in hepatocytes to maintain liver development and function [Internet]. *bioRxiv*; 2022 [cité 1 sept 2022]. p. 2022.07.13.499909. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.07.13.499909v1>
370. Li W, Wen L, Rathod B, Gingras AC, Ley K, Lee HS. Kindlin2 enables EphB/ephrinB bi-directional signaling to support vascular development. *Life Sci Alliance.* 27 déc 2022;6(3):e202201800.
371. Guo L, Wu C. Mechano-regulation of proline metabolism and cancer progression by kindlin-2. *Mol Cell Oncol.* 12 avr 2019;6(3):1596003.
372. Yadav RP, Baranwal S. Kindlin-2 regulates colonic cancer stem-like cells survival and self-renewal via Wnt/ $\beta$ -catenin mediated pathway. *Cell Signal.* 1 janv 2024;113:110953.
373. 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):1-16.
374. Yousafzai NA, El Khalki L, Wang W, Szpendyk J, Sossey-Alaoui K. Kindlin-2 Regulates the Oncogenic Activities of Integrins and TGF- $\beta$  In Triple Negative Breast Cancer Progression and Metastasis. *Res Sq.* 5 févr 2024;rs.3.rs-3914650.
375. Zhan J, Song J, Wang P, Chi X, Wang Y, Guo Y, et al. Kindlin-2 induced by TGF- $\beta$  signaling promotes pancreatic ductal adenocarcinoma progression through downregulation of transcriptional factor HOXB9. *Cancer Lett.* 28 mai 2015;361(1):75-85.
376. Liu C, Jiang K, Ding Y, Yang A, Cai R, Bai P, et al. Kindlin-2 enhances c-Myc translation through association with DDX3X to promote pancreatic ductal adenocarcinoma progression. *Theranostics.* 31 juill 2023;13(13):4333-55.
377. Yang J rong, Pan T jun, Yang H, Wang T, Liu W, Liu B, et al. Kindlin-2 promotes invasiveness of prostate cancer cells via NF- $\kappa$ B-dependent upregulation of matrix metalloproteinases. *Gene.* 15 janv 2016;576(1 Pt 3):571-6.
378. Gao J, Khan AA, Shimokawa T, Zhan J, Strömblad S, Fang W, et al. A feedback regulation between Kindlin-2 and GLI1 in prostate cancer cells. *FEBS Lett.* 18 mars 2013;587(6):631-8.
379. Gong X, An Z, Wang Y, Guan L, Fang W, Strömblad S, et al. Kindlin-2 controls sensitivity of prostate cancer cells to cisplatin-induced cell death. *Cancer Lett.* 18 déc 2010;299(1):54-62.
380. 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.* 1 févr 2012;203(2):222-9.
381. Yin S yan, Liu Y jie, Li J pin, Liu J. Overexpression of FERM Domain Containing Kindlin 2 (FERMT2) in Fibroblasts Correlates with EMT and Immunosuppression in Gastric Cancer. *Int J Genomics.* 6 févr 2024;2024:4123737.



382. Ren C, Du J, Xi C, Yu Y, Hu A, Zhan J, et al. Kindlin-2 inhibits serous epithelial ovarian cancer peritoneal dissemination and predicts patient outcomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 28 mars 2014;446(1):187-94.
383. Ren Y, Jin H, Xue Z, Xu Q, Wang S, Zhao G, et al. Kindlin-2 inhibited the growth and migration of colorectal cancer cells. *Tumor Biol*. 1 juin 2015;36(6):4107-14.
384. Lin J, Lin W, Ye Y, Wang L, Chen X, Zang S, et al. Kindlin-2 promotes hepatocellular carcinoma invasion and metastasis by increasing Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J Exp Clin Cancer Res*. 29 sept 2017;36(1):134.
385. Chowdhury D, Mistry A, Maity D, Bhatia R, Priyadarshi S, Wadan S, et al. Pan-cancer analyses suggest kindlin-associated global mechanochemical alterations. *Commun Biol*. 28 mars 2024;7(1):1-16.
386. Zhao T, Guan L, Yu Y, Pei X, Zhan J, Han L, et al. Kindlin-2 promotes genome instability in breast cancer cells. *Cancer Lett*. 28 avr 2013;330(2):208-16.
387. Bialkowska K, Qin J, Plow EF. Phosphorylation of Kindlins and the Control of Integrin Function. *Cells*. 7 avr 2021;10(4):825.
388. Yeon M, Bertolini I, Agarwal E, Ghosh JC, Tang HY, Speicher DW, et al. Parkin ubiquitination of Kindlin-2 enables mitochondria-associated metastasis suppression. *J Biol Chem*. 2 mai 2023;299(6):104774.
389. Yan Y, Zhao A, Qui Y, Li Y, Yan R, Wang Y, et al. Genetic Association of FERMT2, HLA-DRB1, CD2AP, and PTK2B Polymorphisms With Alzheimer's Disease Risk in the Southern Chinese Population. *Front Aging Neurosci*. 4 févr 2020;12:16.
390. 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*. mars 2018;75(3):328-41.
391. 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;8:20.
392. Schratt G. microRNAs at the synapse. *Nat Rev Neurosci*. déc 2009;10(12):842-9.
393. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: Multitissue gene regulation in humans. *Science*. 8 mai 2015;348(6235):648-60.
394. Fath T, Ke YD, Gunning P, Götz J, Ittner LM. Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons. *Nat Protoc*. janv 2009;4(1):78-85.
395. Jan A, Hartley DM, Lashuel HA. Preparation and characterization of toxic A $\beta$  aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. *Nat Protoc*. juin 2010;5(6):1186-209.

396. Kilinc D, Vreulx AC, Mendes T, Flaig A, Marques-Coelho D, Verschoore M, et al. Pyk2 overexpression in postsynaptic neurons blocks amyloid  $\beta$ 1–42-induced synaptotoxicity in microfluidic co-cultures. *Brain Commun* [Internet]. 1 juill 2020 [cité 5 juill 2021];2(2). Disponible sur: <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa139>
397. 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*. 23 avr 2014;34(17):6084-97.
398. Liu J, Liu MC, Wang KKW. Calpain in the CNS: From Synaptic Function to Neurotoxicity. *Sci Signal*. 8 avr 2008;1(14):re1-re1.
399. Kalia LV, Gingrich JR, Salter MW. Src in synaptic transmission and plasticity. *Oncogene*. oct 2004;23(48):8007-16.
400. Roskoski R. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 26 nov 2004;324(4):1155-64.
401. Diop A, Santorelli D, Malagrinò F, Nardella C, Pennacchietti V, Pagano L, et al. SH2 Domains: Folding, Binding and Therapeutical Approaches. *Int J Mol Sci*. 15 déc 2022;23(24):15944.
402. Kurochkina N, Guha U. SH3 domains: modules of protein–protein interactions. *Biophys Rev*. 20 juin 2012;5(1):29-39.
403. Boggon TJ, Eck MJ. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene*. oct 2004;23(48):7918-27.
404. Skopelitou D, Miao B, Srivastava A, Kumar A, Kuświk M, Dymerska D, et al. A Novel Low-Risk Germline Variant in the SH2 Domain of the SRC Gene Affects Multiple Pathways in Familial Colorectal Cancer. *J Pers Med*. 1 avr 2021;11(4):262.
405. Waksman G, Kominos D, Robertson SC, Pant N, Baltimore D, Birge RB, et al. Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature*. août 1992;358(6388):646-53.
406. Bibbins KB, Boeuf H, Varmus HE. Binding of the Src SH2 domain to phosphopeptides is determined by residues in both the SH2 domain and the phosphopeptides. *Mol Cell Biol*. déc 1993;13(12):7278-87.
407. Hotulainen P, Hoogenraad CC. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol*. 17 mai 2010;189(4):619-29.
408. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1 oct 1988;1(8):623-34.
409. Rognoni E, Ruppert R, Fässler R. The kindlin family: functions, signaling properties and implications for human disease. *J Cell Sci*. 1 janv 2016;129(1):17-27.

410. Sabino F, Hermes O, Egli FE, Kockmann T, Schlage P, Croizat P, et al. In Vivo Assessment of Protease Dynamics in Cutaneous Wound Healing by Degradomics Analysis of Porcine Wound Exudates. *Mol Cell Proteomics MCP*. févr 2015;14(2):354-70.
411. Ye F, Kim C, Ginsberg MH. Reconstruction of integrin activation. *Blood*. 5 janv 2012;119(1):26-33.
412. Baudry M. Calpain-1 and Calpain-2 in the Brain: Dr. Jekyll and Mr Hyde? *Curr Neuropharmacol*. sept 2019;17(9):823-9.
413. Hollville E, Deshmukh M. Physiological functions of non-apoptotic caspase activity in the nervous system. *Semin Cell Dev Biol*. oct 2018;82:127-36.
414. Briz V, Baudry M. Calpains: Master Regulators of Synaptic Plasticity. *The Neuroscientist*. juin 2017;23(3):221-31.
415. Wang Y, Liu Y, Bi X, Baudry M. Calpain-1 and Calpain-2 in the Brain: New Evidence for a Critical Role of Calpain-2 in Neuronal Death. *Cells*. déc 2020;9(12):2698.
416. Baudry M, Bi X. Revisiting the calpain hypothesis of learning and memory 40 years later. *Front Mol Neurosci*. 2024;17:1337850.
417. Ahmad F, Das D, Kommaddi RP, Diwakar L, Gowaikar R, Rupanagudi KV, et al. Isoform-specific hyperactivation of calpain-2 occurs presymptotically at the synapse in Alzheimer's disease mice and correlates with memory deficits in human subjects. *Sci Rep*. 3 sept 2018;8:13119.
418. Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, Takano J, Suemoto T, Maeda J, et al. Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology. *FASEB J*. 2012;26(3):1204-17.
419. Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA. Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci*. avr 1993;90(7):2628-32.
420. Kurbatskaya K, Phillips EC, Croft CL, Dentoni G, Hughes MM, Wade MA, et al. Upregulation of calpain activity precedes tau phosphorylation and loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol Commun*. 31 mars 2016;4:34.
421. Nguyen HT, Sawmiller DR, Wu Q, Maleski JJ, Chen M. Evidence supporting the role of calpain in the  $\alpha$ -processing of amyloid- $\beta$  precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 13 avr 2012;420(3):530-5.
422. Shams R, Banik NL, Haque A. Chapter Four - Calpain in the cleavage of alpha-synuclein and the pathogenesis of Parkinson's disease. In: Rahman S, éditeur. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. Academic Press; 2019 [cité 22 mai 2024]. p. 107-24. (Molecular Basis of Neuropsychiatric Disorders: from Bench to Bedside; vol. 167). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877117319300973>

423. Metwally E, Al-Abbadi HA, Hussain T, Murtaza G, Abdellatif AM, Ahmed MF. Calpain signaling: from biology to therapeutic opportunities in neurodegenerative disorders. *Front Vet Sci.* 5 sept 2023;10:1235163.
424. Wang Y, Briz V, Chishti A, Bi X, Baudry M. Distinct Roles for  $\mu$ -Calpain and m-Calpain in Synaptic NMDAR-Mediated Neuroprotection and Extrasynaptic NMDAR-Mediated Neurodegeneration. *J Neurosci.* 27 nov 2013;33(48):18880-92.
425. Ge M, zhang J, Chen S, Huang Y, Chen W, He L, et al. Role of Calcium Homeostasis in Alzheimer's Disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 3 mars 2022;18:487-98.
426. Gervais FG, Xu D, Robertson GS, Vaillancourt JP, Zhu Y, Huang J, et al. Involvement of Caspases in Proteolytic Cleavage of Alzheimer's Amyloid- $\beta$  Precursor Protein and Amyloidogenic A $\beta$  Peptide Formation. *Cell.* 30 avr 1999;97(3):395-406.
427. Rohn TT, Head E, Nesse WH, Cotman CW, Cribbs DH. Activation of Caspase-8 in the Alzheimer's Disease Brain. *Neurobiol Dis.* 1 déc 2001;8(6):1006-16.
428. D'Amelio M, Cavallucci V, Middei S, Marchetti C, Pacioni S, Ferri A, et al. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* janv 2011;14(1):69-76.
429. Dhage PA, Sharbidre AA, Magdum SM. Interlacing the relevance of caspase activation in the onset and progression of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.* 1 janv 2023;192:83-92.
430. Sullivan SE, Liao M, Smith RV, White C, Lagomarsino VN, Xu J, et al. Candidate-based screening via gene modulation in human neurons and astrocytes implicates FERMT2 in A $\beta$  and TAU proteostasis. *Hum Mol Genet.* 1 mars 2019;28(5):718-35.
431. Ando K, Brion JP, Stygelbout V, Suain V, Authelet M, Dedecker R, et al. Clathrin adaptor CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol (Berl).* 1 juin 2013;125(6):861-78.
432. de Coninck D, Schmidt TH, Schloetel JG, Lang T. Packing Density of the Amyloid Precursor Protein in the Cell Membrane. *Biophys J.* 13 mars 2018;114(5):1128-41.
433. Schreiber A, Fischer S, Lang T. The Amyloid Precursor Protein Forms Plasmalemmal Clusters via Its Pathogenic Amyloid- $\beta$  Domain. *Biophys J.* 21 mars 2012;102(6):1411-7.
434. Schneider A, Rajendran L, Honsho M, Gralle M, Donnert G, Wouters F, et al. Flotillin-Dependent Clustering of the Amyloid Precursor Protein Regulates Its Endocytosis and Amyloidogenic Processing in Neurons. *J Neurosci.* 12 mars 2008;28(11):2874-82.
435. Xu YX, Wang HQ, Yan J, Sun XB, Guo JC, Zhu CQ. Antibody binding to cell surface amyloid precursor protein induces neuronal injury by deregulating the phosphorylation of focal adhesion signaling related proteins. *Neurosci Lett.* 20 nov 2009;465(3):276-81.
436. Sheng B, Song B, Zheng Z, Zhou F, Lu G, Zhao N, et al. Abnormal cleavage of APP impairs its functions in cell adhesion and migration. *Neurosci Lett.* 6 févr 2009;450(3):327-31.

437. Qu H, Tu Y, Guan JL, Xiao G, Wu C. Kindlin-2 Tyrosine Phosphorylation and Interaction with Src Serve as a Regulatable Switch in the Integrin Outside-in Signaling Circuit\*. *J Biol Chem.* 7 nov 2014;289(45):31001-13.
438. Zhu L, Liu H, Lu F, Yang J, Byzova TV, Qin J. Structural basis of paxillin recruitment by kindlin-2 in regulating cell adhesion. *Struct Lond Engl* 1993. 5 nov 2019;27(11):1686-1697.e5.
439. Zhu K, Lai Y, Cao H, Bai X, Liu C, Yan Q, et al. Kindlin-2 modulates MafA and  $\beta$ -catenin expression to regulate  $\beta$ -cell function and mass in mice. *Nat Commun.* 24 janv 2020;11(1):484.
440. Liu T, Zhang T, Nicolas M, Boussicault L, Rice H, Soldano A, et al. The amyloid precursor protein is a conserved Wnt receptor. Bellen HJ, VijayRaghavan K, éditeurs. *eLife.* 9 sept 2021;10:e69199.
441. Aghaizu ND, Jin H, Whiting PJ. Dysregulated Wnt Signalling in the Alzheimer's Brain. *Brain Sci.* 24 nov 2020;10(12):902.
442. Yu Y, Wu J, Wang Y, Zhao T, Ma B, Liu Y, et al. Kindlin 2 forms a transcriptional complex with  $\beta$ -catenin and TCF4 to enhance Wnt signalling. *EMBO Rep.* août 2012;13(8):750-8.
443. Li H, Rajani V, Sengar AS, Salter MW. Src dependency of the regulation of LTP by alternative splicing of GRIN1 exon 5. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 10 juin 2024;379(1906):20230236.
444. Yu XM, Askalan R, Keil GJ, Salter MW. NMDA Channel Regulation by Channel-Associated Protein Tyrosine Kinase Src. *Science.* 31 janv 1997;275(5300):674-8.
445. Salter MW, Kalia LV. Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci.* avr 2004;5(4):317-28.
446. Gingrich JR, Pelkey KA, Fam SR, Huang Y, Petralia RS, Wenthold RJ, et al. Unique domain anchoring of Src to synaptic NMDA receptors via the mitochondrial protein NADH dehydrogenase subunit 2. *Proc Natl Acad Sci.* 20 avr 2004;101(16):6237-42.
447. Ali DW, Salter MW. NMDA receptor regulation by Src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 1 juin 2001;11(3):336-42.
448. Salter MW, Pitcher GM. Dysregulated Src upregulation of NMDA receptor activity: a common link in chronic pain and schizophrenia. *FEBS J.* 2012;279(1):2-11.
449. Rajani V, Sengar AS, Salter MW. Src and Fyn regulation of NMDA receptors in health and disease. *Neuropharmacology.* 1 août 2021;193:108615.
450. Wang R, Reddy PH. Role of Glutamate and NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis JAD.* 2017;57(4):1041-8.
451. 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.

452. Shulman JM, Imboywa S, Giagtzoglou N, Powers MP, Hu Y, Devenport D, et al. Functional screening in *Drosophila* identifies Alzheimer's disease susceptibility genes and implicates Tau-mediated mechanisms. *Hum Mol Genet*. 15 févr 2014;23(4):870-7.
453. Hernandez F, Lucas JJ, Avila J. GSK3 and tau: two convergence points in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD*. 2013;33 Suppl 1:S141-144.
454. Ittner LM, Götz J. Amyloid- $\beta$  and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. févr 2011;12(2):67-72.
455. Crimins JL, Pooler A, Polydoro M, Luebke JI, Spires-Jones TL. The intersection of amyloid beta and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. 1 juin 2013;12(3):757-63.
456. Spires-Jones TL, Hyman BT. The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*. 21 mai 2014;82(4):756-71.
457. Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A. Tau is essential to  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci*. 30 avr 2002;99(9):6364-9.
458. Tackenberg C, Grinschgl S, Trutzel A, Santucci AC, Frey MC, Konietzko U, et al. NMDA receptor subunit composition determines beta-amyloid-induced neurodegeneration and synaptic loss. *Cell Death Dis*. avr 2013;4(4):e608-e608.
459. Mairet-Coello G, Courchet J, Pieraut S, Courchet V, Maximov A, Polleux F. The CAMKK2-AMPK Kinase Pathway Mediates the Synaptotoxic Effects of A $\beta$  Oligomers through Tau Phosphorylation. *Neuron*. 10 avr 2013;78(1):94-108.
460. Chen X, Wanggou S, Bodalia A, Zhu M, Dong W, Fan JJ, et al. A Feedforward Mechanism Mediated by Mechanosensitive Ion Channel PIEZO1 and Tissue Mechanics Promotes Glioma Aggression. *Neuron*. 21 nov 2018;100(4):799-815.e7.
461. Koser DE, Thompson AJ, Foster SK, Dwivedy A, Pillai EK, Sheridan GK, et al. Mechanosensing is critical for axon growth in the developing brain. *Nat Neurosci*. 19 sept 2016;19(12):1592.
462. Tyler WJ. The mechanobiology of brain function. *Nat Rev Neurosci*. déc 2012;13(12):867-78.
463. Procès A, Luciano M, Kalukula Y, Ris L, Gabriele S. Multiscale Mechanobiology in Brain Physiology and Diseases. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 28 mars 2022 [cité 25 oct 2024];10. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental-biology/articles/10.3389/fcell.2022.823857/full>
464. Zhang QY, Zhang YY, Xie J, Li CX, Chen WY, Liu BL, et al. Stiff substrates enhance cultured neuronal network activity. *Sci Rep*. 28 août 2014;4(1):6215.
465. Franze K, Janmey PA, Guck J. Mechanics in Neuronal Development and Repair. *Annu Rev Biomed Eng*. 11 juill 2013;15(Volume 15, 2013):227-51.
466. Kechagia JZ, Ivaska J, Roca-Cusachs P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nat Rev Mol Cell Biol*. août 2019;20(8):457-73.

467. Ciobanasu C, Faivre B, Le Clainche C. Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: The multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions. *Eur J Cell Biol.* 1 oct 2013;92(10):339-48.
468. Sokurenko EV, Vogel V, Thomas WE. Catch bond mechanism of force-enhanced adhesion: counter-intuitive, elusive but ... widespread? *Cell Host Microbe.* 16 oct 2008;4(4):314.
469. Ellis C, Ward NL, Rice M, Ball NJ, Walle P, Najdek C, et al. The structure of an Amyloid Precursor Protein/talin complex indicates a mechanical basis of Alzheimer's Disease [Internet]. *bioRxiv*; 2024 [cité 25 oct 2024]. p. 2024.03.04.583202. Disponible sur: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.03.04.583202v4>

## **ANNEXE**

Soumis à *Neurobiology of Aging*

**Cleavage of KINDLIN2 by caspases and calpains controls its impact on APP metabolism**

Chloé Najdek<sup>1</sup>, Pauline Walle<sup>1</sup>, Amandine Flaig<sup>1</sup>, Anne-Marie Ayrat<sup>1</sup>, Florie Demiautte<sup>1</sup>, Audrey Coulon<sup>1</sup>, Valérie Buiche<sup>1</sup>, Neuro-CEB Brain Bank, Erwan Lambert<sup>1</sup>, Philippe Amouyel<sup>1</sup>, Carla Gelle<sup>1</sup>, Dolores Siedlecki-Wullich<sup>1</sup>, Julie Dumont<sup>1</sup>, Devrim Kilinc<sup>1</sup>, Fanny Eysert<sup>1\*</sup>, Jean-Charles Lambert<sup>1</sup>, Julien Chapuis<sup>1#</sup>

1. Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, Lille 59019 France

\* Current affiliation : Institute of molecular and cellular pharmacology, INSERM U1323, CNRS UMR7275, Université Côte d'Azur, Laboratory of excellence DistALZ, 06560, Sophia-Antipolis, Valbonne, France.

# Corresponding author :

Julien Chapuis, PhD

Inserm UMR1167, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, Lille 59019 France

Tel: + 33 3 20 87 78 01

Fax: + 33 3 20 87 78 94

E-mail: [julien.chapuis@pasteur-lille.fr](mailto:julien.chapuis@pasteur-lille.fr)



## **ABSTRACT**

The adapter protein KINDLIN2, encoded by the Alzheimer's disease (AD) genetic risk factor *FERMT2*, was identified as a modulator of APP processing. KINDLIN2 directly interacts with APP to modulate its metabolism, and KINDLIN2 underexpression impairs long-term potentiation in an APP-dependent manner. Altogether, these data suggest that loss of KINDLIN2 could have a detrimental effect on synaptic function and promote AD process. In this study, we identified KINDLIN2 as a novel substrate of caspases and calpain I, two well-known cysteine protease activities involved in the regulation of synaptic plasticity. These cleavages resulted in the dissociation of the different domains of KINDLIN2 which are necessary to ensure its function as an adapter protein. Furthermore, we demonstrate that these cleavages led to the inhibition of the ability of KINDLIN2 to control APP processing. Overall, these KINDLIN2 cleavages appear as potential new mechanisms in the regulation of KINDLIN2 functions at the synapse and could be of interest for the pathophysiology of AD.

## **INTRODUCTION**

The main pathological features of Alzheimer's disease (AD) are neurofibrillary tangles and senile plaque formation. The latter is caused by the progressive deposition of amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) peptides in the brain, and multiple lines of evidence suggest that these  $A\beta$  peptides are one of the primary causes of AD (Aleksis et al., 2017; Hardy and Higgins, 1992).  $A\beta$  peptides are generated through sequential cleavages of  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) first by  $\beta$ -secretase and then by the  $\gamma$ -secretase complex (Haass, 2004). APP metabolism is a highly regulated cellular process that depends on biosynthetic-secretory and endocytic pathways and involves molecular mechanisms that are not fully characterized (Lin et al., 2021).

Since the mutations responsible for the monogenic forms of AD have a strong impact on APP metabolism, and given the importance of the genetic component of AD even in the common forms of the disease (estimated to account for between 60 and 80% of the attributable risk in twin studies), it has been suggested that dissecting the AD genetic component could provide a better understanding of the APP metabolism, especially in a pathophysiological context. This approach was clearly supported by genome-wide association studies, where pathway enrichment analyses confirmed the involvement of APP metabolism. In this context, we previously developed a genome-wide, high-content siRNA screening approach to identify AD risk genes that affect APP metabolism. This allowed us to identify the genetic risk factor FERMT2 (FERM Domain Containing Kindlin 2, coding for KINDLIN2) as a strong modulator of APP metabolism (Chapuis et al., 2017). KINDLIN2 is known to be an adapter protein that is required for integrin activation and focal adhesion (FA) complex formation (Li et al., 2017; Montanez et al., 2008). In neurons, there are also adhesion complexes, known as point contacts, involved in the modulation of synaptic density and activity through regulating dendritic spine shape, stability, and the signaling machinery therein (Hotulainen and Hoogenraad, 2010). Interestingly, numerous studies have highlighted the role of APP as a cell adhesion molecule in the nervous system, with roles in neurite migration and growth (Perez et al., 1997; Sabo et al., 2003; Small et al., 1999), adhesion of the growth cone (Sosa et al., 2013), as well as synaptic adhesion and stabilization between pre- and postsynaptic compartments (Müller et al., 2017; Wang et al., 2009). The cytoplasmic tail of APP presents the YENPTY amino acid motif that is a highly conserved motif present in all APP family members as well as in other adhesion molecules, such as integrin  $\beta$ 1. This domain is involved in the interaction with adaptor proteins containing the phosphotyrosine-binding domain (PTB) which are related to cell adhesion and migration, and notably KINDLIN2 (Eysert et al., 2021). Indeed, our recent work demonstrated that KINDLIN2's F3 domain can interact with the YENPTY motif within APP's intracellular domain and that this interaction is necessary for KINDLIN2 to control the presence of

APP on the cell surface (Eysert et al., 2021). We also demonstrated that KINDLIN2 controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner (Eysert et al., 2021). Altogether, these data suggest that KINDLIN2 and APP may be playing an important role as a molecular complex, just like KINDLIN2 and Integrin do, to regulate cellular adhesion processes in the nervous system.

Spatial and temporal control of FA turnover is mediated by multiple mechanisms, one of which is proteolytic cleavage of multiple FA-related proteins. Multiple studies show that members of the calpain and caspase protease families are involved in the proteolytic cleavage of several FA components, such as TALIN, PAXILLIN and FAK, leading to the disassembly of the complexes they form (Chan et al., 2010; Cortesio et al., 2011; Franco et al., 2004; Levkau et al., 1998; Wen et al., 1997). Through the proteolysis of these substrates, these two protease families are involved in the regulation of synaptic function; notably in the regulation of the growth cone motility, neuronal morphology and plasticity (Aylsworth et al., 2009; Baudry et al., 2021; Wang et al., 2016; Westphal et al., 2010; Williams et al., 2006), corresponding to functions previously described to be regulated by the FERMT2-APP complex (Eysert et al., 2021). In this study, we report novel mechanisms that are involved in the regulation of KINDLIN2 function. We characterize KINDLIN2 as a new substrate of calpains and caspases. We also provide evidence suggesting that these KINDLIN2 cleavages result in a decrease in the previously reported ability of KINDLIN2 to regulate APP metabolism.

## **METHODS**

### **Human post-mortem samples**

Brain samples were collected through a brain donation program dedicated to neurodegenerative dementias coordinated by the NeuroCEB Brain Bank Network, as previously described (Kilinc et al., 2020). Briefly, the informed consent for post-mortem examination and research studies was signed by the legal representative of each patient in patient's name, as allowed by the French law and approved by the local ethics committee. The brain bank has been officially authorized to provide samples to scientists (agreement AC-2013-1887). All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional research committees and with the 1964 Declaration of Helsinki. The brain bank fulfils the criteria of the French Law on biological resources including informed consent, ethics review committee and data protection (article L1243-4 du Code de la Santé publique, August 2007). The Neuro-CEB Brain Bank (BioResource Research Impact Factor number BB-0033-00011) has been declared to the Ministry of Research and Higher Education, as required by French law. The assessment of Alzheimer's disease-related neurofibrillary pathology (Braak stage) in post-mortem brain tissue samples from 28 individuals (Supplementary Table 1) has been described previously (Kilinc et al., 2020).

### **Cell culture**

Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were cultured in 1:1 mixture of Dulbecco's Modified Eagle Medium and Ham's F12 nutrient mixture (DMEM-F12, 21331020, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; 10270106, Gibco), 2 mM L-glutamine (25030149, Thermo Fisher) and 50 UI/mL penicillin/streptomycin (15140122, Thermo Fisher) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Prior to transfection, cells were plated at a density of ~70%. Transient transfection of FERMT2 cDNA (cloned into a pcDNA4 vector; GeneArt) was performed using Fugene HD (E2312, Promega) according to the manufacturer's instructions. The cell line was tested negative for mycoplasma contamination using PCR test (Venor GeM OneStep, Minerva Biolabs).

### **Kindlin-2fl/fl mice and primary neuron culture**

Kindlin-2 floxed mice (Kindlin-2fl/fl) (EUCOMM)Wtsi (GSF-EPD0087\_1\_G04-1), which carries loxP sites flanking exon 5 and 6, were purchased from the International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC). The mouse was mated with Flp-deleter mouse to remove LacZ and neo cassettes. Kindlin-2fl/+ mice were intercrossed to obtain Kindlin-2fl/fl mice. Animal housing and experimentation were performed according to procedures approved by the local Animal Ethical Committee following European standards for the care and use of laboratory animal (agreement

APAFIS #32824-2021120518521661, Lille, France). Culture media and supplements were from Thermo Fisher, unless mentioned otherwise. Cortical neurons were dissected from E14-E15 Kindlin-2<sup>fl/fl</sup> mice, according to previously described procedures (Fath et al., 2009; Jan et al., 2010). Briefly, cortices were isolated from E14-E15 mice in ice-cold dissection medium (Hank's balanced salt solution supplemented with 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM glucose, and penicillin/streptomycin) and trypsinized at 37°C for 30 min (Trypsin solution, T4549, Sigma). DNase I was added to the trypsin-incubated tissue suspension to break down DNA and to avoid clumping of tissue during the subsequent trituration (DN25, Sigma). Trypsin was inactivated by the addition of isolation medium (Neurobasal<sup>TM</sup> medium supplemented with 10% of heat-inactivated fetal bovine serum, 1% GlutaMAX, 20 mM Hepes and Gentamycine). The cell suspension was passed through a 100  $\mu$ m then 70  $\mu$ m cell strainer followed by two centrifugations (0.3 $\times$ g for 10 min). Cells were resuspended in culture medium composed of MACS Neuro Medium (130-093-570) supplemented with 0.25% GlutaMAX, 2% MACS NeuroBrew-21 (130-093-566) and Gentamycine, and counted. For immunoblots, cells were plated at a density of 100,000 cells/cm<sup>2</sup> in 24-well plates, pre-coated with 0.1 mg/ml poly-D-lysine in 0.1 M borate buffer (0.31% boric acid, 0.475% sodium tetraborate, pH 8.5; Sigma) overnight at 37°C and rinsed thoroughly with water. To delete Kindlin-2 expression specifically in neurons, transductions of lentiviral vectors that drive Cre expression under the synapsin promoter were carried out at 1 day in vitro (DIV1) at multiplicities of infection (MOI) 4 and 6. Briefly, lentiviruses were diluted in culture medium containing 4  $\mu$ g/mL polybrene (hexadimethrine bromide, Sigma) and were added to the cells. After 4 h of transduction, lentivirus suspension was replaced with fresh medium.

### **Synapse fractionation**

Subcellular fractionations were performed as previously described (Frändemiché et al., 2014). Briefly, cortical neurons were resuspended in a cold buffer containing 0.32 M sucrose and 10mM HEPES, pH = 7.4, and were centrifuged at 1000  $\times$  g for 10 min to remove nuclei and debris. To remove the cytosolic fraction, the supernatant was concentrated at 12,000  $\times$  g for 20 min. The resulting 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 pellet was incubated 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 to pellet the synaptosomal membrane fraction. The supernatant was collected as the non-PSD membrane fraction (Triton-soluble). The remaining pellet was then solubilized (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. The supernatant contained

the PSD membrane fraction (Triton-insoluble). The cytosolic, non-PSD, and PSD fractions were then analyzed by immunoblotting.

### **Western blot and A $\beta$ quantification**

Solutions and buffers were from Thermo Fisher, unless mentioned otherwise. Lysis buffer, containing trizma-base 20 mM, NaCl 150 mM, cOmplete Protease Inhibitor Cocktail 1x (11697498001, Roche Applied Science) and 1% Triton X-100, was added to single pieces of whole brain tissue (~100 mg). Brain samples were homogenized by beads beating using a precllys soft tissue CK14 2 ml (3 x 30 s at 6500 rpm). The lysate was then centrifuged at 4000 rpm for 15 min at 4°C. The supernatant was used for analysis. Protein lysates from HEK293 or PNCs were harvested in minimum volume of 100  $\mu$ l/well in 24-well plates, in ice-cold lysis buffer as described previously (Chapuis et al., 2017). Protein quantification was performed by using Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23225). Lysates were mixed with 1X lithium dodecyl sulfate (LDS) sample buffer (NP0008) and 1X reducing agent (NP0009), sonicated and boiled at 95°C for 5 min. Total proteins (6  $\mu$ g/lane for HEK293 and NPC's sample, 40  $\mu$ g/lane for brain samples) were separated onto precast 4–12% Bis-Tris Protein Gels, and electrophoresis was achieved by applying a tension of 150 V during 90 min using an Invitrogen™ XCell SureLock™ Electrophoresis system with the NuPAGE® MOPS SDS running buffer (1X; NP000102). Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane of 0.2  $\mu$ m pore size (Bio-Rad) using the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). Membranes were rinsed three times for 5 min in TNT (0.01 M Tris.HCl (pH = 8.0), 0.15 M NaCl, 0.05% Tween-20) before incubation with primary antibodies overnight at 4°C. Membranes were rinsed 3 times for 5 min with TNT and then incubated with the secondary antibodies diluted in 5% milk for 2 h at room temperature. Blots were developed using Amersham ECL Western Blotting Detection Kit (WBLUC0500; Millipore). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and  $\beta$ -Actin were used as loading controls.

Culture media were collected for assaying A $\beta$  secretion using Alpha-LISA assays (Alpha-LISA Amyloid  $\beta$ 1-X Kit, AL288C, PerkinElmer) according to the manufacturer's instructions.

### **Chemicals and antibodies**

Kindlin-2 was detected with a mouse Kindlin-2-Cter (9E4) antibody obtained from GeneTex, (1/1000; GTX84507). Anti-Synaptophysin (1/5000; 101006) and anti-PSD95 (1/1000; 124014) were obtained from Synaptic System. Anti- $\beta$ -Actin (1/10000; A1978) and anti-Amyloid precursor protein C-Terminal (1/5000; A8717) and were purchased from Sigma-Aldrich. Anti-GAPDH (1/10000; AB2302) was obtained from Merck Millipore. All secondary antibodies coupled with

horseradish peroxidase were purchased from Jackson ImmunoResearch. Glutamate, Ionomycin, ALLN and ALLM were purchased from Calbiochem, and Z-VAD-FMK was purchased from Promega.

### **Co-immunoprecipitation**

Cell lysates were collected in co-immunoprecipitation buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, and 0.5% NP-40, pH = 7.4) containing phosphatase and protease inhibitors (11697498001; 4906845001, Roche Applied Science). Samples were incubated for 20 min on ice and centrifuged (12,000×g for 15 min at 4°C). For immunoprecipitation experiments, equal amounts of total lysates were incubated with the primary anti-β-Amyloid, 17-24 Antibody clone 4G8 (RRID: \_AB\_662812) overnight at 4°C, with gentle rocking. 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 40 μL (0.4 mg) of A/G magnetic beads previously washed with co-immunoprecipitation buffer. After 2 h of incubation at 4°C, the magnetic beads were washed three times and resuspended with a loading buffer (LDS, DTT and reducing agent) for 20 min at RT. Subsequently, samples were processed for immunoblotting.

### **Protein identification by mass spectrometry**

Proteins were separated under reducing conditions in a 10% polyacrylamide NuPage gel. The gel was stained for 3 days in a solution of colloidal Coomassie blue. Stained bands were excised from the gel, reduced, alkylated with iodoacetamide (10 mg/ml in 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) and digested overnight with 50 ng trypsin (Promega) in 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. The resulting peptides mixtures were eluted from the gel, desalted, and spotted on a MALDI plate with freshly dissolved α-cyano-4-hydroxycinnaminic acid (10 mg/ml in 50% CH<sub>3</sub>CN, TFA 1/1000). Mass spectrometry was performed with a MALDI-TOF-TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics). MS and MS/MS data were analyzed using BioTools software. Identification of peptides was performed using Mascot, <http://www.matrixscience.com>.

### **Statistical analysis**

A normality test (Lilliefors test) was performed on all data. Data were analyzed using the non-parametric Mann–Whitney test, as indicated in the figure legends. All data are reported as mean±standard error of the mean (SEM) of at least n = 3 experiments. Statistical significance was accepted at the level of p < 0.05.

## **RESULTS**

### **KINDLIN2 cleavage products were observed in human brains and in synapses of primary neurons**

We observed several uncharacterized bands in the KINDLIN2 electrophoretic mobility pattern when using hippocampal protein extracts obtained from different human brain samples, both in control individuals and in AD patients at different Braak stages (Figure 1a and supplementary Figure 1). In addition to the 75-kDa band corresponding to the expected full-length KINDLIN2 (FL),



two other bands, a 57-kDa band and a 39-kDa band, were labeled by an anti-C-terminal (C-ter) KINDLIN2 antibody, although the small number of samples available did not allow us to detect any significant difference between patients and controls (n=20 and 8, respectively). Interestingly, a similar electrophoretic profile was observed using protein extracts from mouse primary cortical neuron cultures (PNCs) (Figure 1b). However, the 39-kDa band appeared to be the more abundant in mouse PNCs, compared to what was observed in the human brain samples. To rule out the possibility of non-specific binding, we first checked if the presence of these bands was dependent on KINDLIN2 expression level. For this purpose, we analyzed the KINDLIN2 electrophoretic mobility profile using protein extracts of PNC from KINDLIN2 Cre-dependent conditional knockout mice. As expected, transduction of a lentivirus overexpressing Cre resulted in a dose-dependent decrease in KINDLIN2 FL expression. 57-kDa and 39-kDa bands were also dependent on the level of lentivirus transduction, suggesting that the bands are specific and their identification as potential by-products of KINDLIN2 metabolism is valid (Figure 1c-d). Since we previously identified KINDLIN2 as a synaptic protein (Eysert et al., 2021), we investigated the potential presence of KINDLIN2 by-products in synaptosomal purifications. Both 57-kDa and 39-kDa bands were observed in the synaptosomal fractions from PNCs (Figure 1e-f). Altogether, our data suggest that KINDLIN2 undergoes at least two cleavages, and these cleavages could be taking place in neurons, suggesting a potential role of the KINDLIN2 metabolism in the regulation of its neuronal functions.

### **The 57-kDa fragment of KINDLIN2 is generated through calpain I cleavage**

Having observed the KINDLIN2 cleavage products in synaptic purifications, we investigated the potential role of calpain, a well-characterized cysteine protease involved in synaptic plasticity in a calcium-dependent manner, in KINDLIN2 cleavage. To address the possibility that KINDLIN2 may be a calpain substrate, we first used an *in silico* prediction tool (CALPCLEAV) to identify potential calpain cleavage sites. The highest prediction score for a potential calpain cleavage site was obtained to be between amino acids 185 and 186, which would release a 57.4-kDa protein fragment (Figure 2a), consistent with the 57-kDa band observed in the electrophoretic mobility profile we obtained. The involvement of calpain I in the production of this fragment was confirmed by the strong accumulation of the 57-kDa band after ionomycin-induced calpain activation, which was fully abolished when the PNCs were pre-treated with specific calpain inhibitors ALLN or ALLM (Figure 2b). Excessive glutamate can produce an influx of calcium resulting in an overactivation of calcium-dependent proteases such as calpain, leading to neuronal excitotoxicity. In this context,

we validated the involvement of calpain in KINDLIN2 cleavage by stimulating the neurons with glutamate with or without pre-treatment with ALLN or ALLM (Figure 2c). Together, our results identified KINDLIN2 as a calpain substrate, where the calpain-mediated cleavage of KINDLIN2 leads to the release of a 57-kDa byproduct. However, no impact of calpain activity on the generation of the 39-kDa fragment was observed, suggesting the potential involvement of other proteases to fully explain the KINDLIN2 electrophoretic profile.

### **The 39-kDa fragment of KINDLIN2 is generated through caspase cleavage**

To characterize the potential involvement of other proteases in the KINDLIN2 metabolism, we took advantage of the HEK293 cell line, which we previously used to characterize the impact of KINDLIN2 on APP metabolism (Chapuis et al., 2017). Here, we aimed to compare the mass spectroscopy spectra of the full-length protein with those of the cleavage products, to identify potential cleavage sites. First, we observed that overexpression of KINDLIN2 in HEK293 cells resulted in an electrophoretic mobility pattern comparable to the one observed for endogenous KINDLIN2 in mouse PNCs, indicating that the HEK293 cells have the cellular machinery needed for KINDLIN2 metabolism (Figure 3a). Next, we performed immunoprecipitation to concentrate KINDLIN2 and its by-products (Figure 3b), followed by electrophoresis in Coomassie gel to visualize and isolate them for mass spectrometry analysis (Figure 3c). Unfortunately, the KINDLIN2 57-kDa fragment was too close to IgG, precluding its isolation. However, we succeeded to purify the 39-kDa fragment and analyzed it using mass spectrometry in parallel with the full-length protein (Figure 3d). As expected, this analysis identified the 39-kDa fragment as the C-ter part of KINDLIN2, and the comparison of the two spectra allowed us to map the potential cleavage site between the amino acids 286 and 361. We then used the PeptideCutter prediction tool to identify the proteases susceptible to cleave KINDLIN2 within the identified sequence. A very well-conserved consensus site (DEVD-AA) was predicted between amino acids 344 and 349, which would be recognized by Caspases and susceptible to generate a 38.8-kDa fragment, compatible with the electrophoretic mobility pattern observed (Figure 3e). To validate the predicted cleavage site, we generated an aspartate to asparagine mutation (KINDLIN2D347A) and transfected the 293HEK cells to overexpress this construct. Compared to wild-type (WT) KINDLIN2, the D347A mutation abolished the generation of the 39-kDa fragment with no impact on the production of the 57-kDa fragment (Figure 3f). Last, to validate caspase-dependent cleavage of KINDLIN2, we overexpressed KINDLIN2 FL in HEK293 cells and then we performed a treatment with a pan-caspase inhibitor (Z-VAD-FMK). Inhibition of the caspase activity was associated with a significant

decrease in the 39-kDa fragment, with –once again– no impact on the generation of the 57-kDa fragment (Figure 3g). Together, these results demonstrate that KINDLIN2 is also a substrate of caspases, suggesting that KINDLIN2 can function as an adaptor protein controlled by two independent mechanisms, i.e., via caspases- or calpain I-mediated cleavages.

### **Impact of KINDLIN2 cleavage on the APP metabolism**

A large number of binding partners have already been described for KINDLIN2 (Huet-Calderwood et al., 2014; Qu et al., 2014; Tu et al., 2003; Wei et al., 2017; Yu et al., 2012). We have recently demonstrated a direct interaction between the C-terminal F3 domain of KINDLIN2 and the YENPTY motif of the cytosolic tail of APP (Eysert et al., 2021). Considering that both cleavage products of KINDLIN2 possess the F3 domain, we hypothesized that they could also directly interact with APP. To test this hypothesis, we performed immunoprecipitation experiments using protein extracts from HEK293 cells stably expressing APP (293HEK-APP695WT) and transiently overexpressing (or not) WT KINDLIN2.

As expected, KINDLIN2 FL co-immunoprecipitated with APP (Figure 4a). Such co-immunoprecipitation was also observed with both 57-kDa and 39-kDa fragments, suggesting that KINDLIN2 cleavage products can also interact with APP.

Since we previously observed that KINDLIN2 FL was able to regulate APP degradation by controlling level of mature APP at the cell surface and by facilitating its recycling, we assessed the impact of KINDLIN2 cleavages on its capacity to regulate APP degradation. To this end, we generated constructs to express the 57 kDa (57 C-ter) and 39 kDa (39 C-ter) KINDLIN2 fragments, mimicking those resulting from calpain I or caspases cleavages, respectively. In contrast with the impact of KINDLIN2 FL overexpression previously reported (Chapuis et al., 2017), overexpression of 57 C-ter or 39 C-ter did not show any impact on the APP metabolism, neither on mature nor immature APP, or APP C-terminal fragment (APP-CTF) levels (Figure 4b-c). In addition, a dominant negative effect of 57 C-ter and 39 C-ter was observed on the A $\beta$  levels in the culture medium (Figure 4d), i.e., an increased A $\beta$  level similar to the impact of FERMT2 underexpression, as previously reported (Chapuis et al., 2017). To note, the overexpression of 57 C-ter also led to the production of the 39-kDa fragment, suggesting that the fragment resulting from calpain I cleavage can be recognized and cleaved by caspases. Together, these data show that KINDLIN2 cleavage products can interact with APP to modulate its metabolism.

## **DISCUSSION**

In this work, we identify KINDLIN2 as a new substrate for two cysteine proteases already well known for their roles in regulating synaptic functions, calpain I and caspases. In physiological conditions, the activities of these proteases are restricted in space and time. Calpain I activation is required for the induction of long-term potentiation (LTP) (Baudry, 2019) whereas the non-apoptotic activity of caspase 3 is mainly involved in long-term depression (LTD) (Hollville and Deshmukh, 2018), through cleavages of their substrates, such as cytoskeletal proteins, membrane-associated proteins, receptors/channels, scaffolding/anchoring proteins, protein kinases and phosphatases. As we previously reported that KINDLIN2 inactivation impairs LTP (Eysert et al., 2021), we could hypothesize that KINDLIN2 cleavage could be a mechanism involved in synaptic plasticity in the physiological context and play a role in pathophysiological processes. Indeed, an overactivation of calpains has been found in AD brains (Higuchi et al., 2012;

Saito et al., 1993) and calpain activity dysregulation has been described to be involved in the generation of toxic aggregates (Nguyen et al., 2012; Shams et al., 2019) and in synaptic dysfunction (Metwally et al., 2023). Caspases also appeared to be abnormally activated in AD brains (Gervais et al., 1999; Rohn et al., 2001) and were shown to have an impact on neuronal structure and activity (D'Amelio et al., 2011; Dhage et al., 2023). Although we did not observe any significant differences in the amount of KINDLIN2 fragments between patients and controls (despite a trend ( $p=0.09$ ) towards a greater presence of the 57-kDa C-ter fragment in the hippocampus of patients compared with controls, supplementary Figure 2), an upregulation of KINDLIN2 was observed in the post-mortem human temporal cortex of AD patients compared to healthy controls (Eysert et al., 2021; Sullivan et al., 2019). However, the approaches used do not allow for the quantification of KINDLIN2 by-products and additional studies will be necessary to investigate the potential association between KINDLIN2 cleavage and AD process.

The calpain- and caspase-mediated cleavages of KINDLIN2 result in the separation of the F0 and F1 domains, which participate in the recruitment of several KINDLIN2 partners such as SRC, SMURF1 or SMAD3 (Qu et al., 2014; Wei et al., 2017, 2013). The rest of the protein encompasses the PH domain, which is required for the association of KINDLIN2 with the plasma membrane, and the F3 domain, which allows KINDLIN2 to bind to the NxxY motif such that it can interact with integrin or APP. The separation of the F0 and F1 domains could inhibit the adapter function of KINDLIN2, i.e., bringing together different partners to form protein complexes (Theodosiou et al., 2016). We had previously shown that the KINDLIN2/APP interaction is a key driver of synaptic plasticity (Eysert et al., 2021). Our current findings suggest that KINDLIN2 cleavage could be a mechanism regulating synaptic functions through modulating the capacity of KINDLIN2 to interact with APP or with other partners. Recent crystallography experiments have demonstrated that KINDLIN2 can form homo-dimers through its F2 domain in a domain-swapped manner (Jahed et al., 2019), allowing for its proper localization and for activating integrin. In this context, it could be interesting to determine the consequences of KINDLIN2 cleavages on its capacity to dimerize and execute its different functions such as regulating the APP metabolism.

Indeed, we had shown that the underexpression of KINDLIN2 increases A $\beta$  peptide production by raising levels of mature APP at the cell surface (Chapuis et al., 2017). Our current results suggest that these cleavages lead to the abolishment of the capacity of KINDLIN2 to regulate APP metabolism, even when the F3 domain allowing the KINDLIN2-APP interaction is present. Remarkably, overexpression of the C-terminal fragments (57- and 39-kDa), lacking the F0 and F1 domains, exerts a dominant negative effect on the A $\beta$  peptide level, consistent with the impact of KINDLIN2 inactivation previously reported (Chapuis et al., 2017). These data suggest that these

C-terminal fragments could retain their ability to interact with APP but induce a blockage of the mechanism regulating APP metabolism. These data also highlight the importance of the F0 and F1 domains for KINDLIN2 in decreasing A $\beta$  peptide levels. Interestingly, the F1 domain of KINDLIN2 recruits the E3 ubiquitin-protein ligase SMURF1, allowing for the ubiquitination of the transmembrane receptor LRP1 and thus controlling its degradation (Wei et al., 2017; Wujak et al., 2018). Since we reported that KINDLIN2 controls APP degradation (Eysert et al., 2021), we could speculate that the KINDLIN2 F1 domain is also required for KINDLIN2 to impact APP degradation and processing.

Notably, KINDLIN2 has been implicated in the progression of several cancers of different origins: colorectal cancer (Ren et al., 2015), prostate (Gao et al., 2013; Yang et al., 2016), pancreatic (Mia et al., 2021) and breast cancer (Ma et al., 2022), among others. Although not yet reported, KINDLIN2 cleavage by calpain and caspases could be an interesting new mechanism to investigate in the context of these pathologies.

## REFERENCES

- Aleksis, R., Oleskovs, F., Jaudzems, K., Pahnke, J., Biverstål, H., 2017. Structural studies of amyloid- $\beta$  peptides: Unlocking the mechanism of aggregation and the associated toxicity. *Biochimie* 140, 176–192. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.07.011>
- Aylsworth, A., Jiang, S.X., Desbois, A., Hou, S.T., 2009. Characterization of the role of full-length CRMP3 and its calpain-cleaved product in inhibiting microtubule polymerization and neurite outgrowth. *Exp. Cell Res.* 315, 2856–2868. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.06.014>
- Baudry, M., 2019. Calpain-1 and Calpain-2 in the Brain: Dr. Jekyll and Mr Hyde? *Curr. Neuropharmacol.* 17, 823–829. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190228112451>
- Baudry, M., Su, W., Seinfeld, J., Sun, J., Bi, X., 2021. Role of Calpain-1 in Neurogenesis. *Front. Mol. Biosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.685938>
- Chan, K.T., Bennin, D.A., Huttenlocher, A., 2010. Regulation of Adhesion Dynamics by Calpain-mediated Proteolysis of Focal Adhesion Kinase (FAK). *J. Biol. Chem.* 285, 11418–11426. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.090746>

Chapuis, J., Flaig, A., Grenier-Boley, B., Eysert, F., Pottiez, V., Deloison, G., Vandeputte, A., Ayrat, A.-M., Mendes, T., Desai, S., Goate, A.M., Kauwe, J.S.K., Leroux, F., Herledan, A., Demiautte, F., Bauer, C., Checler, F., Petersen, R.C., Blennow, K., Zetterberg, H., Minthon, L., Van Deerlin, V.M., Lee, V.M.-Y., Shaw, L.M., Trojanowski, J.Q., Albert, M., Moghekar, A., O'Brien, R., Peskind, E.R., Malmanche, N., Schellenberg, G.D., Dourlen, P., Song, O.-R., Cruchaga, C., Amouyel, P., Deprez, B., Brodin, P., Lambert, J.-C., 2017. Genome-wide, high-content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 as a major modulator of APP metabolism. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 133, 955–966. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1652-z>

Cortesio, C.L., Boateng, L.R., Piazza, T.M., Bennin, D.A., Huttenlocher, A., 2011. Calpain-mediated Proteolysis of Paxillin Negatively Regulates Focal Adhesion Dynamics and Cell Migration. *J. Biol. Chem.* 286, 9998–10006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187294>

D'Amelio, M., Cavallucci, V., Middei, S., Marchetti, C., Pacioni, S., Ferri, A., Diamantini, A., De Zio, D., Carrara, P., Battistini, L., Moreno, S., Bacci, A., Ammassari-Teule, M., Marie, H., Cecconi, F., 2011. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 14, 69–76. <https://doi.org/10.1038/nn.2709>

Dhage, P.A., Sharbidre, A.A., Magdum, S.M., 2023. Interlacing the relevance of caspase activation in the onset and progression of Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* 192, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.11.008>

Eysert, F., Coulon, A., Boscher, E., Vreulx, A.-C., Flaig, A., Mendes, T., Hughes, S., Grenier-Boley, B., Hanouille, X., Demiautte, F., Bauer, C., Marttinen, M., Takalo, M., Amouyel, P., Desai, S., Pike, I., Hiltunen, M., Chéccler, F., Farinelli, M., Delay, C., Malmanche, N., Hébert, S.S., Dumont, J., Kilinc, D., Lambert, J.-C., Chapuis, J., 2021. Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 (Kindlin-2) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner. *Mol. Psychiatry* 26, 5592–5607. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00926-w>

Fath, T., Ke, Y.D., Gunning, P., Götz, J., Ittner, L.M., 2009. Primary support cultures of hippocampal and substantia nigra neurons. *Nat. Protoc.* 4, 78–85. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.199>

Franco, S.J., Rodgers, M.A., Perrin, B.J., Han, J., Bennin, D.A., Critchley, D.R., Huttenlocher, A., 2004. Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nat. Cell Biol.* 6, 977–983. <https://doi.org/10.1038/ncb1175>

Frandemiché, M.L., De Seranno, S., Rush, T., Borel, E., Elie, A., Arnal, I., Lanté, F., Buisson, A., 2014. Activity-Dependent Tau Protein Translocation to Excitatory Synapse Is Disrupted by Exposure to Amyloid-Beta Oligomers. *J. Neurosci.* 34, 6084–6097. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4261-13.2014>

Gao, J., Khan, A.A., Shimokawa, T., Zhan, J., Strömblad, S., Fang, W., Zhang, H., 2013. A feedback regulation between Kindlin-2 and GLI1 in prostate cancer cells. *FEBS Lett.* 587, 631–638. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.028>

Gervais, F.G., Xu, D., Robertson, G.S., Vaillancourt, J.P., Zhu, Y., Huang, J., LeBlanc, A., Smith, D., Rigby, M., Shearman, M.S., Clarke, E.E., Zheng, H., Van Der Ploeg, L.H.T., Ruffolo, S.C., Thornberry, N.A., Xanthoudakis, S., Zamboni, R.J., Roy, S., Nicholson, D.W., 1999. Involvement of Caspases in Proteolytic Cleavage of Alzheimer's Amyloid- $\beta$  Precursor Protein and Amyloidogenic A $\beta$  Peptide Formation. *Cell* 97, 395–406. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80748-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80748-5)

Haass, C., 2004. Take five—BACE and the  $\gamma$ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide generation. *EMBO J.* 23, 483–488. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600061>  
Hardy, J.A., Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>

Higuchi, M., Iwata, N., Matsuba, Y., Takano, J., Suemoto, T., Maeda, J., Ji, B., Ono, M., Staufenbiel, M., Suhara, T., Saido, T.C., 2012. Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology. *FASEB J.* 26, 1204–1217. <https://doi.org/10.1096/fj.11-187740>

Hollville, E., Deshmukh, M., 2018. Physiological functions of non-apoptotic caspase activity in the nervous system. *Semin. Cell Dev. Biol.* 82, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.037>

Hotulainen, P., Hoogenraad, C.C., 2010. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.* 189, 619–629. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003008>

Huet-Calderwood, C., Brahme, N.N., Kumar, N., Stiegler, A.L., Raghavan, S., Boggon, T.J., Calderwood, D.A., 2014. Differences in binding to the ILK complex determines kindlin isoform adhesion localization and integrin activation. *J. Cell Sci.* 127, 4308–4321. <https://doi.org/10.1242/jcs.155879>

Jahed, Z., Haydari, Z., Rathish, A., Mofrad, M.R.K., 2019. Kindlin Is Mechanosensitive: Force-Induced Conformational Switch Mediates Cross-Talk among Integrins. *Biophys. J.* 116, 1011–1024. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.01.038>

Jan, A., Hartley, D.M., Lashuel, H.A., 2010. Preparation and characterization of toxic A $\beta$  aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. *Nat. Protoc.* 5, 1186–1209. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.72>

Kilinc, D., Vreulx, A.-C., Mendes, T., Flaig, A., Marques-Coelho, D., Verschoore, M., Demiautte, F., Amouyel, P., Neuro-CEB Brain Bank, Eyser, F., Dourlen, P., Chapuis, J., Costa, M.R., Malmanche, N., Checler, F., Lambert, J.-C., 2020. Pyk2 overexpression in postsynaptic neurons



blocks amyloid  $\beta$ 1–42-induced synaptotoxicity in microfluidic co-cultures. *Brain Commun.* 2. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa139>

Levkau, B., Herren, B., Koyama, H., Ross, R., Raines, E.W., 1998. Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *J. Exp. Med.* 187, 579–586. <https://doi.org/10.1084/jem.187.4.579>

Li, H., Deng, Y., Sun, K., Yang, H., Liu, J., Wang, M., Zhang, Z., Lin, J., Wu, C., Wei, Z., Yu, C., 2017. Structural basis of kindlin-mediated integrin recognition and activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 9349–9354.

Lin, T., Tjernberg, L.O., Schedin-Weiss, S., 2021. Neuronal Trafficking of the Amyloid Precursor Protein—What Do We Really Know? *Biomedicines* 9, 801. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070801>

Ma, Luyao, Tian, Y., Qian, T., Li, W., Liu, C., Chu, B., Kong, Q., Cai, R., Bai, P., Ma, Lisha, Deng, Y., Tian, R., Wu, C., Sun, Y., 2022. Kindlin-2 promotes Src-mediated tyrosine phosphorylation of androgen receptor and contributes to breast cancer progression. *Cell Death Dis.* 13, 482. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04945-z>

Metwally, E., Al-Abbadi, H.A., Hussain, T., Murtaza, G., Abdellatif, A.M., Ahmed, M.F., 2023. Calpain signaling: from biology to therapeutic opportunities in neurodegenerative disorders. *Front. Vet. Sci.* 10, 1235163. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1235163>

Mia, M.S., Jarajapu, Y., Rao, R., Mathew, S., 2021. Integrin  $\beta$ 1 Promotes Pancreatic Tumor Growth by Upregulating Kindlin-2 and TGF- $\beta$  Receptor-2. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 10599. <https://doi.org/10.3390/ijms221910599>

Montanez, E., Ussar, S., Schifferer, M., Bösl, M., Zent, R., Moser, M., Fässler, R., 2008. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev.* 22, 1325–1330. <https://doi.org/10.1101/gad.469408>

Müller, U.C., Deller, T., Korte, M., 2017. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 281–298. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>

Nguyen, H.T., Sawmiller, D.R., Wu, Q., Maleski, J.J., Chen, M., 2012. Evidence supporting the role of calpain in the  $\alpha$ -processing of amyloid- $\beta$  precursor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 530–535. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.03.026>

Perez, R.G., Zheng, H., Van der Ploeg, L.H.T., Koo, E.H., 1997. The  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein of Alzheimer's Disease Enhances Neuron Viability and Modulates Neuronal Polarity. *J. Neurosci.* 17, 9407–9414. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-24-09407.1997>

- Qu, H., Tu, Y., Guan, J.-L., Xiao, G., Wu, C., 2014. Kindlin-2 Tyrosine Phosphorylation and Interaction with Src Serve as a Regulatable Switch in the Integrin Outside-in Signaling Circuit. *J. Biol. Chem.* 289, 31001–31013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.580811>
- Ren, Y., Jin, H., Xue, Z., Xu, Q., Wang, S., Zhao, G., Huang, J., Huang, H., 2015. Kindlin-2 inhibited the growth and migration of colorectal cancer cells. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 36, 4107–4114. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3044-8>
- Rohn, T.T., Head, E., Nesse, W.H., Cotman, C.W., Cribbs, D.H., 2001. Activation of Caspase-8 in the Alzheimer's Disease Brain. *Neurobiol. Dis.* 8, 1006–1016. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0449>
- Sabo, S.L., Ikin, A.F., Buxbaum, J.D., Greengard, P., 2003. The Amyloid Precursor Protein and Its Regulatory Protein, FE65, in Growth Cones and Synapses In Vitro and In Vivo. *J. Neurosci.* 23, 5407–5415. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05407.2003>
- Saito, K., Elce, J.S., Hamos, J.E., Nixon, R.A., 1993. Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 2628–2632. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.7.2628>
- Shams, R., Banik, N.L., Haque, A., 2019. Chapter Four - Calpain in the cleavage of alpha-synuclein and the pathogenesis of Parkinson's disease, in: Rahman, S. (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science, Molecular Basis of Neuropsychiatric Disorders: From Bench to Bedside*. Academic Press, pp. 107–124. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2019.06.007>
- Small, D.H., Clarris, H.L., Williamson, T.G., Reed, G., Key, B., Mok, S.S., Beyreuther, K., Masters, C.L., Nurcombe, V., 1999. Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 1, 275–285. <https://doi.org/10.3233/jad-1999-14-508>
- Sosa, L.J., Bergman, J., Estrada-Bernal, A., Glorioso, T.J., Kittelson, J.M., Pfenninger, K.H., 2013. Amyloid Precursor Protein Is an Autonomous Growth Cone Adhesion Molecule Engaged in Contact Guidance. *PLoS ONE* 8, e64521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064521>
- Sullivan, S.E., Liao, M., Smith, R.V., White, C., Lagomarsino, V.N., Xu, J., Taga, M., Bennett, D.A., De Jager, P.L., Young-Pearse, T.L., 2019. Candidate-based screening via gene modulation in human neurons and astrocytes implicates FERMT2 in A $\beta$  and TAU proteostasis. *Hum. Mol. Genet.* 28, 718–735. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy376>
- Theodosiou, M., Widmaier, M., Böttcher, R.T., Rognoni, E., Veelders, M., Bharadwaj, M., Lambacher, A., Austen, K., Müller, D.J., Zent, R., Fässler, R., 2016. Kindlin-2 cooperates with talin

to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *eLife* 5, e10130. <https://doi.org/10.7554/eLife.10130>

Tu, Y., Wu, S., Shi, X., Chen, K., Wu, C., 2003. Migfilin and Mig-2 Link Focal Adhesions to Filamin and the Actin Cytoskeleton and Function in Cell Shape Modulation. *Cell* 113, 37–47. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00163-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00163-6)

Wang, Y., Hersheson, J., Lopez, D., Hamad, M.B., Liu, Y., Lee, K.-H., Pinto, V., Seinfeld, J., Wiethoff, S., Sun, J., Amouri, R., Hentati, F., Baudry, N., Tran, J., Singleton, A.B., Coutelier, M., Brice, A., Stevanin, G., Durr, A., Bi, X., Houlden, H., Baudry, M., 2016. Defects in the CAPN1 gene result in alterations in cerebellar development and in cerebellar ataxia in mice and humans. *Cell Rep.* 16, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.044>

Wang, Z., Wang, B., Yang, L., Guo, Q., Aithmitti, N., Songyang, Z., Zheng, H., 2009. Presynaptic and Postsynaptic Interaction of the Amyloid Precursor Protein Promotes Peripheral and Central Synaptogenesis. *J. Neurosci.* 29, 10788–10801.

Wei, X., Wang, X., Zhan, J., Chen, Y., Fang, W., Zhang, L., Zhang, H., 2017. Smurf1 inhibits integrin activation by controlling Kindlin-2 ubiquitination and degradation. *J. Cell Biol.* 216, 1455–1471. <https://doi.org/10.1083/jcb.201609073>

Wei, X., Xia, Y., Li, F., Tang, Y., Nie, J., Liu, Y., Zhou, Z., Zhang, H., Hou, F.F., 2013. Kindlin-2 Mediates Activation of TGF- $\beta$ /Smad Signaling and Renal Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 24, 1387–1398. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012101041>

Wen, L.-P., Fahrni, J.A., Troie, S., Guan, J.-L., Orth, K., Rosen, G.D., 1997. Cleavage of Focal Adhesion Kinase by Caspases during Apoptosis\*. *J. Biol. Chem.* 272, 26056–26061. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.41.26056>

Westphal, D., Sytnyk, V., Schachner, M., Leshchyns'ka, I., 2010. Clustering of the Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) at the Neuronal Cell Surface Induces Caspase-8- and -3-dependent Changes of the Spectrin Meshwork Required for NCAM-mediated Neurite Outgrowth. *J. Biol. Chem.* 285, 42046–42057. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.177147>

Williams, D.W., Kondo, S., Krzyzanowska, A., Hiromi, Y., Truman, J.W., 2006. Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. *Nat. Neurosci.* 9, 1234–1236. <https://doi.org/10.1038/nn1774>

Wujak, L., Böttcher, R.T., Pak, O., Frey, H., El Agha, E., Chen, Y., Schmitt, S., Bellusci, S., Schaefer, L., Weissmann, N., Fässler, R., Wygrecka, M., 2018. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 couples  $\beta$ 1 integrin activation to degradation. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 1671–1685. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2707-6>

Yang, J., Pan, T., Yang, H., Wang, T., Liu, W., Liu, B., Qian, W., 2016. Kindlin-2 promotes invasiveness of prostate cancer cells via NF- $\kappa$ B-dependent upregulation of matrix metalloproteinases. *Gene* 576, 571–576. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.11.005>

Yu, Y., Wu, J., Wang, Y., Zhao, T., Ma, B., Liu, Y., Fang, W., Zhu, W.-G., Zhang, H., 2012. Kindlin 2 forms a transcriptional complex with  $\beta$ -catenin and TCF4 to enhance Wnt signalling. *EMBO Rep.* 13, 750–758. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.88>

### **Acknowledgement**

The authors thank Charles Duyckaerts and the ‘NeuroCEB’ Brain Bank (GIE Neuro-CEB BB-0033-00011) for providing the brain tissue samples. We also thank Valérie Vingtdeux for providing the samples treated with calpain inhibitors and Olivia Beseme, and Herve Drobecq for mass spectrometry analysis. C.N. was supported by France Alzheimer Program Grant (Genetic of Synaptic Dysfunction, 6362, 2023).

### **Author’s Contribution**

Conceptualization: J.C, J-C.L, D.K

Cell culture experiments: C.N, A-M.A, A.F, D.S, F.E, E.L, D. S-W, C.G

Biochemistry analysis: C.N, P.W, F.D, A.F, A-M.A, F.E

Mouse genotyping: V.B

Writing: J.C, C.N, D.K

### **Conflicts of interest:**

None

Figure 1:

a, Representative western blot (WB) showing the electrophoretic mobility of KINDLIN2 (KD2) using protein extracts from human hippocampi harboring different Braak stages (II or VI). b, Representative WB using protein extracts from mouse PNCs at 21 days in vitro. A replicate is shown. c,d, Representative WB showing the impact of Cre expression on the electrophoretic mobility of KINDLIN2 using mouse PNCs. Black arrows indicate full-length (FL) KINDLIN2 and 57-kDa (57) and 39-kDa (39) bands. e,f Synaptic fractionation experiment revealed the presence of KINDLIN2 by-products in both pre- and post-synaptic compartments from PNCs synaptosomal purification. Syn (Synapsin) and PSD95 were used as pre- and post-synaptic markers, respectively.

Figure 2:

a, Schematic showing KINDLIN2 structure and the profile score of predicted calpain cleavages using CALPCLEAV tool (<https://calpcleav.szilab.org/>). Calpain consensus site (PGLY-SK) harbors the highest profile score. b-c, Representative WBs showing the impact of pre-treatment of calpain I inhibitors (ALLN or ALLM) (20  $\mu$ M; 30 min) on the electrophoretic mobility of KINDLIN2, as a function of ionomycin (10  $\mu$ M; 2 h) or (c) glutamate (100  $\mu$ M; 6 h) treatments of primary neurons.

Figure 3:

a, Representative WB using protein extracts from HEK293 cells transfected with KINDLIN2 cDNA (KD2) or empty vector (Mock). b, Immunoprecipitation (IP) from protein extract of cells overexpressing KINDLIN2 as in panel a, using an anti-KINDLIN2 antibody or not. c, Coomassie gel using IP extract as in b before the isolation of KINDLIN2 FL and 39-kDa bands for mass spectrometry analysis. d, Mass spectrometry spectra of isolated KINDLIN2 FL or 39-kDa fragments. Peptides identified only for KINDLIN2 FL are shown in orange. e, Schematic showing KINDLIN2 structure including the DEVD-AA consensus site predicted to be recognized by caspases. f, Representative WB using lysates of HEK293 cells transfected either with KINDLIN2 cDNA (KD2), KINDLIN2 with D347A mutation (KD2<sup>D347A</sup>) or empty vector (Mock). g, Representative WB using lysates from HEK293 cells treated with caspase inhibitor (Z-VAD-FMK; 10  $\mu$ M, during for 6 h) or DMSO. Densitometric analysis and quantification of FL, 57-kDa and 39-kDa levels in three independent experiments. Histograms indicate the mean + SD. a.u., arbitrary units. \*  $p < 0.05$ .

Figure 4:

a, Immunoprecipitation using an anti-APP antibody and protein extracts of HEK293-APP cells transfected with KINDLIN2 cDNA (KD2) or empty vector (Mock). b, Representative WBs reporting KINDLIN2 (KD) and APP levels using lysates from HEK293-APP cells transfected with cDNAs allowing the expression of KINDLIN2 FL (KD2-FL), KINDLIN2<sup>197-680</sup> (KD2-57) or KINDLIN2<sup>348-680</sup> (KD2-39) or an empty vector. c, Densitometric analysis and quantification of mature (mat.) and immature (imm.) APP and APP-CTFs for the same groups. d, A $\beta$ <sub>1-x</sub> levels in the culture medium for the same groups. N=3 independent experiments. Histograms indicate the mean + SEM. a.u., arbitrary units. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

Figure 1

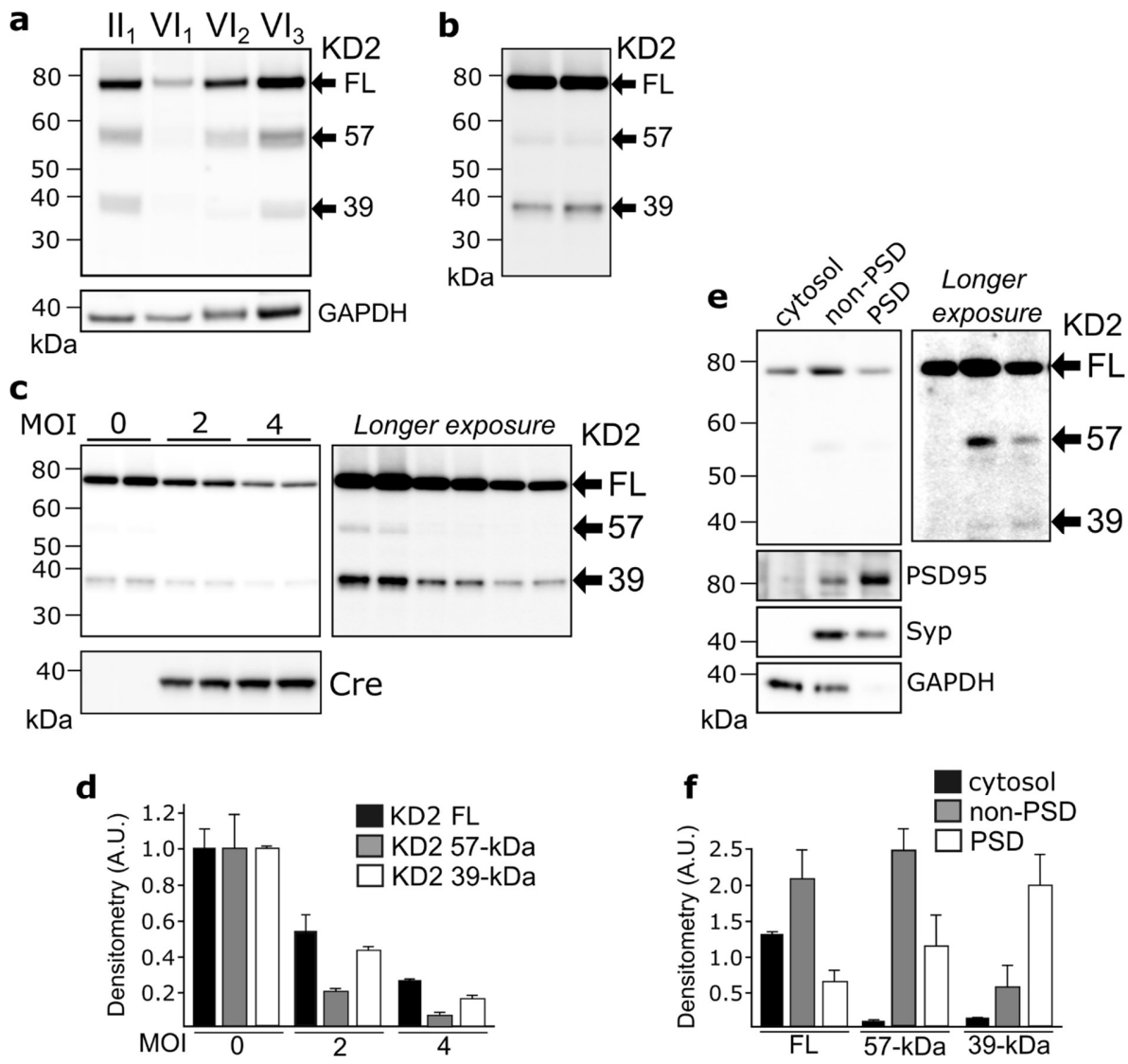


Figure 2

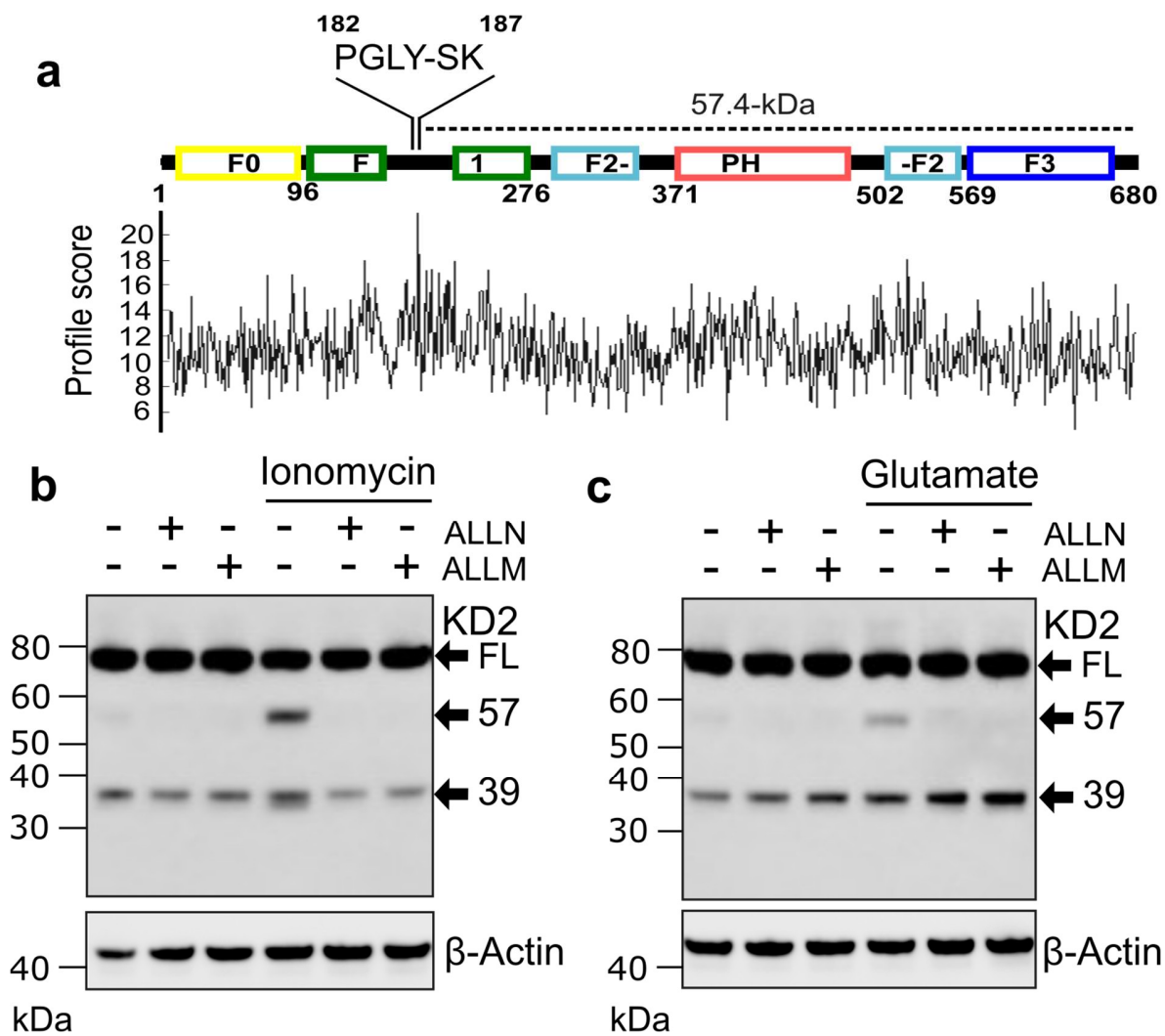


Figure 3

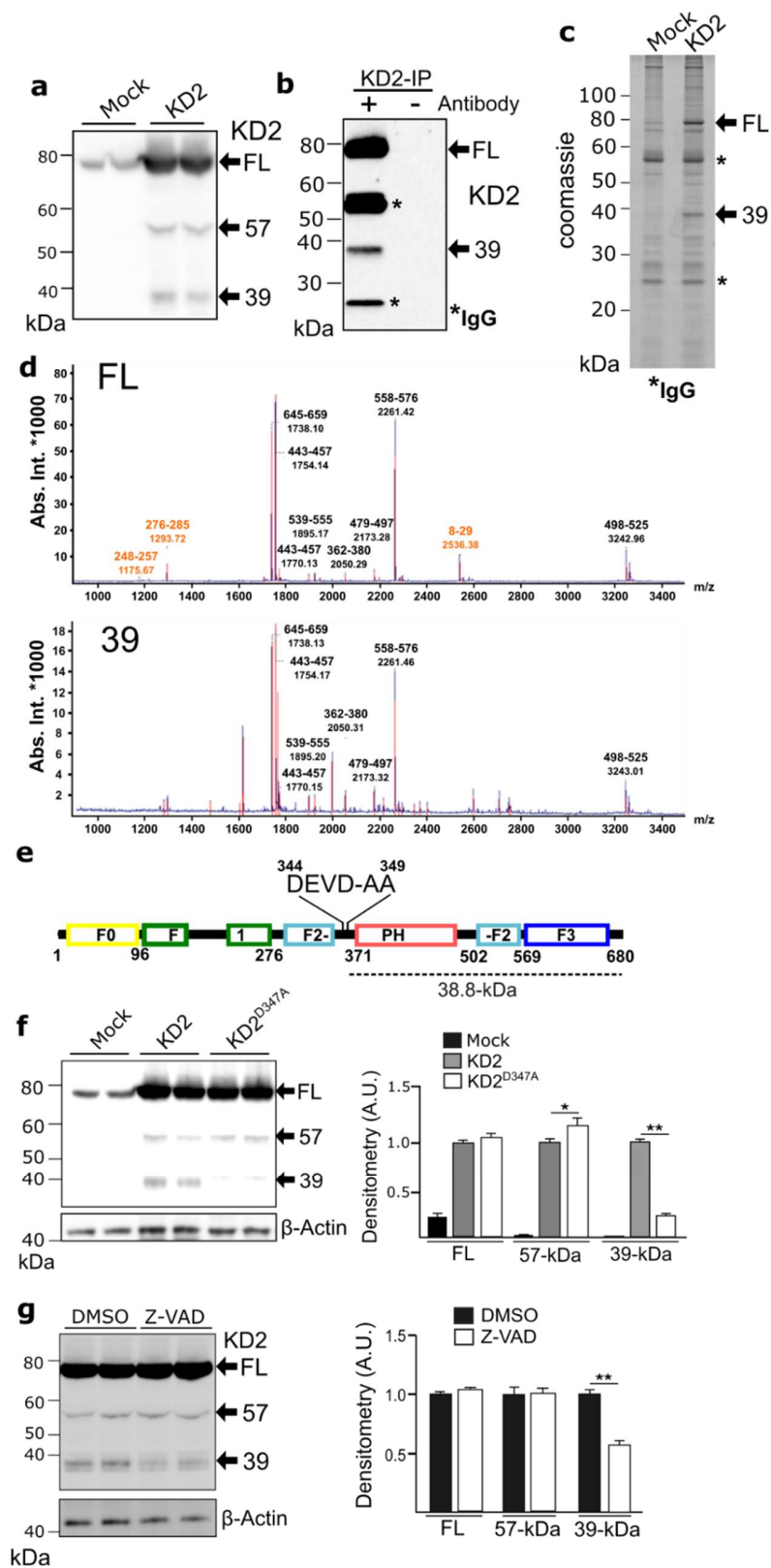
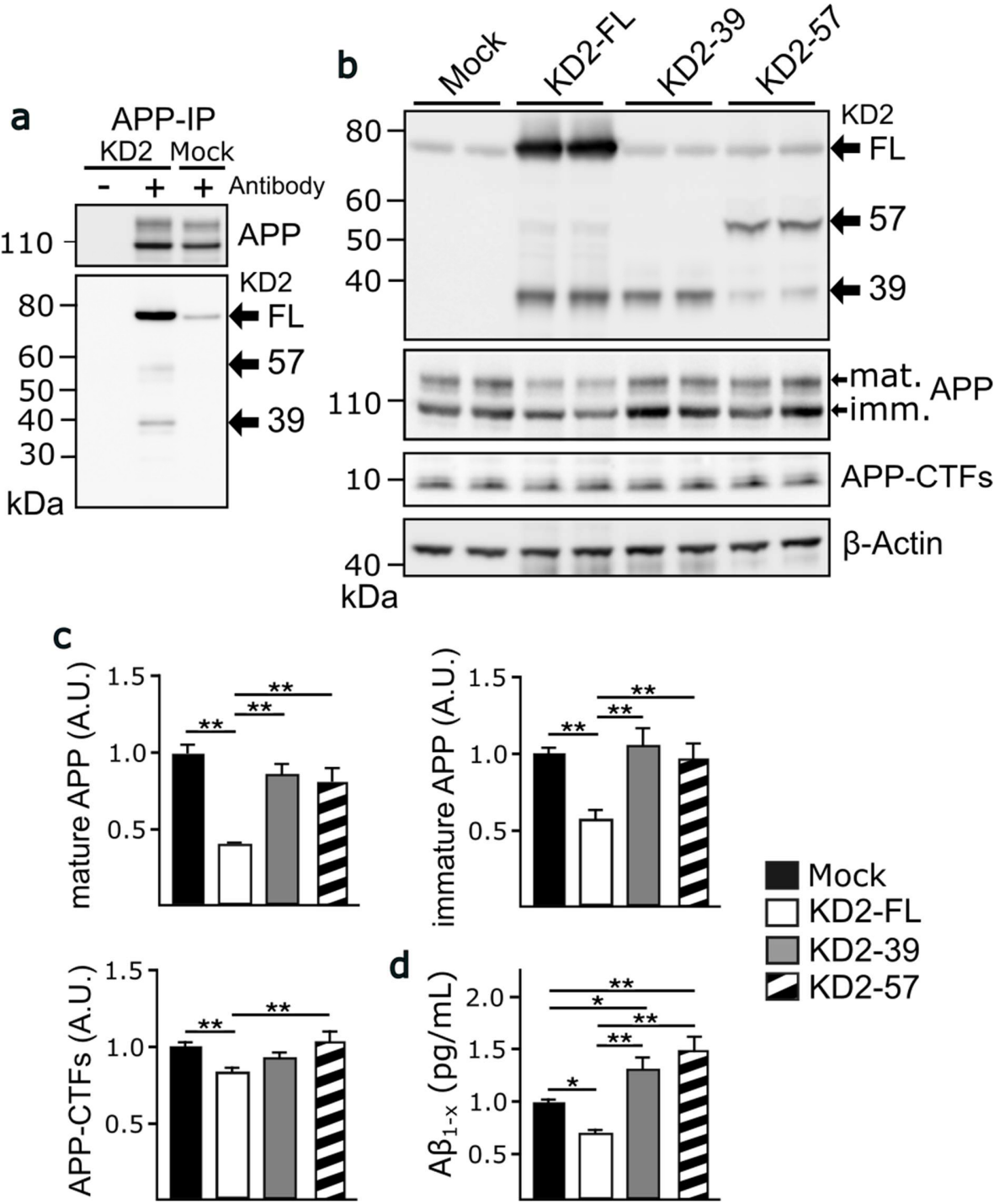




Figure 4

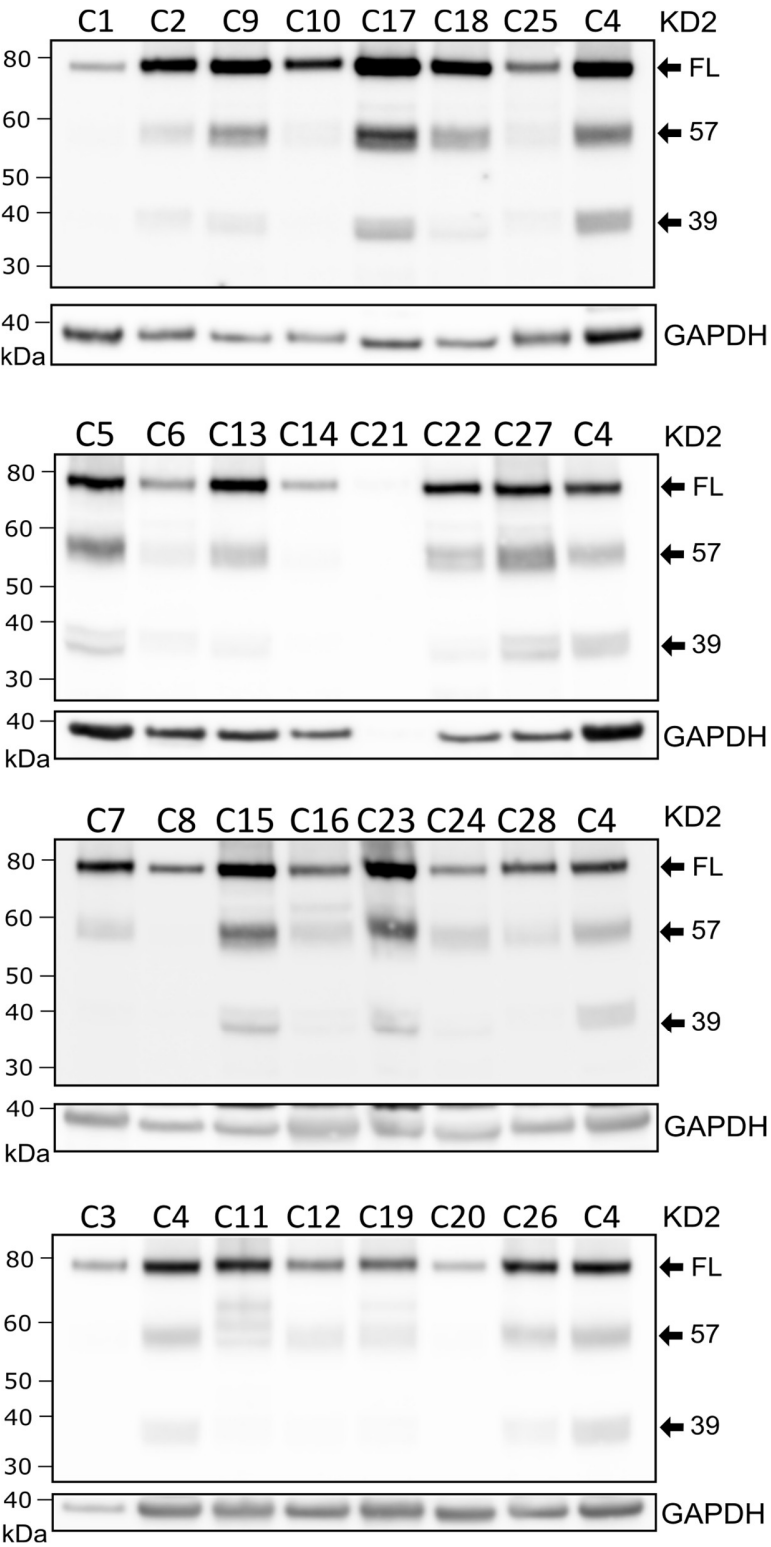


## Supplementary Material

**Table S1.** Demographic details of the neuropathological cohort. ND: Not determined. AD: Alzheimer's disease.

Individual	Gender	Age at death	Post-mortem delay (h)	Braak stage	Neuropathological diagnosis
1	F	95	ND	III	Non-AD
2	F	52	29	-	Non-AD
3	F	92	21	I	Non-AD
4	M	82	63	II	Non-AD
5	F	83	21	II	Non-AD
6	F	93	24	III	Non-AD
7	M	69	6	-	Non-AD
8	F	76	28	IV	Non-AD
9	F	48	ND	VI	AD
10	M	57	19	VI	AD
11	F	60	ND	VI	AD
12	M	72	44	VI	AD
13	F	72	5	VI	AD
14	F	78	24	VI	AD
15	M	81	17	VI	AD
16	F	85	31	VI	AD
17	F	100	67	VI	AD
18	M	67	30	VI	AD
19	M	67	ND	VI	AD
20	M	53	ND	VI	AD
21	F	56	26	VI	AD
22	F	70	ND	VI	AD
23	F	72	42	VI	AD
24	M	76	27	VI	AD
25	F	77	48	VI	AD
26	F	81	41	VI	AD
27	F	85	28	VI	AD
28	F	90	24	VI	AD

**Figure S1.** KINDLIN2 levels in the post-mortem brains of Alzheimer's disease cases and healthy controls.



**Figure S2.** KINDLIN2 protein expression level in the post-mortem brains (hippocampus) of Alzheimer's disease cases and controls.

