



Université de Lille
École graduée Biologie Santé de Lille

Étude des interactions entre les facteurs de risque génétique BIN1 et PTK2B de la maladie d'Alzheimer

Thèse de doctorat présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en neurosciences

Soutenue publiquement le 18 décembre 2025 par :

Valentin LECLERC

Devant le jury composé de :

Dr Magalie LECOURTOIS ¹ , PhD, HDR	Rapportrice
Dr Serge BIRMAN ² , PhD, HDR	Rapporteur
Dr Marie-Laure PARMENTIER ³ , PhD, HDR	Examinatrice et Présidente du jury
Dr Jean-Antoine GIRAULT ⁴ , PhD, HDR	Examinateur
Dr Jean-Charles LAMBERT ⁵ , PhD, HDR	Examinateur et Directeur de l'équipe
Dr Pierre DOURLEN ⁵ , PhD, HDR	Directeur de thèse
Dr Isabelle LANDRIEU ⁵ , PhD, HDR	Invitée

¹Université de Rouen, ²Université Paris Cité, ³Université de Montpellier, ⁴Sorbonne Université, ⁵Université de Lille



Remerciements

Je souhaiterais remercier en premier lieu l'INSERM et la Région Hauts-de-France, principaux financeurs de ce travail. Des appuis complémentaires ont également été apportés par les associations France Alzheimer et Vaincre Alzheimer, que je remercie également.

Je souhaite également remercier le campus de l'Institut Pasteur de Lille pour la qualité de ses infrastructures et de son environnement scientifique, en particulier l'animalerie PLEHTA et la plateforme de microscopie BICeL, dont le soutien technique a été essentiel à la réalisation de ce projet.

Je remercie Dr Magalie Lecourtois, Dr Marie-Laure Parmentier, Dr Serge Birman et Dr Jean-Antoine Girault d'avoir accepté d'évaluer ce travail et de siéger au jury de cette thèse. C'est pour moi un honneur de bénéficier de leur expertise.

Je souhaite également remercier Dr Marie-Laure Parmentier et Dr Laurent Seugnet, membres de mon comité de suivi individuel, pour leurs conseils toujours pertinents et leur bienveillance.

Je tiens à remercier le Dr Philippe Amouyel pour m'avoir accueilli au sein de l'unité et m'avoir permis d'y réaliser mes travaux de thèse dans d'excellentes conditions. Je lui suis reconnaissant pour la confiance qu'il m'a accordée et pour l'environnement scientifique de grande qualité qu'il a contribué à offrir.

Je remercie chaleureusement le Dr Jean-Charles Lambert pour son accueil au sein de son équipe et pour m'avoir offert un environnement scientifique aussi stimulant qu'exigeant. J'ai beaucoup apprécié sa disponibilité, ses conseils toujours pertinents et sa capacité à replacer chaque résultat dans une vision d'ensemble cohérente et ambitieuse de la recherche, portée par un optimisme constant.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Dr Pierre Dourlen pour la qualité exceptionnelle de son encadrement tout au long de cette thèse, et pour m'avoir accompagné depuis mes débuts en Master. J'ai eu la chance rare de bénéficier d'un accompagnement à la fois exigeant et bienveillant, où l'équilibre entre autonomie et soutien a toujours été juste. Pierre incarne à mes yeux l'essence même du chercheur parfait : une curiosité insatiable, une rigueur scientifique exemplaire, un sens aigu de la précision et une intégrité intellectuelle irréprochable. Son approche de la recherche m'a profondément inspiré et a façonné ma manière d'aborder la science. Je lui suis sincèrement reconnaissant de m'avoir transmis, au-delà des compétences techniques, une véritable éthique de travail et une exigence intellectuelle que je tâcherai de faire vivre dans la suite de mon parcours. Merci mille fois pour ton temps, ton aide et tout ce que tu m'as apporté.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à la team Droso, qui a grandement contribué à faire de ces années de thèse une aventure à la fois scientifique et humaine. Un immense merci à Xavier Hermant, véritable pilier du groupe, pour sa patience, son aide constante et son incroyable disponibilité. Dès mon arrivée, il a su me transmettre son savoir-faire et sa passion du modèle toujours avec bienveillance. Merci également à Dr Erwan Lambert, qui m'a accompagné dans mes premiers pas sur le modèle et m'a aidé à reprendre le flambeau de doctorant dans la continuité de ses travaux. Je garde de très bons souvenirs de nos échanges, aussi bien au labo qu'en dehors. Je souhaite aussi remercier Tommy Malfoi, pour son soutien aussi amical que professionnel. Enfin, une pensée toute particulière pour Lucie Liefoghe, dont la détermination, la force de caractère et le talent suscitent l'admiration. Nos moments partagés, entre le labo, les fléchettes et les séances d'escalade, comptent parmi les plus précieux souvenirs de ces années. Je te souhaite de tout cœur le meilleur pour la belle aventure doctorale qui s'ouvre à toi.

Un immense merci à tous les membres de l'équipe 3, pour ce que vous m'avez apporté sur les plans professionnel et humain. Votre bienveillance, l'entraide et les moments partagés ont rendu ces années plus riches et stimulantes.

Je remercie également Dr Patrik Verstreken et son équipe pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire le temps d'un mois pour ma mobilité. En particulier la Dr Sabine Kuenen pour son aide précieuse sur les expériences d'électrophysiologie.

Au cours de ces cinq années passées au laboratoire depuis mon arrivée en stage de Master 1, j'ai eu la chance de croiser de nombreuses personnes qui ont, chacune à leur manière, marqué ce parcours et rendu ces années inoubliables. Beaucoup de collègues sont devenus de vrais amis, et je garde précieusement le souvenir des moments partagés. Je pense d'abord à Rislane et Thibaut, compagnons de mes débuts en recherche, avec qui tout a commencé. Je remercie tout particulièrement mes collègues les plus proches Nina, Pauline, Aurore et Florian avec qui j'ai partagé le meilleur bureau du labo, et tant de moments de travail, de rires et de complicité. Un remerciement particulier à la « Fam » : Nina, Flavie, Mel et Louay avec qui j'ai partagé les meilleurs moments de ces années. Votre présence a rendu le quotidien plus joyeux. Enfin, je tiens à adresser un mot tout spécial à Nina Lannette, collègue brillante et véritable amie. Depuis notre arrivée commune au laboratoire en Master 1, nous avons traversé ensemble toutes les étapes de ce parcours, les réussites comme les galères. Ton intelligence, ta détermination et ta bienveillance ont été une source constante d'inspiration. Je suis profondément reconnaissant d'avoir partagé cette aventure à tes côtés, et heureux d'avoir trouvé en toi une amitié aussi solide que sincère.

Enfin, je souhaite exprimer toute ma gratitude à ma famille, pour son soutien indéfectible et sa confiance constante tout au long de ces années. Je remercie profondément mes parents, qui ont toujours cru en moi, m'ont encouragé dans chacun de mes choix et ont tout fait pour m'offrir les meilleures chances de réussir. J'ai également une pensée toute particulière pour ma sœur, dont la présence à Lille durant cette période a été un vrai repère. Les moments partagés ensemble, hors du labo, ont apporté de la légèreté, de la complicité et une belle parenthèse familiale au milieu de ces années intenses.

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est la cause de démence la plus répandue à travers le monde. Elle est caractérisée par l'accumulation extracellulaire du peptide amyloïde- β , l'agrégation intracellulaire de la protéine Tau ainsi qu'une perte progressive précoce des synapses. La forme la plus courante de la maladie est d'origine multifactorielle et relève d'une combinaison complexe de facteurs environnementaux et génétiques. Les études d'association pangénomique ont mis en évidence de nombreux gènes de susceptibilité, dont *BIN1* et *PTK2B*, considérés parmi les principaux modulateurs du risque de MA. Ces deux protéines, localisées aux synapses, interviennent dans la dynamique membranaire, l'organisation du cytosquelette et la signalisation calcique, autant de processus essentiels à la transmission et la plasticité synaptique. Pourtant, leurs relations fonctionnelles n'avaient pas été abordées.

Cette thèse visait à explorer l'interaction fonctionnelle entre *BIN1* et *PTK2B* et à déterminer son rôle au niveau synaptique. Deux modèles expérimentaux complémentaires ont été mobilisés : le modèle de la Drosophile, *Drosophila melanogaster*, un modèle *in vivo* permettant des analyses génétiques fines et la culture primaire de neurones hippocampiques de rat, un modèle mammifère offrant un cadre cellulaire plus proche de la physiologie humaine.

Chez la Drosophile, j'ai généré des lignées recombinantes portant les délétions simples ou combinées des orthologues de *BIN1* et de *PTK2B*, respectivement nommés *Amph* et *Fak*, afin d'en analyser les effets synaptiques. J'ai observé que le phénotype de croissance excessive de la jonction neuromusculaire connu chez les mutants délétés pour *Fak* est corrigé dans le mutant doublement délété pour *Amph* et *Fak*. De plus, je décris une augmentation du nombre de ramifications de ces jonctions dans les mutants délétés pour *Amph*, phénotype jusque-là inconnu, qui est exacerbé en double délétion. En parallèle, le défaut locomoteur connu associé à la mutation d'*Amph* est amplifié dans le double mutant. Des enregistrements électrophysiologiques confirment l'implication fonctionnelle synaptique d'*Amph* et de *Fak* et vont dans le sens des altérations morphologiques observées. Ces résultats démontrent une interaction fonctionnelle entre *Amph* et *Fak* et suggèrent que ces gènes régulent la morphogénèse synaptique.

Chez les neurones de rat, je montre une colocalisation entre *BIN1* et *PTK2B* par immunofluorescence et test de proximité moléculaire. L'inactivation combinée de *BIN1* et *PTK2B* perturbe l'arborisation dendritique, la distribution des marqueurs synaptiques et la densité synaptique. L'ensemble de ces résultats converge donc également vers l'existence d'une interaction fonctionnelle *BIN1-PTK2B* au sein de la synapse, impliquée dans le développement ou la stabilisation des structures synaptiques, et conservée au cours de l'évolution.

Ainsi, ce travail met en lumière une interaction fonctionnelle entre deux facteurs de risque génétique de la MA. Il renforce l'hypothèse d'une vulnérabilité synaptique d'origine génétique dans la MA, à savoir que la synapse constitue un nœud central où convergent les effets des gènes à risque de la MA. Cette interaction fonctionnelle pourrait représenter un mécanisme clé reliant les altérations de la dynamique membranaire, le complexe d'adhésion focale et les cascades de signalisation calcique impliquées dans la dégénérescence synaptique.

Les perspectives de ce travail visent à identifier les voies moléculaires et les partenaires spécifiques de l'axe *BIN1-PTK2B* et à replacer cette interaction dans le contexte physiopathologique de la MA. En disséquant ces interactions, ce travail participe à la construction d'un modèle intégratif de la MA et à l'émergence de stratégies thérapeutiques plus ciblées et personnalisées fondées sur la vulnérabilité génétique propre à chaque individu.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia worldwide. It is characterized by the extracellular accumulation of amyloid- β peptide, the intracellular aggregation of Tau protein, and an early progressive loss of synapses. The most prevalent form of the disease is multifactorial, resulting from a complex combination of environmental and genetic factors. Genome-wide association studies have identified numerous susceptibility genes, among which *BIN1* and *PTK2B* are considered major modulators of AD risk. Both proteins are located at synapses, where they contribute to membrane dynamics, cytoskeletal organization, and calcium signaling processes essential for synaptic transmission and plasticity. However, their functional relationship had not yet been addressed.

This thesis aimed to explore the functional interaction between *BIN1* and *PTK2B* and to determine its role at the synaptic level. Two complementary experimental models were used: the fruit fly *Drosophila melanogaster*, an *in vivo* model allowing fine genetic analyses, and primary cultures of rat hippocampal neurons, a mammalian model providing a cellular framework closer to human physiology.

In *Drosophila*, I generated recombinant lines carrying single or combined deletions of the orthologs of *BIN1* and *PTK2B*, respectively named *Amph* and *Fak*, to analyze their synaptic effects. I observed that the neuromuscular junction overgrowth phenotype known in *Fak*-deleted mutants was rescued in the double *Amph-Fak* mutant. Moreover, I describe an increase in terminal branching of the neuromuscular junction in *Amph*-deleted mutants, a previously undescribed phenotype, which is exacerbated in the double deletion. In parallel, the locomotor defect associated with *Amph* mutation was amplified in the double mutant. Electrophysiological recordings confirmed the functional synaptic involvement of *Amph* and *Fak* and were consistent with the morphological alterations observed. These results demonstrate a functional interaction between *Amph* and *Fak* and suggest that these genes regulate synaptic morphogenesis.

In rat neurons, I show colocalization of *BIN1* and *PTK2B* by immunofluorescence and proximity ligation assays. The combined knockdown of *BIN1* and *PTK2B* disrupted dendritic arborization, synaptic marker distribution, and synaptic density. Altogether, these findings also support the existence of a functional *BIN1-PTK2B* interaction within the synapse, involved in the development or stabilization of synaptic structures, and conserved throughout evolution.

Thus, this work highlights a functional interaction between two genetic risk factors for AD. It reinforces the concept of a genetically driven synaptic vulnerability in AD, in which the synapse represents a central hub where the effects of risk genes converge. This functional interaction

may represent a key mechanism linking alterations in membrane dynamics, the focal adhesion complex, and calcium-dependent signaling cascades involved in synaptic degeneration.

The perspectives of this work aim to identify the molecular pathways and specific partners of the *BIN1-PTK2B* axis and to reposition this interaction within the pathophysiological context of AD. By dissecting these interactions, this study contributes to building an integrative model of Alzheimer's disease and to the emergence of more targeted and personalized therapeutic strategies based on each individual's genetic vulnerability profile.

Résumé vulgarisé pour le grand public

La maladie d'Alzheimer est la principale cause de démence dans le monde et s'accompagne d'une perte progressive précoce des connexions entre neurones appelées synapses. Le risque de la développer varie selon chacun, car il résulte de l'action conjointe de nombreux facteurs environnementaux et génétiques. Parmi ces derniers, les gènes *BIN1* et *PTK2B* figurent parmi les plus influents. En utilisant deux modèles complémentaires, la mouche *Drosophile in vivo* et la culture *in vitro* de neurones de rat, je montre que l'absence de ces gènes altère le nombre et la morphologie des synapses. Ces altérations sont accrues ou abolies par l'absence conjointe des deux gènes, indiquant une interaction fonctionnelle entre les deux gènes au niveau synaptique. Ces résultats révèlent une nouvelle facette de la vulnérabilité synaptique de la maladie d'Alzheimer et ouvrent la voie à des approches thérapeutiques plus ciblées et personnalisées, adaptées au profil génétique de chacun.

Alzheimer's disease is the leading cause of dementia worldwide and is characterized by an early and progressive loss of the connections between neurons, called synapses. The risk of developing the disease varies from person to person, as it results from the combined influence of numerous environmental and genetic factors. Among the latter, the genes *BIN1* and *PTK2B* are among the most influential. Using two complementary models, the *in vivo* fruit fly *Drosophila* and the *in vitro* cultured rat neurons, I show that the absence of these genes alters the number and morphology of synapses. These alterations are either amplified or rescued when both genes are simultaneously deleted, indicating a functional interaction between them at the synaptic level. These findings reveal a new aspect of Alzheimer's synaptic vulnerability and pave the way for more targeted and personalized therapeutic approaches adapted to each individual's genetic profile.

Publications et Communications

Ce travail de thèse a donné lieu à la publication suivante :

BIN1 expression in the presynaptic compartment leads to isoform-specific synaptotoxicity

Erwan Lambert*, Carla Gelle*, **Valentin Leclerc***, Alejandra Freire-Regatillo*, Nicolas Barois, Tommy Malfoi, Xavier Hermant, Florie Demiautte, Frank Lafont, Philippe Amouyel, Karine Blary, Sabine Kuenen, Chloé Najdek, Patrik Verstecken, Dolores Siedlecki-Wullich, Pierre Yger, Jean-Charles Lambert, Devrim Kilinc, Pierre Dourlen

bioRxiv 2025.08.11.669624; doi: <https://doi.org/10.1101/2025.08.11.669624>

* co-premier auteur

Ainsi qu'aux communications suivantes:

- Congrès EuroTau

Présentation d'un poster : « Study of the interactions between the Alzheimer's disease genetic risk factors BIN1 and PTK2B » - Lille, Avril 2023.

- Congrès ADPD (Alzheimer's and Parkinson's Diseases and related neurological Disorders)

Présentation d'un poster : « Study of the interactions between Alzheimer's disease genetic risk factor BIN1 and PTK2B » - Vienne, Avril 2025.

- 6^{èmes} journées scientifiques francophones du CALM (Club Alzheimer de Montpellier)

Présentation d'un DiapAlz : « Étude de l'interaction entre les facteurs de risque génétique BIN1 et PTK2B de la maladie d'Alzheimer » - En distanciel, Novembre 2022.

- 7^{èmes} journées scientifiques francophones du CALM (Club Alzheimer de Montpellier)

Présentation d'un DiapAlz : « Étude des interactions entre les facteurs de risque génétique BIN1 et PTK2B de la maladie d'Alzheimer » - En distanciel, Novembre 2023.

- 8^{èmes} journées scientifiques francophones du CALM (Club Alzheimer de Montpellier)

Présentation d'un DiapAlz : « Les facteurs de risque génétique de la maladie d'Alzheimer BIN1 et PTK2B interagissent dans les neurones de Drosophile et de rongeurs » + Prix du public - En distanciel, Novembre 2024.

- Summer School du Programme Gradué « Precision Health »

Présentation d'un poster : « Study of the interactions between the Alzheimer's disease genetic risk factors BIN1 and PTK2B » - Lille, Juillet 2023.

- Summer Scholl du Programme Gradué « Precision Health »

Présentation d'un poster et d'un flash talk: « The Alzheimer's disease genetic risk factors BIN1 and PTK2B interact in Drosophila and rodent neurons » + Prix du meilleur flash talk - Lille, Juillet 2024.

- Summer Scholl du Programme Gradué « Precision Health »

Présentation d'un poster et d'un flash talk : « The Alzheimer's disease genetic risk factors BIN1 and PTK2B interact in Drosophila and rodent neurons » + Prix du meilleur poster - Lille, Juillet 2025.

- Thèse en 180 secondes – Unité INSERM1167

Présentation orale : « Étude des interactions entre les facteurs de risque génétique BIN1 et PTK2B de la maladie d'Alzheimer » - Institut Pasteur de Lille, Octobre 2022.

- Thèse en 180 secondes – Unité INSERM1167

Présentation orale : « Étude des interactions entre les facteurs de risque génétique BIN1 et PTK2B de la maladie d'Alzheimer » - Institut Pasteur de Lille, Octobre 2023.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé.....	5
Abstract.....	7
Résumé vulgarisé pour le grand public.....	9
Publications et Communications.....	10
Abréviations	15
Introduction	19
La maladie d'Alzheimer : une maladie neurodégénérative complexe et multifactorielle	19
Découverte et historique de la maladie d'Alzheimer.....	19
Épidémiologie et enjeux sociétaux.....	20
Bases neuropathologiques.....	22
Dépôts amyloïdes et peptide A β	22
Protéine Tau et dégénérescences neurofibrillaires	24
Neuroinflammation	27
Perte synaptique et dysfonction neuronale.....	28
Les signes cliniques.....	31
Diagnostic et thérapies	32
Les différentes formes de la Maladie d'Alzheimer.....	35
La forme monogénique de la maladie : l'impact des mutations <i>APP</i> , <i>PSEN1</i> et <i>PSEN2</i> ...	35
Mutations du gène <i>APP</i>	35
Mutations du gène <i>PSEN1</i>	36
Mutations du gène <i>PSEN2</i>	37
La forme multifactorielle de la maladie.....	39
Facteurs environnementaux non modifiables : l'âge et le sexe.....	39
Facteurs environnementaux modifiables	40
Facteurs génétiques : <i>APOE</i>	44
Facteurs génétiques : Nouvelles identifications grâce aux GWAS et WES/WGS.....	45
Focus sur les facteurs de risque génétique <i>BIN1</i> et <i>PTK2B</i>	49
<i>BIN1</i> , une protéine adaptatrice aux multiples rôles	49
Gène <i>BIN1</i> et ses isoformes.....	49
Domaines protéiques de <i>BIN1</i>	51
Fonctions physiologiques de <i>BIN1</i> dans le cerveau.....	52
<i>BIN1</i> et la maladie d'Alzheimer.....	54
<i>PTK2B</i> / <i>Pyk2</i> : une tyrosine kinase au carrefour des signaux synaptiques	62
<i>PTK2B</i> : Gène et isoformes	62

Domaines protéiques de Pyk2.....	64
Fonctions physiologiques de Pyk2 dans le cerveau.....	66
<i>PTK2B</i> et la maladie d'Alzheimer	67
La Drosophile	73
La jonction neuromusculaire de la Drosophile : un modèle de référence pour l'étude de la synapse et des boutons synaptiques	73
<i>Amph</i> : un orthologue de <i>BIN1</i> dans le système nerveux de la drosophile	75
Description de <i>Amph</i> et homologie avec <i>BIN1</i>	75
Fonctions synaptiques d' <i>Amph</i> chez la Drosophile.....	76
<i>Fak</i> : un orthologue de <i>PTK2B</i> à la fonction synaptique conservée chez la drosophile	78
Description de <i>Fak</i> et homologie avec <i>PTK2B</i>	78
Fonctions synaptiques de <i>Fak</i> chez la Drosophile	78
Les hypothèses au centre de ce projet de thèse.....	79
Synapse centrale et vulnérabilité génétique	79
Isoformes de <i>BIN1</i> et synaptotoxicité.....	81
Vers une interaction entre <i>BIN1</i> et <i>PTK2B</i>	82
Objectifs et stratégie expérimentale.....	84
Matériels et Méthodes	85
Gestion des Drosophiles.....	85
Recombinaison génétique.....	86
PCR génomique	86
Test de l'épilepsie chez la Drosophile	87
Test de locomotion par géotaxie négative	88
Dissection et marquage des JNM	88
Électrorétinogramme.....	90
Électrophysiologie sur JNM.....	90
Culture primaire de neurones de rat.....	91
Immunofluorescence.....	92
Proximity Ligation Assay	92
Western Blot	94
Microscopie	94
Analyse d'images.....	95
Tests statistiques	95
Liste des anticorps	96
Liste des lentivirus	96
Résultats	97

Objectif 1 : Caractérisation de l'impact de la surexpression de BIN1 isoforme 1 sur la JNM de la Drosophile et de son sauvetage par Rab11	97
Impact des différentes isoformes de BIN1 sur la JNM	97
Étude du sauvetage de l'effet de BIN1 iso1 sur la JNM de la Drosophile par Rab11.....	99
Objectif 2 : Caractérisation de l'interaction entre les facteurs de risque génétique <i>BIN1</i> et <i>PTK2B</i> de la maladie d'Alzheimer	102
Étude <i>in vivo</i> chez la Drosophile	102
Génétique de la Drosophile : caractéristiques des délétions <i>Amph</i> et <i>Fak</i>	102
Génétique de la Drosophile : création des lignées recombinantes doubles mutantes <i>Amph</i> et <i>Fak</i>	104
La susceptibilité épileptique associée à <i>Fak</i> ^{CG1} n'est pas due à la perte de <i>Fak</i> mais à un variant de fond	106
Le double KO potentialise le déficit locomoteur observé en <i>Amph</i> KO	108
Analyse morphologique de la jonction neuromusculaire	110
Analyses fonctionnelles électrophysiologiques	121
Conservation de l'interaction chez les mammifères.....	128
Optimisation de la transduction pour l'inactivation de BIN1	128
Optimisation de la transduction pour l'inactivation de PTK2B	129
Co-localisation BIN1-PTK2B dans des neurones hippocampiques en culture primaire	131
Réduction d'expression simple et double de <i>BIN1</i> et <i>PTK2B</i> dans les PNC : validation et quantification	134
BIN1 et PTK2B interagissent fonctionnellement pour réguler l'architecture dendritique et la connectivité synaptique des neurones hippocampiques de rat	136
Discussion	140
Synthèse et interprétation des résultats	140
Hypothèses mécanistiques / Dans quelles voies de signalisation cette interaction BIN1-PTK2B pourrait être impliquée ?	144
Hypothèse sur le rôle de l'interaction BIN1-PTK2B dans le contexte pathologique	151
Activation aberrante de l'axe intégrine-PTK2B/Src et phosphorylation pathologique de Tau	151
Perturbation du trafic endosomal par BIN1-PTK2B.....	152
Dérégulation calcique et plasticité synaptique altérée via BIN1-PTK2B	154
Perspectives	156
Conclusion	158
Bibliographie	160
Annexes	192

Abréviations

AAV : Virus Adéno-Associé

A β : Amyloïde- β

ABCA1 : ATP-binding cassette sub-family A member 1

ABCA7 : ATP Binding Cassette Subfamily A Member 7

ABI3 : ABI Family Member 3

ADAM10 : A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein 10

AIS : Axon Initial Segment

AMPA : Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionique

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

APOC1 : Apolipoprotéine C-1

APOE : Apolipoprotéine E

APP : Amyloid Precursor Protein

ARIA : Amyloid-Related Imaging Abnormalities

ARN : Acide Ribonucléique

BACE1 : β -site APP Cleaving Enzyme 1

BAR : Bin-Amphiphysin-Rvs

BIN1 : Bridging Integrator 1

BRP : Bruchpilot

CBD : Dégénérescence Cortico-Basale

CD2AP : CD2 Associated Protein

CD33 : Cluster de Différenciation 33

cKO : Knock-out conditionnel

CLAP : Clathrin and AP2-binding

CLU : Clusterine

CNM : Myopathie Centronucléaire

CR1 : Récepteur du Complément 1

DNM2 : Dynamine 2

EHBP1L1 : EH domain Binding Protein 1 Like 1

EHD : Eps15 Homology Domain-containing protein

eEJP : Potentiel de Jonction Excitateur évoqué

EPHA1 : Ephrin Type-A Receptor 1

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
FAK : Focal Adhesion Kinase
FASII : Fascicline II
FAT : Focal Adhesion Targeting
FDA : Food and Drug Administration
FERM : Four-point-one Ezrin Radixin Moesin
FTLD : Dégénérescence Lobo-Frontotemporale
GABA : Acide γ -aminobutyrique
GMR : Glass Multiple Reporter
GRN : Granulin Precursor Gene
GWAS : Genome-Wide Association Studies
iGluR : Ionotropic Glutamate Receptor
IRF1 : Interferon Regulatory Factor 1
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ITC : Calorimétrie Isotherme de Titration
JNM : Jonction Neuromusculaire
KO : Knock-out
LCR : Liquide Céphalorachidien
LKB1 : Liver Kinase B1
LRP1 : Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1
LTD : Dépression à Long Terme
LTP : Potentialisation à Long Terme
MA : Maladie d'Alzheimer
MAGUK : Membrane-Associated GUanylate Kinase
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
MAPT : Microtubule Associated Protein Tau
MBD : Myc-Binding Domain
MCI : Mild Cognitive Impairment
MEA : Micro-électrodes Multipôles
MEF2C : Myocyte Enhancer Factor 2C
mEJP : Potentiel de Jonction Excitateur miniature
MOI : Multiplicity Of Infection

MS4A4E : Membrane Spanning 4-Domains A4E
MS4A6A : Membrane Spanning 4-Domains A6A
NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule
NES : Nuclear Export Signal
NF1 : Neurofibromine 1
NLS : Nuclear Localization Signal
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NTS : N-Terminal Sequence
N-WASP : Neural Wiskott–Aldrich Syndrome Protein
PAST1 : Phosphatidylinositol-Associated Scaffold Protein 1
PI : Phosphoinositide
PICALM : Phosphatidylinositol Binding Clathrin Assembly Protein
PKA : Protein Kinase A
PLCG2 : Phospholipase C Gamma 2
PSD95 : Protéine 95 de la Densité Post-Synaptique
PSEN1 : Presenilin 1
PSEN2 : Presenilin 2
PSP : Paralyse Supranucléaire Progressive
PTK2B : Protein Tyrosine Kinase 2 Beta
PRD : Domaine Riche en Proline
PRNK : Proline-Rich Non-Kinase domain
PYK2 : Proline-rich Tyrosine Kinase 2
RIN3 : Ras and Rab Interactor 3
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SH3 : Src Homology 3
SHF : Stimulation Haute Fréquence
shRNA : Short Hairpin RNA
SING : Startle-Induced Negative Geotaxis
SNP : Single Nucleotide Polymorphisms
SPR : Résonance Plasmonique de Surface
SSR : Réticulum Sous-Synaptique
STB : Stimulation en Salves Thêta

SORL1 : Sortilin Related Receptor 1

SPPL2A : Signal Peptide Peptidase Like 2A

TEP : Tomographie par Émission de Positons

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

TNIP1 : TNFAIP3-Interacting Protein 1

TREM2 : Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2

UBA7 : Ubiquitin Like Modifier Activating Enzyme 7

vGLUT1 : vesicular Glutamate Transporter 1

WES : Whole Exome Sequencing

WGS : Whole Genome Sequencing

ZA : Zone Active

Introduction

La maladie d'Alzheimer : une maladie neurodégénérative complexe et multifactorielle

Découverte et historique de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est aujourd'hui reconnue comme la principale cause de démence dans le monde, représentant 60 à 70 % des cas (World Alzheimer Report 2023). Elle fut décrite pour la première fois en 1906 par le neurologue allemand Alois Alzheimer, à partir de l'étude clinique et histopathologique d'Auguste Deter, une patiente de 51 ans présentant des troubles de mémoire, une désorientation spatio-temporelle et un déclin progressif des fonctions cognitives et langagières. L'examen post-mortem révéla deux anomalies cérébrales caractéristiques : des dépôts amyloïdes extracellulaires, appelés « plaques séniles », et des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires (Alzheimer et al 1995).

En 1910, Emil Kraepelin, psychiatre et mentor d'Alzheimer, introduisit le terme « maladie d'Alzheimer » dans la 8^e édition de son traité Psychiatrie (Kraepelin E, Psychiatrie. 8^e éd. 1910). Durant plusieurs décennies, la pathologie fut considérée comme une forme rare de démence précoce, distincte de la « démence sénile » liée au vieillissement. Ce n'est qu'à partir des années 1960, avec les travaux de Tomlinson et Blessed (Blessed et al 1968), qu'il fut démontré que les mêmes lésions étaient présentes chez les personnes âgées atteintes de démence. Cette observation entraîna l'unification des deux entités cliniques sous un seul diagnostic : la maladie d'Alzheimer, quel que soit l'âge d'apparition.

En 1976, Davies et Maloney mirent en évidence une réduction importante de l'acétylcholine dans le cerveau de patients atteints, révélant ainsi un déficit marqué du système cholinergique (Davies et al 1976). Cette découverte suggéra pour la première fois que la neurotransmission pouvait être profondément altérée dans la maladie. En 1984, Glenner et Wong parvinrent à isoler la protéine β -amyloïde ($A\beta$) à partir des plaques séniles observées dans le cerveau des patients (Glenner et al 1984). Cette avancée ouvrit la voie à une exploration approfondie des mécanismes de formation et de dépôt de l' $A\beta$, un élément clé dans la physiopathologie de la maladie. Deux ans plus tard, en 1986, Brion et ses collaborateurs démontrèrent que les enchevêtrements neurofibrillaires étaient composés de protéine Tau anormalement hyperphosphorylée (Brion et al 1986). Cette observation introduisit un deuxième acteur majeur, aux côtés de l' $A\beta$, dans la compréhension des processus neurodégénératifs.

Ces découvertes préparèrent le terrain à la formulation, en 1992, de l'hypothèse amyloïde par Hardy et Higgins (Hardy et al 1992), posant l'accumulation d' $A\beta$ comme événement central

initiateur de la cascade pathologique. Dans les années 1990, l'identification de mutations dans les gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2*, responsables de formes monogéniques (Goate et al 1991, Levy-Lahad et al 1995), conduisit à cette hypothèse. Parallèlement, la mise en évidence en 1993 de l'allèle $\epsilon 4$ d'*APOE* comme facteur de risque majeur des formes multifactorielles (Corder et al 1993) a déplacé la recherche au-delà de la seule description histopathologique des dépôts A β /Tau, vers une approche génétique et mécanistique.

Épidémiologie et enjeux sociétaux

La prévalence mondiale de la démence est estimée à environ 55 millions de personnes, dont une majorité souffre de la MA (World Alzheimer Report 2023) (Figure 1). Sous l'effet du vieillissement démographique, ce chiffre devrait atteindre environ 78 millions en 2030 et 150 millions en 2050 si aucune mesure préventive ou thérapeutique efficace n'est mise en œuvre (WHO. Dementia Fact Sheet 2023)(Figure 1).

En France, environ 900 000 personnes sont actuellement touchées, avec plus de 225 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année. La prévalence augmente fortement avec l'âge : environ 2 % des personnes de plus de 65 ans sont atteintes, contre plus de 15 % après 80 ans (Inserm. Maladie d'Alzheimer 2020). Les formes à début précoce qui se déclarent avant 65 ans représentent moins de 2 % des cas (Zhu et al 2015).

La maladie impose également une charge économique et sociale majeure. Le coût mondial annuel de la démence était estimé à 1 300 milliards de dollars US en 2019, dont environ la moitié correspond à la valeur des soins informels fournis par les proches aidants (World Alzheimer Report 2019) (Figure 1). En France, le coût global est estimé à près de 20 milliards d'euros par an, dont environ 14 milliards pour l'aide informelle. Les conséquences dépassent le cadre financier : la maladie affecte profondément la qualité de vie des patients et entraîne une lourde charge physique et émotionnelle pour les aidants, qui sont majoritairement des femmes (WHO. Dementia Fact Sheet 2023, Fondation Médéric Alzheimer).

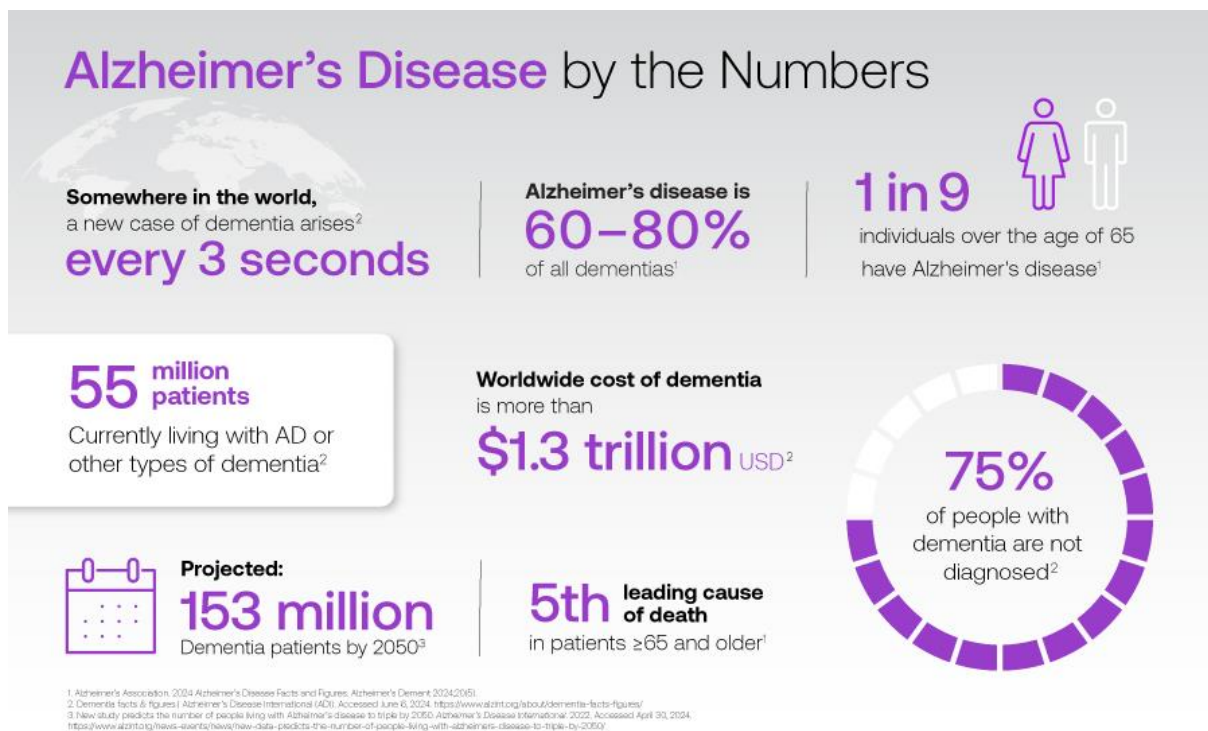


Figure 1. Données épidémiologiques clés sur la maladie d'Alzheimer. La maladie d'Alzheimer représente 60 à 80 % des démences diagnostiquées dans le monde, touchant environ 55 millions de personnes. On estime qu'un nouveau cas de démence apparaît toutes les trois secondes, et que 75 % des patients restent non diagnostiqués. Chez les personnes âgées de plus de 65 ans, 1 individu sur 9 est atteint. Le coût mondial de la démence dépasse 1,3 billion de dollars US, et la maladie constitue la cinquième cause de mortalité chez les sujets âgés. Les projections prévoient plus de 153 millions de patients d'ici 2050, illustrant l'ampleur croissante de ce problème de santé publique mondial. (Source = Alzheimer's disease: Challenges to diagnosis and the emerging treatment landscape by Arindam Ghosh, MBBS, PhD | September 2024)

Face à cette dynamique préoccupante, les efforts de santé publique se concentrent sur le diagnostic précoce, la prévention et l'accompagnement des patients et de leurs familles, tout en intensifiant la recherche de traitements efficaces. Les stratégies incluent le développement de biomarqueurs fiables, la mise en place de programmes de soutien aux aidants, et la promotion d'environnements à faible risque pour le développement de démences (Alzheimer's Society UK).

Si l'ampleur épidémiologique et sociétale de la MA souligne l'urgence d'agir, la compréhension des mécanismes physiopathologiques reste essentielle pour développer des stratégies thérapeutiques efficaces. Les avancées des dernières décennies ont permis d'identifier quatre grands marqueurs histopathologiques : l'accumulation extracellulaire d'Aβ, l'agrégation intraneuronale de Tau, la neuroinflammation et la perte synaptique. Ces éléments, interconnectés, constituent le socle sur lequel repose notre compréhension actuelle de la maladie. La section suivante en précise les caractéristiques et leurs liens.

Bases neuropathologiques

Compte tenu de la prévalence élevée de la maladie d'Alzheimer et de ses lourdes conséquences sociétales, il est crucial d'en comprendre les bases neuropathologiques. Dès la description initiale d'Aloïs Alzheimer au début du XX^{ème} siècle, deux types de lésions cérébrales caractéristiques ont été identifiés : les dépôts amyloïdes extracellulaires et les enchevêtrements neurofibrillaires intra neuronales. Au-delà de ces marqueurs histopathologiques classiques, la recherche a mis en évidence d'autres processus tout aussi essentiels dans la pathogenèse de la MA, notamment la neuroinflammation et la perte synaptique. Je détaillerai ci-après chacun de ces aspects, en soulignant à la fois les découvertes fondatrices et les avancées récentes, afin de montrer comment ils s'articulent et conduisent aux manifestations cliniques de la maladie.

Dépôts amyloïdes et peptide A β

Les plaques amyloïdes extracellulaires constituent l'une des lésions cardinales de la MA. Historiquement, il a fallu attendre le début des années 1980 pour identifier le constituant principal de ces dépôts : un petit peptide d'environ 4 kDa nommé amyloïde- β (A β). En 1984, Glenner et Wong isolent pour la première fois ce peptide à partir d'amyloïdes vasculaires chez des patients Alzheimer (Glenner et al 1984). Peu après, d'autres travaux confirment que l'A β dérive d'un précurseur membranaire ubiquitaire, l'Amyloid Precursor Protein (APP), et qu'il tend à s'agréger en fibrilles insolubles formant les plaques séniles observées au microscope (Masters et al 1985).

L'identification d'APP comme précurseur de l'A β a conduit à décrire en détail son métabolisme et ses voies de clivage. APP est une glycoprotéine transmembranaire de type I exprimée de façon ubiquitaire, notamment dans les neurones, où elle participe à l'adhésion et à la croissance neuronale (Kang et al 1987). Son clivage physiologique emprunte la voie non amyloïdogène : la protéine est d'abord coupée par l' α -sécrétase (principalement ADAM10), au sein même de la séquence A β , libérant un fragment soluble neuroprotecteur (sAPP α) et empêchant la formation d'A β (Lammich et al 1999). Le fragment membranaire restant est ensuite clivé par la γ -sécrétase, produisant le peptide p3 non pathogène. À l'inverse, dans la voie amyloïdogène, APP est d'abord clivée par la β -sécrétase (BACE1), générant le fragment sAPP β et un fragment C-terminal (C99) qui, une fois clivé par la γ -sécrétase (complexe comprenant PSEN1 ou PSEN2), libère des peptides A β de longueurs variables, dont A β 40 et

surtout A β 42, plus hydrophobe et plus apte à l'agrégation (Vassar et al 1999, de Strooper et al 1999). Un déséquilibre entre ces deux voies favorise ainsi l'accumulation d'A β et l'amorçage de la cascade amyloïde (Figure 2).

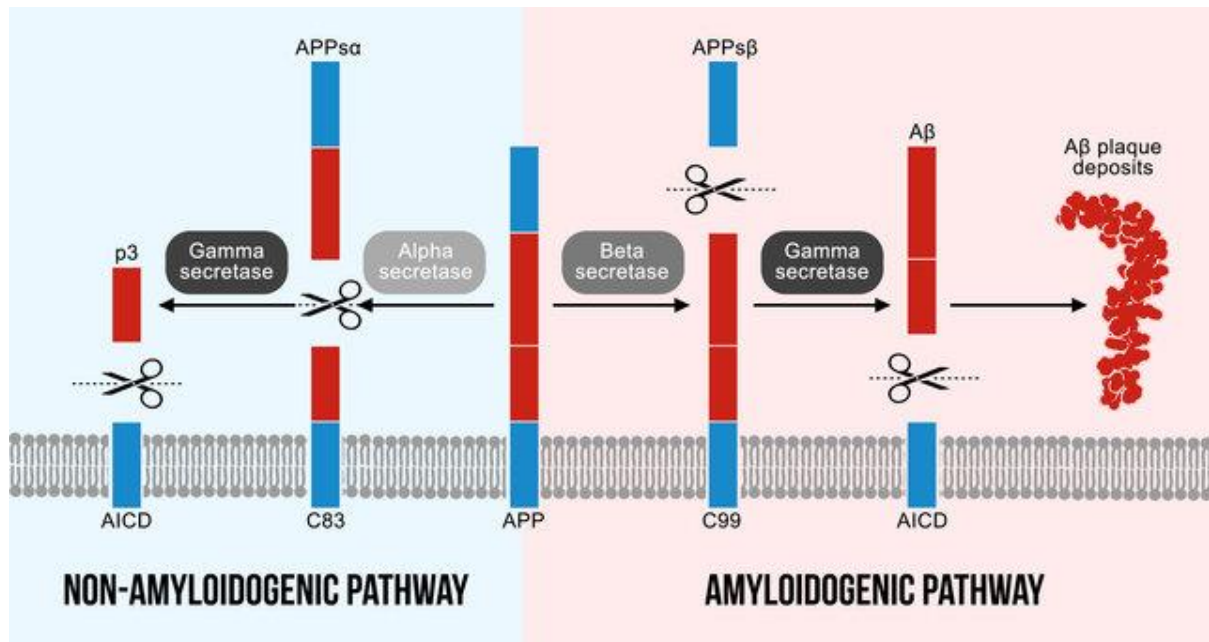


Figure 2. Voies de clivage de l'APP et formation du peptide amyloïde- β . L'APP (Amyloid Precursor Protein) peut être clivée par deux voies principales. Dans la voie non-amyloïdogène (à gauche), l'action séquentielle des α - et γ -sécrétases génère un fragment soluble sAPP α et un peptide P3, évitant la production d'A β . Dans la voie amyloïdogène (à droite), le clivage par la β -sécrétase puis la γ -sécrétase libère le peptide A β , notamment sous sa forme A β 42, plus agrégante. Ces monomères peuvent s'assembler en oligomères toxiques puis en dépôts fibrillaires formant les plaques amyloïdes. (Source = Sasmita AO. 2019)

La découverte de mutations autosomiques dominantes de l'APP (et plus tard des présénilines) chez des formes familiales précoces de MA a rapidement orienté l'attention vers l'A β comme acteur causal. Cela a conduit à la formulation de la célèbre « cascade amyloïde », hypothèse énoncée par Hardy et Higgins en 1992. Cette hypothèse postule que l'accumulation d'A β est l'événement initial déclenchant une cascade de dysfonctions aboutissant aux autres lésions (tau pathologique, inflammation, dysfonction synaptique et neurodégénérescence) (Hardy et al 1992). Pendant de nombreuses années, l'A β a ainsi été considéré comme la pierre angulaire de la pathogenèse de la MA, et cibler son accumulation est devenu un objectif thérapeutique prioritaire. Cependant, cette vision linéaire d'une maladie aussi complexe a été nuancée par la suite. En effet, la présence de dépôts amyloïdes ne corrèle pas toujours avec la sévérité des symptômes cliniques, et certains individus âgés présentent des plaques abondantes sans démence notable. De plus, des études ont suggéré que les formes solubles oligomériques

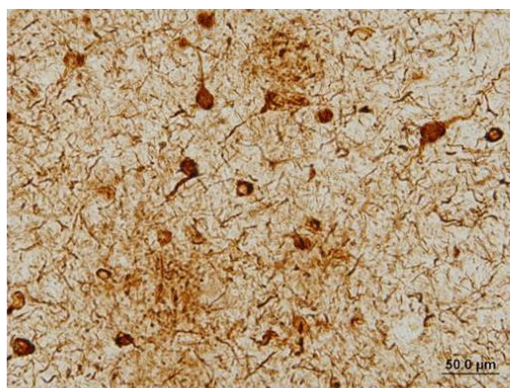
d'A β pourraient être plus neurotoxiques que les dépôts fibrillaires eux-mêmes, perturbant la communication neuronale bien avant l'apparition de plaques visibles (Shankar et al 2008). Ces considérations ont conduit à raffiner l'hypothèse amyloïde au fil du temps (Selkoe et al 2016). Néanmoins, le paradigme amyloïde a récemment gagné un soutien empirique important avec les premiers succès cliniques d'immunothérapies anti-A β . Par exemple, l'anticorps monoclonal « lecanemab », en ciblant les protofibrilles solubles d'A β , a montré une réduction modeste du déclin cognitif chez des patients en phase précoce de MA. Ces résultats cliniques, publiés en 2023, suggèrent que l'épuration de la charge amyloïde peut apporter un bénéfice, confirmant a minima le rôle délétère de l'A β dans la maladie *in vivo* (van Dyck et al 2023). Pour autant, le débat est loin d'être clos : certains considèrent que l'hypothèse amyloïde reste un modèle incomplet et « non suffisant » pour expliquer à lui seul toute la complexité de la MA et qu'il faut l'envisager désormais comme un élément d'un processus pathologique multifactoriel plutôt que comme une cause unique (Behl et al 2024).

En somme, les dépôts amyloïdes et le peptide A β occupent une place centrale dans la neuropathologie de la MA, tant par leur importance historique que comme cibles actuelles de thérapies, mais ils s'inscrivent dans un contexte pathogénique plus large impliquant d'autres mécanismes.

Protéine Tau et dégénérescences neurofibrillaires

En parallèle des dépôts amyloïdes extracellulaires, la MA se caractérise par des lésions intraneuronales tout aussi importantes : les enchevêtrements neurofibrillaires. Celles-ci correspondent à l'accumulation anormale, de filaments appariés en hélice constitués principalement de la protéine Tau sous forme hyperphosphorylée (Brion et al 1986). Tau est une protéine normalement associée aux microtubules, jouant un rôle dans le soutien du cytosquelette neuronal (Weingarten et al 1975). Dans la MA, Tau subit des modifications post-traductionnelles notamment une phosphorylation excessive qui altèrent sa fonction et la font s'agréger en filaments insolubles (Figure 3, A). Historiquement, il a fallu là aussi des avancées majeures pour élucider la composition de ces filaments : en 1986, l'équipe de Brion démontre que la protéine Tau constitue le composant principal des enchevêtrements neurofibrillaires d'Alzheimer (Brion et al 1986).

A



B

Tau Propagation

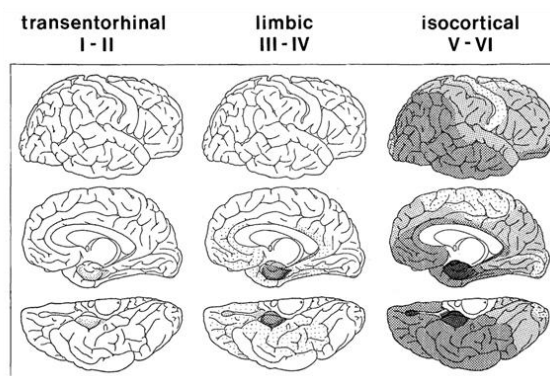


Figure 3. Protéine Tau : lésion pathologique et progression anatomique dans la maladie d'Alzheimer. (A) Immunohistochimie montrant des dégénérescences neurofibrillaires (filaments appariés en hélice de Tau hyperphosphorylée) dans des neurones corticaux d'un patient atteint de MA. (B) Progression topographique des lésions Tau selon les stades de Braak, débutant dans les régions entorhinales (stades I-II), s'étendant aux régions limbiques (III-IV) puis aux aires néocorticales associatives et primaires (V-VI) (Braak et al 1991, Buchholz et al 2024, Goedert et al 2010). Sources image centrale : <https://neurosciencenews.com/alzheimers-ftd-isd1-7689/>

Cette découverte fondatrice a établi un second pilier de la neuropathologie de la MA, distinct de la voie amyloïdogénique. Sur le plan topographique, les enchevêtrements neurofibrillaires présentent une progression spatio-temporelle stéréotypée dans le cerveau des patients. Des études histopathologiques systématiques, notamment par Braak en 1991, ont permis de définir des stades de la MA basés sur l'étendue de la pathologie Tau (Braak et al 1991, Gertz et al 1996). Selon cette classification, les lésions Tau débutent dans les régions entorhinales et hippocampiques (stades I-II), puis s'étendent aux aires associatives limbiques (stades III-IV) et enfin aux néocorticales associatives et primaires (stades V-VI) (Braak et al 1991)(Figure 3, B). Cette progression corrèle assez bien avec l'aggravation des symptômes cliniques, suggérant un rôle clé de Tau dans l'évolution de la neurodégénérescence. En effet, la charge en enchevêtrements neurofibrillaires est mieux corrélée à la sévérité de la démence que la charge amyloïde, ce qui indique que Tau en configuration pathologique contribue étroitement au dysfonctionnement neuronal (Arriagada et al 1992). Les mécanismes par lesquels les formes pathologiques de Tau conduisent à la dégénérescence neuronale font l'objet d'intenses recherches. Une hypothèse actuelle propose que les agrégats de Tau se propagent de neurone en neurone par diffusion trans-synaptique, et qu'au cours de ce transfert, les formes mal conformées de Tau induisent la conversion pathologique de Tau normale selon un mécanisme dit « prion-like » (de Calignon et al 2012). Des modèles expérimentaux récents ont reproduit cette diffusion de la pathologie Tau et renforcent l'idée d'une séquentialité dans l'atteinte des régions cérébrales. Par exemple, des injections de Tau pathologique dans le

cerveau de modèles murins induisent l'apparition de fibrilles dans des régions connectées, imitant la progression observée chez l'humain (Clavaguera et al 2009). De nombreuses études travaillent sur les différents modèles de propagation de Tau actuellement disponibles, dans le but de mieux cibler cet aspect pour de futurs traitements modificateurs de la maladie (Basheer et al 2024). Ces avancées ouvrent la voie à des approches thérapeutiques anti-Tau (anticorps monoclonaux, anti-agrégants et oligonucléotides antisens), même si, à ce jour, aucune n'a encore démontré un bénéfice clinique concluant.

Au-delà de la MA, des agrégats pathologiques de Tau sont également impliqués dans un ensemble de maladies neurodégénératives regroupées sous le terme de tauopathies. Celles-ci partagent un mécanisme central : l'accumulation anormale de Tau dans les neurones ou les cellules gliales, conduisant à la désorganisation du cytosquelette et à la dégénérescence cellulaire. Ces maladies se distinguent toutefois par leur topographie cérébrale, leur signature histopathologique et la nature des inclusions observées. Parmi les tauopathies les plus étudiées figurent la paralysie supranucléaire progressive (PSP) et la dégénérescence cortico-basale (CBD), caractérisées par des dépôts de Tau dans les neurones et les astrocytes des noyaux gris centraux et du tronc cérébral, responsables de troubles moteurs et cognitifs progressifs (Kovacs et al 2020, Kouri et al 2011). D'autres formes, comme certaines démences fronto-temporales (FTLD-Tau), se manifestent principalement par une atrophie des lobes frontaux et temporaux, entraînant des altérations du comportement, du langage ou de la mémoire (Dickson et al 2011). Enfin, la maladie de Pick se distingue par la présence d'inclusions neuronales arrondies, appelées « corps de Pick », typiquement observées dans les régions frontales et temporales (Dickson 1998, Goedert et al 2017). Contrairement à la MA, qui constitue une tauopathie secondaire caractérisée par la coexistence des lésions Tau et des plaques amyloïdes, les autres tauopathies dites primaires présentent une accumulation pathologique de Tau isolée, sans composante amyloïde associée.

En résumé, la pathologie Tau constitue le second grand marqueur neuropathologique de la MA. Identifiée comme composant des enchevêtrements neurofibrillaires depuis les années 1980, elle est aujourd'hui reconnue comme un déterminant majeur de la neurodégénérescence. Son évolution dans le cerveau suit un schéma reproductible en stades, intimement lié à l'évolution clinique, et des données récentes suggèrent qu'elle pourrait se propager activement entre neurones. Tau offre ainsi un lien entre les lésions histologiques initiales et la perte progressive des fonctions neuronales observée dans la maladie.

Neuroinflammation

Les lésions de la MA ne se limitent pas aux agrégats protéiques amyloïdes et Tau. Elles s'accompagnent d'une réponse neuroinflammatoire chronique au sein du tissu cérébral. Dès les années 1990, des études post-mortem ont montré que les plaques amyloïdes sont entourées de cellules gliales activées, principalement des microglies, la cellule immunitaire résidente du cerveau, ainsi que des astrocytes réactifs (Itagaki et al 1989). Ces cellules, en détectant les dépôts d'A β et les neurones en souffrance, initient une cascade inflammatoire locale. On observe ainsi dans les cerveaux Alzheimer une surproduction de cytokines pro-inflammatoires, de composés du système du complément et d'autres médiateurs immunitaires, créant un micro-environnement d'inflammation persistante autour des lésions (Itagaki et al 1989). Bien que plus modérée qu'une inflammation systémique classique, cette neuroinflammation est soutenue dans le temps et peut exercer des effets délétères additionnels sur le tissu nerveux : stress oxydatif, atteinte membranaire, libération de neurotoxines par les microglies, etc. Par un phénomène de dégâts collatéraux, l'inflammation chronique aggraverait ainsi les processus neurodégénératifs qu'elle cherche initialement à contenir (Itagaki et al 1989). Un tournant important a été franchi lorsque des études épidémiologiques ont suggéré qu'un usage prolongé d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) était associé à une réduction du risque de développer la MA. Ce constat, fait dans les années 1990, a mis en lumière l'implication potentielle de l'inflammation dans la pathogenèse et a encouragé les recherches dans cette direction (in 't Veld et al 1998). De fait, en 2000, Akiyama et un groupe international de chercheurs publient une revue de référence consolidant les preuves que la réaction inflammatoire fait partie intégrante des lésions d'Alzheimer et contribue vraisemblablement à la progression de la maladie (Akiyama et al 2000). Plus récemment, l'accent a été mis sur le rôle modulateur de la neuroinflammation : celle-ci peut avoir des facettes bénéfiques (déblaiement des débris amyloïdes par la microglie, contention des lésions) autant que délétères (sécrétion de cytokines toxiques, phagocytose aberrante de synapses saines, etc.). Les microglies, en particulier, jouent un rôle double. D'un côté, elles phagocytent les dépôts d'A β et peuvent restreindre la croissance des plaques; mais de l'autre, une activation microgliale excessive peut entraîner la libération de médiateurs inflammatoires nocifs et le remodelage synaptique inapproprié (Zhao et al 2017, Hong et al 2016). De même, les astrocytes au voisinage des plaques modulent leur activité : ils prolifèrent, libèrent des molécules inflammatoires et réduisent certaines de leurs fonctions de soutien neuronal comme la recapture du glutamate, contribuant ainsi au déséquilibre du microenvironnement neuronal (Frost & Li 2017, Kuchibhotla et al 2009). L'interaction entre microglies et astrocytes est essentielle dans l'initiation et la progression de la MA. En effet, l'activation des microglies induite par l'A β peut entraîner les astrocytes avoisinants dans un état neurotoxique, formant

un cercle vicieux inflammatoire (Liddelow et al 2017). Aussi, ces dernières années, des avancées majeures ont été réalisées avec l'identification de sous-types de microglies spécifiques à la MA (Keren et al 2017), ou la découverte de gènes de risque de MA exprimés dans la microglie par exemple *TREM2*, dont certains variants altèrent la capacité des microglies à gérer les dépôts amyloïdes. Ces découvertes génétiques ont profondément modifié la perception du rôle de la microglie : elles indiquent que la réponse immunitaire innée cérébrale, loin d'être un simple épiphénomène, constitue un acteur central et vraisemblablement causal de la pathogenèse de la MA (Guerreiro et al 2013, Wang et al 2015).

Ainsi, la neuroinflammation est désormais reconnue comme un troisième volet des bases neuropathologiques de la MA. Initialement considérée comme une conséquence des lésions amyloïdes et Tau, elle est aussi vue comme un modulateur pouvant accélérer la dégénérescence. Les microglies et astrocytes, acteurs clés de cette réponse, entretiennent un dialogue complexe qui peut autant tenter de protéger le cerveau que, paradoxalement, participer à sa destruction progressive. Mieux comprendre ces mécanismes d'inflammation chronique ouvre des perspectives nouvelles pour des approches thérapeutiques immunomodulatrices dans la MA.

Perte synaptique et dysfonction neuronale

Enfin, un consensus émerge pour considérer que l'atteinte synaptique représente l'élément central de la cascade neuropathologique de la maladie d'Alzheimer. Les synapses sont le support biologique immédiat des activités cérébrales telles que la formation des souvenirs et les fonctions cognitives. Or, dans la MA, on observe une perte massive de synapses dans les régions corticales associatives et hippocampiques cruciales pour la mémoire. Cette atteinte synaptique, qui apparaît dès les stades précoces de la maladie, est si prononcée et si étroitement corrélée aux déficits cognitifs qu'elle est aujourd'hui considérée comme le meilleur substrat anatomique expliquant la démence dans la MA. (Terry et al 1991, Selkoe et al 2002). Dès 1991, une étude pionnière de Robert Terry a montré que le nombre de synapses dans le cortex cérébral des patients Alzheimer était significativement réduit par rapport aux sujets sains, et que cette réduction corrélait fortement avec l'altération des scores cognitifs (Terry et al 1991). En d'autres termes, plus que la densité de plaques amyloïdes ou même de dégénérescences neurofibrillaires, c'est l'ampleur de la désorganisation synaptique qui prédit le niveau de démence (Terry et al 1991). Cette observation, depuis confirmée par de nombreuses études, a orienté la vision de la pathogenèse vers une maladie avant tout « synaptopathique ».

La perte synaptique dans la MA résulte de la convergence des mécanismes pathologiques précédemment décrits. Les oligomères d'Aβ solubles diffusent dans le parenchyme et perturbent la transmission synaptique : ils peuvent se lier à des récepteurs synaptiques par exemple les récepteurs NMDA et induire un dysfonctionnement du potentiel d'action ou un déséquilibre calcique, menant à une souffrance de l'élément postsynaptique (Zhang H et al 2022). En parallèle, la protéine Tau pathologique s'accumule dans les neurones et les dendrites, altérant le transport axonal et la stabilité des microtubules, ce qui finit par compromettre la viabilité des terminaisons synaptiques. Tau anormal peut également se disséminer le long des projections neuronales et contribuer à la propagation de la dysfonction synaptique de proche en proche (Hoover et al 2010). Par ailleurs, l'activation microgliale chronique joue un rôle non négligeable : les microglies, en état réactif, libèrent des espèces réactives de l'oxygène et des cytokines qui stressent les synapses, et elles peuvent même phagocyter des synapses sous l'influence de signaux moléculaires émis par des synapses endommagées (Wang et al 2015). Les astrocytes réactifs, de leur côté, peuvent relâcher du glutamate en excès ou ne plus recycler efficacement ce neurotransmetteur, induisant une excitotoxicité délétère pour les synapses (Talanta et al 2013). L'ensemble de ces processus aboutit progressivement à la destruction des épines dendritiques et des boutons axoniques, c'est-à-dire la perte physique des synapses.

Il est important de noter que cette dégénérescence synaptique apparaît très précocement au cours de la MA. Des études sur des stades précliniques révèlent déjà des altérations fonctionnelles synaptiques subtiles. De plus, des biomarqueurs récents mesurant des protéines synaptiques dans le liquide cébrospinal (neurogranine, synaptotagmine-1, SNAP-25) montrent des niveaux anormaux dès les phases de déficit cognitif léger, témoignant d'un remodelage synaptique en cours (Kester et al 2015). Fait intéressant, dans les phases initiales, on observe parfois une augmentation transitoire de certains marqueurs synaptiques, interprétée comme une réaction compensatoire où les synapses intactes renforcent leur efficacité pour compenser celles perdues (Masliah et al 1991). Néanmoins, cette plasticité adaptative ne suffit pas à enrayer le processus : avec la progression de la pathologie, la destruction synaptique l'emporte et s'accélère, menant inexorablement aux troubles cognitifs sévères. En phase terminale de la maladie, le cortex cérébral peut avoir perdu jusqu'à 30–40% de ses synapses dans les zones les plus affectées, expliquant la désorganisation complète des réseaux neuronaux.

La communauté scientifique s'accorde désormais pour considérer la perte synaptique comme un indicateur anatomique clé de la MA. Une synthèse parue en 2025 souligne que la préservation des synapses est cruciale pour le maintien des fonctions cognitives, et avance

que les synapses pourraient constituer l'une des cibles les plus précoces et les plus significatives du processus pathologique d'Alzheimer (Taddei et al 2025). Selon cette perspective, la synaptopathie n'est pas simplement une conséquence finale passivement subie, mais un événement central qui intègre et reflète les effets toxiques des pathologies amyloïde et Tau ainsi que des processus inflammatoires. Notre équipe de recherche adhère pleinement à cette vision et postule que les altérations synaptiques occupent une place pivot dans la cascade pathogénique. En particulier, nous formulons l'hypothèse que la perte de synapses, en perturbant les circuits neuronaux, est le chaînon manquant expliquant le passage des lésions moléculaires aux symptômes cliniques observés (Dourlen et al 2019). Elle est d'ailleurs cohérente avec l'orientation actuelle de nombreux travaux internationaux cherchant à mieux caractériser les synapses vulnérables vs résilientes dans la MA et à développer des biomarqueurs synaptiques pour le diagnostic précoce et le suivi de la maladie (Taddei et al 2025).

En synthèse, la perte synaptique apparaît comme la conséquence commune et convergente des processus amyloïde, Tau et inflammatoire. C'est elle qui entraîne la défaillance progressive des réseaux neuronaux et, par voie de conséquence, le déclin cognitif. Le fait qu'elle soit hautement corrélée aux troubles cognitifs et qu'elle précède la mort neuronale en fait une cible de choix pour la compréhension et l'intervention thérapeutique. Placer la synapse au centre du modèle pathogénique permet ainsi d'intégrer les différentes facettes neuropathologiques de la MA dans un schéma unifié allant de la molécule aux symptômes. L'hypothèse de la « cascade amyloïde » a servi de fil conducteur initial pour relier ces événements, mais les découvertes ultérieures notamment sur le rôle de l'inflammation et la primauté de la perte synaptique suggèrent plutôt un modèle multifactoriel où chaque composante s'alimente mutuellement. La figure qui se dégage est celle d'une maladie où les dépôts protéiques déclenchent et entretiennent une toxicité neuronale progressive, amplifiée par la réponse gliale, qui finit par compromettre les connexions synaptiques nécessaires aux fonctions cognitives.

Cette vision intégrée des bases neuropathologiques permet de mieux comprendre comment la MA provoque, au fil des années, les symptômes cliniques qui la définissent. En effet, c'est l'atteinte combinée de vastes réseaux de neurones via la perte de leurs synapses qui se traduit cliniquement par les troubles mnésiques et cognitifs. C'est ce passage du substrat neuropathologique aux signes cliniques qui sera abordé dans la section suivante. En reliant ainsi lésions du cerveau et manifestations du patient, on mesure à quel point l'identification de ces bases neuropathologiques a été et demeure primordiale pour guider la recherche de traitements visant à ralentir ou arrêter le cours de la maladie.

Les signes cliniques

La compréhension des mécanismes neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer, décrits précédemment, n'a de sens que si elle permet d'éclairer les symptômes observés chez les patients. Car c'est bien l'expression clinique : les pertes de mémoire, les troubles du langage ou les difficultés à accomplir des gestes du quotidien qui, au-delà des lésions cérébrales invisibles, confrontent le malade et son entourage à la réalité de la maladie. Les signes cliniques de la MA sont l'aboutissement d'une cascade d'événements biologiques complexes. Ils reflètent la désorganisation progressive des circuits neuronaux et la perte de connectivité synaptique dans des régions cérébrales clés du traitement cognitif.

Le tableau clinique s'installe généralement de manière insidieuse, par de subtils troubles de la mémoire épisodique, qui constituent souvent le premier motif de consultation. Ces difficultés concernent la capacité à encoder et restituer des informations nouvelles, signe d'un dysfonctionnement de l'hippocampe, première région touchée par la pathologie tau (Braak et al 1991). À mesure que la neurodégénérescence s'étend à d'autres réseaux corticaux, d'autres fonctions cognitives sont atteintes : l'orientation spatio-temporelle, le langage (anomie, appauvrissement du discours), les fonctions exécutives (planification, raisonnement) ou encore les capacités visuospatiales (Dubois et al 2007) (Figure 4). Ces altérations, hétérogènes selon les individus et les formes cliniques, traduisent l'extension anatomique des lésions neurofibrillaires et de la perte synaptique à des régions corticales de plus en plus larges (Terry et al 1991).

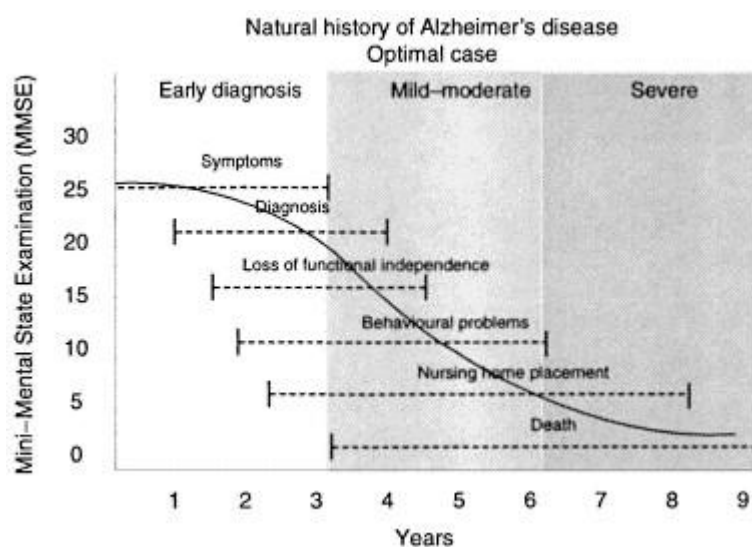


Figure 4. Évolution naturelle de la maladie d'Alzheimer dans le scénario diagnostique optimal. Courbe illustrant la progression moyenne du score au Mini-Mental State Examination (MMSE) en fonction du temps (en années) depuis l'apparition des symptômes. Les différentes étapes cliniques sont représentées : apparition des symptômes, diagnostic, perte d'autonomie fonctionnelle, apparition de troubles comportementaux, placement en institution et décès. La figure distingue les stades précoce, léger à modéré et sévère de la maladie, mettant en évidence la décroissance progressive des capacités cognitives et fonctionnelles. Adapté de Feldman et Gracon, 1996 (Brodaty et al 1999).

Les formes typiques de la MA suivent une évolution progressive, passant d'un trouble cognitif léger (MCI, Mild Cognitive Impairment) à un stade de démence caractérisée, avec perte d'autonomie dans les activités de la vie quotidienne (Figure 4). Mais il existe également des formes atypiques, dans lesquelles les troubles initiaux ne sont pas mnésiques, mais langagiers (aphasie progressive primaire), visuels (syndrome de Benson), ou exécutifs, en lien avec des atteintes topographiques différentes (Gorno-Tempini et al 2011, Crutch et al 2012, Ossenkoppele et al 2015). Cependant, dans tous les cas, les symptômes cliniques sont soutenus par les mécanismes neuropathologiques présentés précédemment : l'accumulation de peptides A β , la pathologie Tau, la réponse neuroinflammatoire, et surtout, la perte de synapses, qui désorganise les réseaux neuronaux et compromet la transmission de l'information (Selkoe et al 2002).

Ainsi, les signes cliniques de la MA sont l'expression fonctionnelle d'un cerveau progressivement déconnecté de lui-même. Comprendre comment les lésions moléculaires affectent les fonctions cognitives permet de mieux interpréter les symptômes, de la détecter plus précocement, et d'orienter les interventions thérapeutiques futures.

Diagnostic et thérapies

Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer (MA) repose avant tout sur l'évaluation clinique et neuropsychologique, complétée dans les centres mémoire par des examens biologiques et d'imagerie. Parmi ceux-ci, l'analyse du liquide céphalorachidien (LCR) permet de doser les peptides amyloïde- β (A β 42/40) et les protéines Tau totale et phosphorylée, ces biomarqueurs reflétant *in vivo* les lésions caractéristiques de la maladie. Ces biomarqueurs constituent la base du modèle «AT(N)» (A = amyloïde, T = tau, N = neurodégénérescence), aujourd'hui largement admis dans la recherche comme définition biologique de la MA (Jack et al 2024).

En routine clinique, le dosage LCR des marqueurs A β 42/40 et Tau est de plus en plus utilisé dans les unités spécialisées pour renforcer la fiabilité du diagnostic et favoriser une détection précoce, avec des sensibilités et spécificités de l'ordre de 85-90 % dans certaines études (Gaeta et al 2024).

En revanche, l'imagerie notamment la tomographie par émission de positons (TEP) des plaques amyloïdes ou de Tau, ainsi que l'IRM dédiée à l'atrophie hippocampique reste réservée aux indications spécifiques, aux centres d'expertise ou à des protocoles de recherche. En effet, l'accès, le coût, la disponibilité et la nécessité de confirmer la biologie rendent son usage encore limité en pratique de première ligne. Par ailleurs, les biomarqueurs sanguins (p-tau, Aβ42/40 plasmatique) montrent aujourd'hui une performance prometteuse mais sont encore en phase d'implémentation clinique et principalement employés dans des contextes de recherche ou de sélection pour essais thérapeutiques.

L'apport de ces biomarqueurs est donc crucial car ils permettent un diagnostic de plus en plus précoce. Cette identification précoce des lésions amyloïdes et Tau est d'autant plus importante que de nouvelles thérapies ciblées de la maladie émergent, avec l'espoir qu'une intervention au tout début du processus neurodégénératif puisse en modifier l'évolution.

Sur le plan thérapeutique, les options approuvées à ce jour restent d'une efficacité limitée et essentiellement symptomatique. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (I-AChE : donepezil, rivastigmine, galantamine) constituent le traitement symptomatique de référence des formes légères à modérées de la maladie d'Alzheimer, tandis que la mémantine, antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA, est indiquée principalement aux stades modérés à sévères, seule ou en association avec un I-AChE (Birks & Harvey 2018, McShane et al 2018). Ces traitements procurent un bénéfice cognitif et fonctionnel modeste, améliorant temporairement les performances ou la qualité de vie, mais sans effet démontré sur la progression de la neurodégénérescence ni sur la survie (Kim et al 2024, Waite 2024).

Récemment, un changement de paradigme thérapeutique est apparu avec l'arrivée d'immunothérapies ciblant directement les dépôts amyloïdes. Parmi les anticorps anti-Aβ, aducanumab a été autorisé aux États-Unis le 7 juin 2021 via une procédure d'approbation accélérée par l'agence américaine (FDA). En Europe, il n'a pas obtenu d'autorisation, la demande ayant été retirée après un avis défavorable des autorités, et son développement et commercialisation ont été arrêtés en 2024 (FDA Aducanumab Informations). Un autre anticorps anti-Aβ appelé Lecanemab a reçu une autorisation aux États-Unis en janvier 2023, confirmée par une approbation en juillet 2023 à la lumière de données d'efficacité. En Union européenne, une autorisation de mise sur le marché a été accordée le 15 avril 2025 ; sa disponibilité dépend ensuite des décisions pays par pays. En France, la demande d'accès précoce a été refusée par la Haute Autorité de Santé en septembre 2025 (FDA Converts Novel Alzheimer's Disease Treatment to Traditional Approval).

Administrés chez des patients à un stade précoce, ils ont montré pour la première fois un ralentissement modeste du déclin cognitif en clinique, se traduisant par un gain thérapeutique

modeste mais mesurable sur l'évolution à 18 mois (van Dyck et al 2023). Ce bénéfice, bien que significatif statistiquement, reste cliniquement limité : ces traitements ne font que ralentir la progression sans la stopper, et n'entraînent pas de récupération des fonctions perdues. De plus, leur utilisation s'accompagne de contraintes importantes et d'effets indésirables notables, notamment la survenue d'anomalies radiologiques liées à l'amyloïde (ARIA), correspondant à des œdèmes vasogéniques (ARIA-E) ou à des microhémorragies corticales (ARIA-H) observées à l'IRM de suivi. Ces événements, généralement réversibles, nécessitent une surveillance par imagerie cérébrale régulière au cours du traitement (van Dyck et al 2023, Cummings et al 2023)

Par ailleurs, d'autres anticorps anti-amyloïdes tels que le donanemab ont également montré une réduction des plaques et un effet similaire de ralentissement du déclin, et sont en cours d'approbation ou d'évaluation clinique avancée (Kong et al 2025). L'ensemble de ces approches immunitaires, bien qu'encourageantes, soulignent aussi la complexité de la pathologie : la seule élimination des plaques amyloïdes ne suffit probablement pas à arrêter le processus, d'où l'importance d'explorer des thérapies complémentaires. En effet, de nombreuses stratégies en développement ciblent d'autres mécanismes pathogéniques de la maladie d'Alzheimer. Des immunothérapies anti-Tau sont actuellement à l'essai, bien qu'aucune n'ait encore démontré d'efficacité clinique suffisante pour une approbation (Cummings et al 2025). De même, des voies anti-inflammatoires sont explorées afin de moduler la neuroinflammation chronique observée dans la maladie : par exemple, l'activation du récepteur microglial TREM2 par un anticorps (molécule AL002) vise à stimuler la clairance des dépôts toxiques et fait l'objet d'un essai de phase II en cours (Zhang J et al 2022). D'autres approches cherchent à protéger ou restaurer la fonction synaptique, compte tenu de la corrélation étroite entre la perte de synapses et le déclin cognitif dans l'AD. C'est le cas des stratégies utilisant des facteurs neurotrophiques ou visant à rééquilibrer la plasticité synaptique, qui tentent de favoriser la régénérescence neuronale/synaptique plutôt que de simplement lutter contre les lésions existantes (Kazim et al 2016). L'ensemble de ces pistes thérapeutiques innovantes reflète une vision plus globale de la maladie, en ciblant les agrégats protéiques (A β , Tau) mais aussi les dommages connexes (inflammation, dysfonction synaptique, stress oxydatif, etc.), avec l'objectif ultime de modifier le cours de la maladie.

Malgré ces avancées, il convient de garder une perspective réaliste. Aucune des thérapies disponibles ne constitue encore un remède, et l'efficacité globale demeure modeste – qu'il s'agisse des traitements symptomatiques qui n'offrent qu'un répit temporaire, ou des nouvelles immunothérapies dont l'effet ralentisseur sur le déclin cognitif reste partiel. Les échecs répétés de nombreux essais cliniques au cours des dernières décennies s'expliquent en partie par des obstacles méthodologiques majeurs : la complexité d'identifier les patients à un stade très

précoce approprié pour des interventions potentiellement modificatrices, la lenteur d'évolution de la maladie nécessitant des études longues et coûteuses, et le choix de critères d'évaluation sensibles aux changements subtils (Kim et al 2024). S'ajoutent à cela les risques d'effets secondaires et les enjeux d'accessibilité et de coût des nouveaux médicaments, qui posent la question du rapport bénéfice/risque et de la sélection des patients candidats. Néanmoins, l'approbation récente de thérapies ciblant les mécanismes fondamentaux d'Alzheimer a ravivé l'espoir dans la communauté scientifique et médicale. Ces traitements *dits* « modificateurs de maladie », bien que perfectibles, prouvent la faisabilité d'intervenir sur le processus pathologique lui-même plutôt que sur ses seules manifestations cliniques. À l'avenir, l'optimisation de ces approches et le développement de nouvelles cibles pourraient aboutir à des progrès tangibles en termes de ralentissement, voire de prévention de la maladie. En combinant un diagnostic biologique de plus en plus précis et précoce aux stratégies thérapeutiques tant symptomatiques que ciblées, on entrevoit ainsi la possibilité d'améliorer le pronostic et la qualité de vie des patients atteints de la maladie d'Alzheimer dans les prochaines années.

Ce bilan des outils diagnostiques et des options thérapeutiques introduit la suite de l'introduction, consacrée à l'origine de la maladie : d'abord les formes monogéniques liées à des mutations d'APP, PSEN1 et PSEN2, puis les formes multifactorielles, où interagissent facteurs de susceptibilité génétique et déterminants environnementaux.

Les différentes formes de la Maladie d'Alzheimer

La forme monogénique de la maladie : l'impact des mutations *APP*, *PSEN1* et *PSEN2*

Certaines formes de la MA sont monogéniques autosomiques dominantes et généralement à début précoce. Ces formes monogéniques, bien que rares (<1%), ont joué un rôle crucial dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MA. En effet, les mutations identifiées dans trois gènes. *APP*, *PSEN1* et *PSEN2* (Figure 5) convergent toutes vers un processus commun : la production et l'agrégation du peptide A β .

Mutations du gène APP

Le gène *APP* (Amyloid Precursor Protein) sur le chromosome 21 fut le premier à être associé à des formes monogéniques de MA. Dès 1991, deux équipes identifèrent indépendamment

des mutations dominantes dans APP chez des familles présentant une MA précoce. La première correspond à une substitution Val→Ile en position 717 (exon 17 de l'APP) dans une famille britannique (Goate et al 1991). La seconde, décrite quelques mois plus tard affecte le même codon 717 (Val→Gly) dans une famille française (Chartier-Harlin et al 1991). Ces mutations pionnières, situées dans la région C-terminale de la protéine APP, soulignaient déjà l'importance du clivage protéolytique de l'APP dans la pathogenèse de la MA. En effet, le codon 717 se trouve à proximité du site de clivage γ -secrétase de l'APP, et ces substitutions ont été plus tard liées à une augmentation de la production du peptide A β 42 par rapport à A β 40, la forme A β 42 étant plus encline à l'agrégation amyloïde (Selkoe et al 2016). Dans les années suivant cette avancée, de nombreuses autres mutations d'APP ont été rapportées, généralement localisées aux abords des sites de clivage de l'APP par les secrétases. L'une des plus célèbres est la mutation dite « suédoise » (KM670/671NL), identifiée en 1992 chez deux grandes familles suédoises apparentées (Mullan et al 1992). Il s'agit d'une double mutation juste en amont du site de clivage par la β -secrétase, entraînant une augmentation de la protéolyse initiale de l'APP et une surproduction *in vivo* des peptides A β 40 et A β 42. D'autres mutations dans APP illustrent différents mécanismes conduisant à l'amyloïdogénèse : par exemple, la mutation « London » (V717I) amplifie spécifiquement la proportion d'A β 42 formée par la γ -secrétase, tandis que la mutation « arctique » (E693G) favorise l'agrégation d'A β en protofibrilles soluble, menant à une angiopathie amyloïde cérébrale marquée (Selkoe et al 2016). Sur le plan clinique, les porteurs de mutations APP développent typiquement une démence de type Alzheimer à un âge relativement jeune (souvent entre 40 et 60 ans, selon la mutation) et de façon hautement pénétrante. Outre les mutations ponctuelles, des réarrangements génomiques impliquant APP ont également été découverts dans des formes monogéniques de la MA. En 2006, une équipe a montré que la duplication en tandem du locus APP (entraînant une copie excédentaire du gène) cause une MA autosomique dominante associée à une angiopathie amyloïde cérébrale chez plusieurs familles françaises (Rovelet-Lecrux et al 2006). Ce phénomène génétique vient corroborer l'observation du syndrome de Down (trisomie 21) : chez ces patients porteurs d'une copie supplémentaire d'APP, on constate invariablement l'apparition précoce de dépôts amyloïdes cérébraux dès la quarantaine, suivi d'une pathologie Alzheimer typique un peu plus tard (Maure-Blesa et al 2025).

Mutations du gène *PSEN1*

Malgré l'implication du gène APP, il est apparu rapidement que toutes les familles de MA précoce n'étaient pas expliquées par des mutations dans ce locus. Des études de liaison

généétique dans les années 1990 révélèrent ainsi un second locus majeur, sur le chromosome 14, associé à des formes monogéniques particulièrement précoces et agressives. L'identification de ce gène aboutit à la découverte de *PSEN1* (Presenilin 1), codant une protéine de 467 acides aminés comportant huit domaines transmembranaires (Schellenberg et al 1992). En 1995, une équipe clone *PSEN1* et mit en évidence cinq mutations ponctuelles associées avec la maladie dans des familles indépendantes (Sherrington et al 1995). Par la suite, de très nombreux variants pathogènes de *PSEN1* ont été identifiés : à ce jour, plus de 300 mutations différentes de *PSEN1* (principalement des mutations faux-sens) ont été décrites dans le monde. Ces mutations se répartissent tout au long du gène, avec toutefois une prédominance dans les régions codant les domaines transmembranaires de la préséniline 1 régions critiques pour la fonction de la protéine. Sur le plan fonctionnel, les présénilines se sont révélées être le site catalytique de la γ -secrétase, l'enzyme responsable du clivage final de l'APP aboutissant aux peptides A β (Selkoe et al 2016)(Figure 2). Les mutations *PSEN1* induisent presque toutes une altération du clivage de l'APP favorisant la formation d'A β 42 ou une accumulation globale de peptides A β (Scheuner et al 1996). Du point de vue clinique, les formes d'origine *PSEN1* sont généralement caractérisées par un âge de début très précoce (souvent entre 30 et 50 ans). De manière globale, les mutations *PSEN1* confèrent une pénétrance quasiment complète (la plupart des sujets porteurs développent des symptômes avant 65 ans en l'absence de décès intermédiaire) et une évolution souvent plus rapide et sévère que dans les formes multifactorielles.

Mutations du gène *PSEN2*

Quasiment en parallèle de *PSEN1*, un troisième gène responsable de MA monogénique a été identifié en 1995 sur le chromosome 1. Ce gène, dénommé *PSEN2* (Presenilin 2), présente une forte homologie de séquence avec *PSEN1* (environ 60% d'identité) et code une protéine très similaire de 448 acides aminés. Levy-Lahad *et al.* furent les premiers à signaler une mutation dans *PSEN2* chez des membres de familles américaines atteints de MA précoce (Levy-Lahad et al 1995). Comme pour *PSEN1*, les mutations pathogènes de *PSEN2* identifiées par la suite sont principalement des mutations faux-sens dispersées le long du gène. Toutefois, beaucoup moins de mutations *PSEN2* ont été rapportées : seulement quelques dizaines de variants probablement pathogènes à ce jour, ce qui fait de *PSEN2* la cause la plus rare des formes monogéniques de MA (moins de 5% des familles AD autosomiques dominantes identifiées). L'effet biologique des mutations *PSEN2* semble rejoindre celui des mutations *PSEN1* : on observe typiquement une augmentation du ratio A β 42/A β 40 produit par la γ -secrétase mutante, entraînant une plus grande propension à

former des dépôts amyloïdes (Scheuner et al 1996). Globalement, les démences liées à PSEN2 restent cliniquement semblables à la MA typique (troubles mnésiques progressifs, désorientation, atteinte des fonctions exécutives), avec parfois des présentations cliniques plus atypiques pouvant mimer d'autres formes de démence dégénérative. Il est intéressant de noter que certaines mutations de *PSEN2* ont été initialement découvertes chez des patients présentant un tableau clinique proche de la démence fronto-temporale avant que la neuropathologie ne confirme les lésions amyloïdes typiques de la MA.

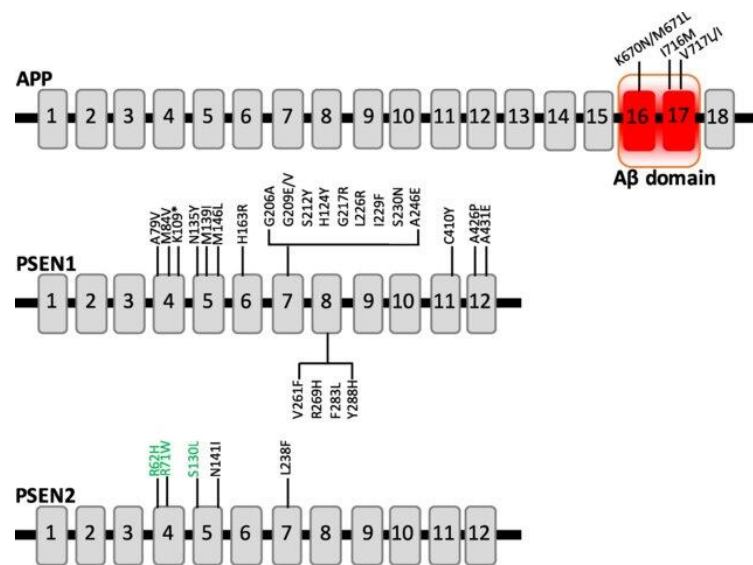


Figure 5. Principales mutations causales identifiées dans les gènes APP, PSEN1 et PSEN2 associées à la maladie d'Alzheimer monogénique à début précoce. Schéma représentant l'organisation exonique des gènes APP (Amyloid Precursor Protein), PSEN1 (Presenilin 1) et PSEN2 (Presenilin 2) ainsi que la position approximative des mutations pathogènes connues. Les mutations d'APP situées dans ou à proximité du domaine Aβ (en rouge) modifient la production ou la structure du peptide amyloïde, favorisant son agrégation. Les mutations de PSEN1 et PSEN2 affectent les domaines transmembranaires de la γ -sécrétase, altérant le clivage de l'APP et augmentant la production de la forme neurotoxique A β 42. Les mutations indiquées en vert correspondent à des variants protecteurs identifiés dans certaines populations. Source de l'image : Karch et al 2018

En résumé, les trois gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2* constituent les piliers génétiques des formes monogéniques autosomiques dominantes de la maladie d'Alzheimer. Le point commun de leurs mutations serait de provoquer une dérégulation de la production ou de la conformation du peptide A β , responsable ultime des dépôts amyloïdes cérébraux. Ces découvertes moléculaires, entamées il y a plus de trois décennies, ont apporté une démonstration du rôle central de la cascade amyloïde dans la pathogénie de la MA : toutes les mutations connues causant une MA monogénique chez l'Homme touchent soit le précurseur de l'A β (APP), soit l'enzyme qui génère l'A β (γ -sécrétase, composée notamment de PSEN1 ou PSEN2) (Selkoe

et al 2016). Comme vu dans la section précédente, ce constat a durablement orienté la recherche et les essais thérapeutiques, en ciblant prioritairement le peptide amyloïde A β et sa biogénèse. Enfin, l'étude des formes monogéniques a permis de développer des modèles cellulaires et animaux porteurs de mutations humaines d'*APP* ou de préséniline, qui reproduisent en partie la pathologie et constituent des outils précieux pour tester des approches thérapeutiques anti-amyloïdes. Ainsi, bien que rares, les formes monogéniques de la MA ont eu un impact majeur en neurosciences, fournissant un cadre physiopathologique pour comprendre et, espérons-le, mieux traiter la maladie d'Alzheimer multifactorielle plus commune.

La forme multifactorielle de la maladie

La forme multifactorielle de la MA représente la grande majorité des cas (plus de 99 % des formes diagnostiquées), par opposition aux formes monogéniques rares. Elle résulte d'une interaction complexe entre des facteurs de risque génétiques et environnementaux, dont les effets cumulatifs modulent progressivement la vulnérabilité cérébrale au cours du vieillissement. Cette origine polyfactorielle confère à la maladie un caractère hautement hétérogène, tant sur le plan clinique que biologique, rendant la compréhension de ses déterminants et de leurs interrelations essentielle pour la prévention et la prise en charge.

Facteurs environnementaux non modifiables : l'âge et le sexe

Parmi les facteurs environnementaux, le premier d'entre eux est l'âge avancé : l'incidence de la MA augmente exponentiellement avec l'âge, doublant environ tous les 5 à 6 ans après 65 ans (Ziegler-Graham et al 2008). Ainsi, le vieillissement de la population explique en grande partie la hausse du nombre de cas. Le sexe intervient également : environ deux tiers des patients sont des femmes (Beam et al 2018). Cette sur-représentation féminine s'explique en partie parce que les femmes vivent en moyenne plus longtemps, elles atteignent plus souvent les âges très avancés où la MA est la plus fréquente. Les études d'incidence, lorsqu'on ajuste pour l'âge, montrent des différences moindres entre sexes, mais il subsiste des interrogations sur un possible risque intrinsèquement plus élevé chez les femmes par exemple lié à des facteurs hormonaux ou une interaction avec l'allèle *APOE* ϵ 4 (Beam et al 2018). En tout état de cause, le sexe féminin combiné à l'âge constitue un contexte épidémiologique important de la MA multifactorielle.

Facteurs environnementaux modifiables

Plusieurs conditions médicales et facteurs liés au mode de vie modulent le risque de MA multifactorielle (Figure 6). Les troubles métaboliques occupent une place centrale : le diabète de type 2 est associé à un risque accru significatif de démence et de MA (Livingston et al 2024). Une méta-analyse de 20 études prospectives a montré que le diabète augmente d'environ 50 % le risque de MA et de près de 75 % celui de l'ensemble des démences (Gudala et al 2013). L'hyperglycémie chronique favoriserait l'agrégation du peptide β -amyloïde via la formation de produits de glycation avancée, entraînant stress oxydatif et neuroinflammation, ce qui appuie l'hypothèse d'un « diabète de type 3 » pour qualifier la MA dans certains contextes métaboliques (Gudala et al 2013). De même, l'obésité constitue un facteur de risque établi. Les personnes obèses vers la quarantaine ou cinquantaine ont un risque environ 1,4 fois plus élevé de développer une démence plus tard, comparativement à des individus de poids normal (Peditzi et al 2016). L'hypertension artérielle, en particulier à la cinquantaine est également corrélée à un risque accru de MA plus tard dans la vie, tout comme l'hypercholestérolémie, via leurs effets sur la santé vasculaire cérébrale. À l'inverse, un bon contrôle cardiovasculaire est considéré comme protecteur pour le vieillissement cérébral (Kivipelto et al 2001, Shobab et al 2005). Cela rejoint l'importance d'un régime alimentaire équilibré. Une méta-analyse récente a quantifié qu'une forte adhérence au régime méditerranéen est associée à environ 27 % de risque en moins de développer la MA multifactorielle (Nucci et al 2024). À l'inverse, une alimentation déséquilibrée (excès de sucres et graisses saturées, déficit en micronutriments) pourrait favoriser indirectement les processus neurodégénératifs en multipliant les facteurs vasculaires et le stress oxydatif.

Le mode de vie, notamment l'activité physique et cognitive, est un déterminant important. La sédentarité accroît le risque de MA, tandis qu'une activité physique régulière est associée à une réduction notable du risque. Une méta-analyse portant sur plus de 2 million de participants a montré qu'un haut niveau d'activité physique diminue d'environ 28 % l'incidence de la MA par rapport à un niveau sédentaire (Zhang X et al 2023). L'exercice agirait en améliorant la santé vasculaire cérébrale, en réduisant l'inflammation et en stimulant des mécanismes neuronaux trophiques. De même, la stimulation intellectuelle et la vie socialement active contribuent à bâtir une réserve cognitive capable de retarder l'expression clinique de la maladie. Un haut niveau d'éducation, en particulier, a un effet protecteur bien documenté : les personnes ayant fait des études supérieures ou ayant un niveau d'instruction élevé présentent une incidence plus faible de MA que celles avec peu d'années de scolarité. En méta-analyse, un faible niveau d'éducation double presque le risque de développer la MA par rapport à un niveau d'éducation élevé (Caamaño-Isorna et al 2006, Stern et al 2012). Ce constat a été

interprété comme l'effet d'une réserve cognitive plus importante, permettant de compenser plus longtemps les lésions cérébrales avant l'apparition de symptômes cliniques. À l'inverse, certains facteurs psycho-sociaux ont un impact négatif. La dépression est un facteur de risque de la MA, avec une relation dose-effet probable (plus d'épisodes dépressifs ou survenue d'une dépression à mi-vie étant liés à un plus haut risque ultérieur de démence). La dépression pourrait entraîner des altérations neurobiologiques : augmentation du cortisol, inflammation, modifications hippocampiques qui prédisposent au déclin cognitif, bien que la frontière avec les symptômes de la MA soit délicate à établir (Huang et al 2024). De même, l'isolement social chronique et la solitude ont été identifiés comme des facteurs pouvant augmenter le risque de démence, tandis qu'une vie socialement intégrée est protectrice (Stern et al 2012).

Les troubles du sommeil constituent un autre facteur modifiable important mis en évidence par des études récentes. Un sommeil insuffisant ou de mauvaise qualité, en particulier s'il s'installe de façon chronique à la cinquantaine ou soixantaine, peut favoriser l'accumulation de protéines amyloïdes et tau dans le cerveau. Des études longitudinales ont montré que les personnes souffrant de troubles persistants du sommeil ont un risque plus élevé de développer une démence plus tard. Une méta-analyse de 18 études prospectives indique que les troubles du sommeil augmentent le risque de MA d'environ 40 % par rapport à des dormeurs sans problèmes (Shi et al 2018). Les mécanismes en jeu comprennent la fragmentation du sommeil profond nécessaire à l'élimination cérébrale des déchets via le système glymphatique, la désaturation en oxygène et les micro-réveils induits par l'apnée, ainsi que les effets délétères d'un sommeil court sur la clairance du peptide A β . À l'inverse, une bonne hygiène du sommeil et le traitement des troubles tels que l'apnée obstructive pourraient constituer des leviers de prévention.

Le tabagisme a longtemps fait l'objet d'observations contradictoires, mais il est désormais clairement identifié comme un facteur de risque de MA et de démence. Les fumeurs actuels présentent un risque significativement accru par rapport aux non-fumeurs : une méta-analyse de cohortes prospectives a montré que le tabagisme actif augmente d'environ 30-40 % le risque de MA et de démence toutes causes confondues (Zhong et al 2015). Le tabagisme contribue au stress oxydatif, à l'athérosclérose et aux micro-lésions vasculaires cérébrales, ce qui peut accélérer les processus neurodégénératifs. Par ailleurs, la nicotine et d'autres composés du tabac pourraient avoir des effets directs neurotoxiques ou pro-inflammatoires. Globalement, éviter le tabac fait partie intégrante des mesures de réduction de risque de démence.

D'autres facteurs environnementaux, plus récemment étudiés, contribuent également au risque de MA multifactorielle. Les traumatismes crâniens représentent un facteur de risque

bien établi : les antécédents de traumatisme crânien modéré à sévère (avec perte de conscience prolongée, lésions cérébrales focales, etc.) augmentent la probabilité de développer une démence au cours du vieillissement (Gardner et al 2023). Une méta-analyse a estimé que l'ensemble des traumatismes cérébraux (tout degré de sévérité confondu) sont associés à un risque de démence environ 1,6 fois plus élevé par rapport à l'absence de trauma crânien (Gardner et al 2023). Le risque est d'autant plus marqué que le traumatisme a été grave ou répété. Par exemple, des études sur des anciens combattants ont montré qu'un épisode de traumatisme crânien modéré double approximativement le risque de MA, et qu'un traumatisme sévère le triple ou quadruple. Les mécanismes invoqués incluent le relargage de peptides amyloïdes après le choc, des perturbations neuro-inflammatoires durables et la réduction de la réserve cognitive à la suite de la perte neuronale traumatique. De plus, les traumatismes crâniens répétés peuvent conduire à des encéphalopathies traumatiques chroniques qui partagent des caractéristiques avec la MA et majorent le risque de démence (Gardner et al 2023). La prévention des chutes et des accidents, ainsi que la protection du crâne dans les activités à risque, font donc partie des mesures de santé publique susceptibles d'alléger la charge de démence sur le long terme.

Enfin, les facteurs environnementaux au sens large c'est-à-dire les expositions physiques et chimiques sont de plus en plus reconnus dans la pathogenèse de la MA multifactorielle. La pollution atmosphérique chronique, en particulier l'exposition aux particules fines et aux gaz d'échappement (dioxyde d'azote NO₂, oxydes d'azote), a été associée à une augmentation du risque de déclin cognitif et de démence dans de nombreuses études épidémiologiques (Zhang B et al 2023). Une revue systématique récente a conclu que les personnes vivant dans des zones fortement polluées ont un risque plus élevé de développer une démence, y compris la MA, comparé à celles résidant dans un environnement à air plus sain (Wilker et al 2003). Les polluants atmosphériques pourraient agir en provoquant une inflammation systémique et cérébrale, un stress oxydatif neuronal et des lésions vasculaires. Des particules ultrafines ont même été détectées dans le tissu cérébral de personnes exposées, suggérant qu'elles peuvent pénétrer la barrière hémato-encéphalique et induire des dommages directs. L'exposition aux pesticides et aux métaux lourds (plomb, mercure) constitue un autre facteur potentiel : des agriculteurs ou populations exposées professionnellement aux pesticides montrent dans certaines études un taux plus élevé de maladie d'Alzheimer, suggérant un lien toxique cumulatif (Wilker et al 2023, Zhang B et al 2023). Globalement, ces données émergentes appellent à considérer la qualité de l'environnement comme un déterminant de la santé cognitive. Des mesures visant à améliorer la qualité de l'air (réduction des émissions polluantes) et à réduire les nuisances environnementales pourraient, à l'échelle

populationnelle, contribuer à abaisser l'incidence de la MA multifactorielle (Wilker et al 2023, Livingston et al 2023).

En résumé, la forme multifactorielle de la MA est influencée par de nombreux facteurs environnementaux et liés au mode de vie. Un profil à risque comprendrait une personne âgée, plutôt de sexe féminin, ayant des antécédents de maladies métaboliques (diabète, obésité, HTA mal contrôlée), un faible niveau d'activité physique, un tabagisme chronique, un sommeil de mauvaise qualité, un faible capital d'éducation ou des stimulations cognitives réduites, et des traumatismes crâniens ou expositions toxiques au cours de la vie. À l'inverse, un individu qui maintient une bonne hygiène de vie (exercice, alimentation équilibrée de type méditerranéen, interactions sociales, sommeil suffisant), un bon contrôle de sa santé cardio-métabolique, et qui ne fume pas, présente un risque significativement moindre de développer la MA multifactorielle. On estime qu'une part substantielle des cas de MA pourrait être prévenue ou du moins retardée en agissant sur ces facteurs modifiables : les rapports d'experts attribuent environ 40 % du risque de démence à des facteurs potentiellement évitables (Livingston et al 2023). Cela souligne l'importance de la prévention tout au long de la vie pour atténuer l'impact de la MA dans la population.



Figure 6. Principaux facteurs de risque environnementaux modifiables pour la maladie d'Alzheimer, selon la Commission « Dementia Prevention, Intervention, and Care » du Lancet. Les douze facteurs de risque potentiellement modifiables identifiés par la commission sont représentés ici sous forme d'illustrations : Hypertension artérielle, obésité, diabète, sédentarité, tabagisme, consommation excessive d'alcool, faible niveau d'éducation, isolement social, dépression, perte auditive, traumatisme crânien et pollution de l'air. Ces facteurs combinés pourraient expliquer jusqu'à 40 % des cas de démence, et leur réduction constitue une cible majeure pour la prévention primaire de la maladie d'Alzheimer (World Alzheimer Report 2023)

Facteurs génétiques : *APOE*

À côté de ces influences environnementales, la composante génétique joue un rôle majeur dans la forme multifactorielles de la MA, bien qu'elle diffère fondamentalement des mutations génétiques responsables des formes monogéniques précoces vues précédemment. À l'inverse, la grande majorité des patients souffrant de MA après 65 ans n'ont pas de mutation déterministe unique, mais plutôt un ensemble de facteurs génétiques de prédisposition, chacun contribuant de manière partielle au risque, on parle de prédisposition polygénique. Les études chez les jumeaux suggèrent que les facteurs génétiques contribuent de façon substantielle au risque de MA multifactorielle, avec des estimations de contribution de l'ordre de 60 à 80 % dans ces cohortes (Gatz et al 2006). Cette composante génétique implique l'intervention de nombreux gènes à risque, chacun ayant un effet modeste et non déterministe, interagissant entre eux et avec l'environnement pour aboutir ou non à la maladie.

Le principal facteur de susceptibilité génétique identifié à ce jour pour la MA multifactorielle est l'allèle $\epsilon 4$ du gène de l'apolipoprotéine E (*APOE*) (Corder et al 1993). Le gène *APOE*, situé sur le chromosome 19, code pour l'apolipoprotéine E, une protéine impliquée dans le transport des lipides et la réparation neuronale. Il existe trois isoformes principales d'apolipoprotéine E, déterminées par les allèles $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$ d'*APOE*. Ces variants présentent des fréquences différentes dans la population générale (environ 8 % pour $\epsilon 2$, 78 % pour $\epsilon 3$, 14 % pour $\epsilon 4$) et confèrent des risques inégaux vis-à-vis de la MA (Lumsden et al 2020, Kloske et al 2020). L'allèle $\epsilon 4$, bien que peu fréquent, constitue le plus puissant facteur de risque génétique de la MA multifactorielle : chaque copie de $\epsilon 4$ multiplie environ par 3 à 4 le risque de développer la maladie (et jusqu'à 10 à 15 fois pour les homozygotes $\epsilon 4/\epsilon 4$) par rapport à l'allèle commun $\epsilon 3$ (Yamazaki et al 2019). En revanche, l'allèle $\epsilon 2$ exerce un effet protecteur, associant une réduction du risque (odds ratio $\sim 0,6$) et un âge de début plus tardif chez les porteurs $\epsilon 2$ (Liu et al 2013). *APOE* $\epsilon 4$ est également connu pour abaisser l'âge moyen d'apparition des symptômes de plusieurs années par rapport aux non-porteurs (Corder et al 1993).

Sur le plan physiopathologique, les isoformes d'*APOE* modulent différemment des mécanismes clés de la MA. Des travaux initiaux ont mis en évidence une interaction étroite *APOE*- $A\beta$ (Strittmatter et al 1993) et montré qu'*ApoE* influence l'agrégation d' $A\beta$ ainsi que sa clairance cérébrale, de manière dépendante de l'isoforme notamment via des voies de transport/récepteurs comme LRP1 (Castellano et al 2011, Kanekiyo et al 2015). En particulier, *APOE4* favorise la formation de dépôts amyloïdes et entrave l'élimination d' $A\beta$ par rapport aux isoformes *APOE3* et *APOE2* (Castellano et al 2011). De ce fait, les porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ présentent, dès le stade préclinique, une charge amyloïde cérébrale plus élevée observable par TEP pour $A\beta$, alors qu'à l'inverse l'allèle $\epsilon 2$ est associé à une accumulation amyloïde plus

lente (Insel et al 2021). Au-delà de l'amyloïde, des études plus récentes ont élargi notre compréhension des effets d'APOE4 à d'autres aspects de la pathologie : APOE4 exacerbe la neurodégénérescence tau, altère la fonction des cellules gliales et perturbe l'intégrité vasculaire cérébrale (Shi Y et al 2017). En effet, APOE4 est associé à une activation microgliale pro-inflammatoire accrue et à une neuroinflammation plus intense, ce qui peut amplifier les dommages neuronaux. Des modèles expérimentaux montrent qu'en présence d'A β , la microglie issue de porteurs APOE4 est moins efficace pour éliminer les agrégats amyloïdes et produit davantage de cytokines inflammatoires par rapport à APOE3 (Fitz et al 2021). Par ailleurs, l'APOE4 apparaît moins efficace pour assurer le transport et la distribution des lipides dans le cerveau. L'ensemble de ces caractéristiques explique en grande partie l'impact délétère de l'allèle ϵ 4 sur le risque de MA. À l'inverse, l'isoforme APOE2 moins propice à l'agrégation d'A β , semble conférer une protection partielle, possiblement via des mécanismes encore débattus (par exemple, une résistance relative aux effets toxiques de Tau ou une neuroinflammation atténuée chez les porteurs ϵ 2) (Li et al 2020).

En résumé, *APOE* ϵ 4 demeure à ce jour le principal facteur génétique de susceptibilité à la maladie d'Alzheimer multifactorielle, c'est-à-dire un variant fréquent de la population générale qui augmente significativement la probabilité de développer la maladie. Dans l'état actuel des connaissances, *APOE* ϵ 4 apparaît associé à plusieurs composantes physiopathologiques de la MA : il influence le métabolisme d'A β et le transport/l'homéostasie des lipides cérébraux, modulerait la réactivité gliale/immune, et pourrait impacter la cascade Tau (Liu et al 2013, Yamazaki et al 2019). Ces multiples effets font d'*APOE* un enjeu central pour la compréhension et le traitement de la MA. D'ailleurs, des différences phénotypiques sont observées chez les individus en fonction du génotype *APOE* : les porteurs d' ϵ 4 présentent plus précocement des biomarqueurs de MA, tandis que les porteurs d' ϵ 2 semblent relativement préservés sur ces plans (Jansen et al 2015, Salvadó et al 2021). Cette influence d'*APOE* sur les marqueurs pathologiques précède souvent l'apparition des symptômes, soulignant l'importance de ce gène non seulement dans le risque de déclencher la maladie, mais aussi dans son rythme de progression.

Facteurs génétiques : Nouvelles identifications grâce aux GWAS et WES/WGS

Afin d'identifier d'autres facteurs de risque génétiques au-delà d'*APOE*, de vastes études d'association pangénomique (GWAS) ont été entreprises sur la MA depuis les années 2000. La démarche GWAS repose sur le criblage systématique de centaines de milliers/millions de polymorphismes génétiques fréquents (SNPs) à travers le génome, comparant leur fréquence chez des patients atteints de MA et chez des sujets sains. Cette approche non biaisée a permis

de révéler de nouveaux gènes de susceptibilité inattendus, chacun ayant individuellement un effet modeste sur le risque, mais éclairant collectivement les voies biologiques de la maladie.

Les premiers succès des GWAS dans la MA ont été rapportés en 2009, avec la mise en évidence de variants associés sur les gènes *CLU* (clusterine) et *PICALM* chez des milliers de patients et témoins (Harold et al 2009). Simultanément, une autre étude confirmait *CLU* et identifiait un signal sur *CR1*, le gène du récepteur 1 du complément (Lambert et al 2009). Ces découvertes initiales ont consolidé des axes déjà suggérés par *APOE*. En effet, *CLU* code une apolipoprotéine impliquée dans le transport lipidique et la clairance d'A β , *PICALM* intervient dans l'endocytose synaptique et le trafic vésiculaire, et *CR1* joue un rôle dans le système immunitaire inné (Harold et al 2009). *BIN1* a été identifié en 2010 (Seshadri et al 2010), peu de temps après ces premières études puis confirmé par les méta-analyses suivantes. Dans les années qui ont suivi, les consortiums internationaux ont accru la taille des échantillons analysés, conduisant à l'identification d'un nombre croissant de loci à risque. Une méta-analyse majeure portée par notre laboratoire et publiée en 2013 a combiné les données de plus de 25 000 individus et mis en évidence 19 loci associés (hors *APOE*) et en identifiant 11 nouveaux loci dont *PTK2B*. Ces résultats ont solidement répété l'association de gènes suggérés auparavant (*CLU*, *PICALM*, *CR1*, *BIN1*, etc.) et apporté de nouveaux acteurs, élargissant le panorama des voies pathogéniques impliquées. L'ensemble de ces avancées a ainsi confirmé que, hormis la voie amyloïde (dominée par *APOE*), la susceptibilité à la MA impliquait d'autres mécanismes tels que l'inflammation cérébrale, la dégradation/phagocytose des protéines toxiques, le trafic endosomal, la fonction synaptique ou encore le métabolisme du cholestérol.

Au cours des années 2010, la multiplication des GWAS et leur méta-analyse ont continué d'affiner la cartographie génétique de la MA. En 2019, une nouvelle méta-analyse regroupant plus de 94 000 participants a porté à plus de 20 loci le nombre de régions génétiques associées de façon robuste à la MA (Kunkle et al 2019). Cette étude a non seulement confirmé la plupart des gènes précédemment identifiés, mais a également révélé de nouveaux loci et approfondi l'analyse fonctionnelle des résultats. En particulier, des analyses bio-informatiques de protéomique ont mis en évidence quatre grands axes biologiques sur-représentés par les gènes de susceptibilité : l'immunité innée et la réponse microgliale, le métabolisme des lipides, les mécanismes liés à la protéine Tau et ceux liés à la protéine précurseur amyloïde (APP) et à son clivage en A β (Kunkle et al 2019). La présence récurrente de gènes impliqués dans le transport lipidique (*APOE*, *CLU*, *ABCA7*) indique qu'une perturbation de l'homéostasie cholestérol et des membranes neuronales contribue à la pathogénie.

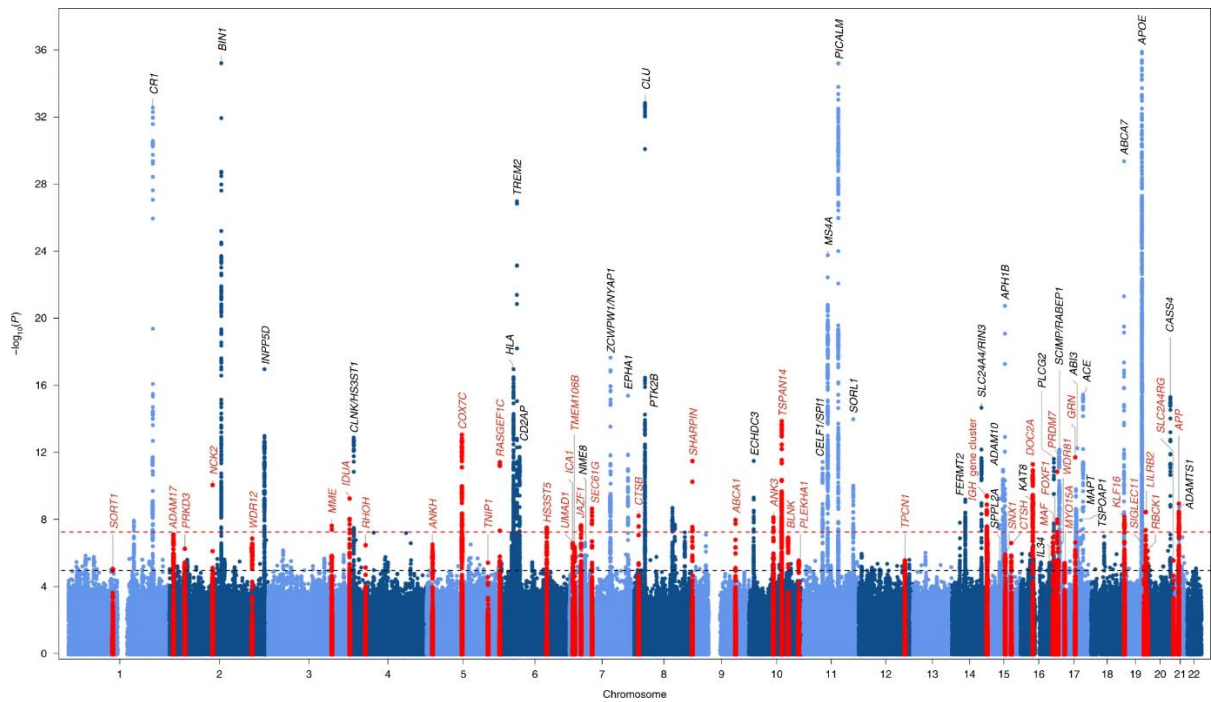


Figure 7. Représentation d'un Manhattan plot issu d'une méta-analyse GWAS sur la maladie d'Alzheimer. Chaque point correspond à un variant génétique testé, positionné selon sa localisation chromosomique (axe horizontal) et son niveau de significativité statistique (axe vertical, exprimé en $-\log_{10}(p)$). La ligne horizontale rouge indique le seuil de significativité génomique conventionnel ($p = 5 \times 10^{-8}$). Les loci connus ou nouvellement associés au risque de MA sont annotés avec le nom du gène candidat le plus probable. On distingue notamment les principaux gènes de risque robustement répliqués tels que APOE, BIN1, CLU, PICCALM, CR1, TREM2, PTK2B, ABCA7 et SORL1. Ce type de représentation illustre la nature polygénique et multifactorielle de la susceptibilité génétique à la MA (Bellenguez et al 2022).

Très récemment, l'agrandissement encore plus considérable des cohortes grâce aux données de biobanques et d'études cliniques internationales a permis de franchir un nouveau palier. La méta-analyse portée par notre laboratoire et publiée en 2022 a rassemblé les données génomiques de plus de 111 000 cas de MA (y compris des cas appelés proxy identifiés via des antécédents familiaux) et près de 677 000 témoins, constituant à ce jour la plus vaste étude génétique sur la maladie (Bellenguez et al 2022) (Figure 7). Ce travail a abouti à l'identification de 75 loci de susceptibilité au total, dont 42 nouveaux encore jamais rapportés (Figure 7). Il s'agit d'une avancée majeure qui étend significativement la liste des acteurs génétiques impliqués (Bellenguez et al 2022). L'analyse de ces résultats par catégories fonctionnelles confirme l'importance des pathologies amyloïde et Tau ainsi que le rôle central de la microglie et de l'immunité innée dans la MA. Notamment, de nombreux gènes de risque convergent sur les voies de l'activation microgliale, de la phagocytose et de la réponse inflammatoire (*TREM2*, *GRN*, *ABI3*). D'autres consolident l'impact du métabolisme des membranes et des lipoprotéines, soulignant qu'une altération du transport des lipides ou de l'endocytose peut favoriser la physiopathologie de la MA (*APOE*, *CLU*, *ABCA1*, *ABCA7*, *BIN1*,

PICALM, *SORL1*). Enfin, certaines associations suggèrent des perturbations synaptiques subtiles : par exemple, le locus *PTK2B* code une tyrosine kinase (Pyk2) impliquée dans la plasticité synaptique neuronale, tandis que *MEF2C*, un facteur de transcription lié à la différenciation neuronale et à la formation des synapses, a également émergé comme gène candidat (Lambert et al 2013, Bellenguez et al 2022). Ces découvertes éclairent ainsi plusieurs trajectoires pathologiques de la MA, allant de la réaction immunitaire du cerveau au dysfonctionnement des circuits neuronaux.

En somme, les GWAS ont apporté une vision plus globale de la génétique de la MA. Elles ont confirmé que la susceptibilité à la maladie résulte de l'effet combiné d'une multitude de variants courants, chacun contribuant modestement au risque mais s'inscrivant dans des réseaux biologiques cohérents. Les principales voies dégagées sont l'immunité (microglie, complément), la dégradation endosomale et phagocytose, le métabolisme lipidique/cholestérol et l'homéostasie d'A β , de tau et de la fonction synaptique. Ces voies offrent un cadre d'étude pour comprendre comment le terrain génétique peut influencer l'initiation et la progression des processus neurodégénératifs dans la MA. Ces données ouvrent la porte à des approches thérapeutiques ciblant ces mécanismes en stratifiant éventuellement les patients selon leur profil génétique.

Cependant, cette vision issue des GWAS reste partielle, car elle repose sur des variants fréquents à effet faible. Les approches de séquençage d'exome ou de génome entier (WES/WGS) ont depuis complété ce paysage en révélant des variants rares ou très rares, absents des bases de données de GWAS, mais dotés d'un effet individuel beaucoup plus fort sur le risque (Bellenguez et al 2022). Certains de ces variants, identifiés dans des gènes tels que *TREM2* (Guerreiro et al 2013), *SORL1* (Pottier et al 2012), *ABCA7* (Steinberg et al 2015) ou *PLCG2* (Sims et al 2017), présentent des odds ratios bien supérieurs à ceux observés pour les loci communs comme *BIN1* ou *PTK2B*, bien que leur faible fréquence limite leur impact au niveau populationnel. Ces découvertes soulignent la complémentarité des approches GWAS et WES : les premières révèlent les grandes voies biologiques contributrices, tandis que les secondes identifient des mutations rares à effet fort susceptibles de perturber directement des mécanismes clés de la neurodégénérescence. Ainsi, l'intégration de ces deux niveaux d'information permet d'approcher une vision plus exhaustive de la vulnérabilité génétique dans la MA.

Au sein de ce paysage génétique, deux gènes, *BIN1* (Bridging Integrator 1) et *PTK2B* (Protein Tyrosine Kinase 2 Beta), se distinguent particulièrement par la répliquabilité de leur association avec la MA dans les GWAS majeures (Lambert et al 2013, Kunkle et al 2019, Bellenguez et al

2022) et nous intéresse particulièrement pour ce projet de thèse. Je présente dans les paragraphes suivants des éléments d'information à leur sujet.

Focus sur les facteurs de risque génétique *BIN1* et *PTK2B*

BIN1, une protéine adaptatrice aux multiples rôles

Gène *BIN1* et ses isoformes

Le gène *Bridging Integrator 1* (*BIN1*), localisé sur le chromosome 2q14, a été identifié initialement par son interaction avec l'oncogène *c-myc*, suggérant un rôle de suppresseur de tumeur (Sakamuro et al 1996). Il appartient à la famille des amphiphysines, un groupe de protéines à domaine BAR impliquées dans la courbure membranaire et l'endocytose (Wigge et al 1997). *BIN1*, également nommé amphiphysine II, se distingue de son paralogue amphiphysine I (*AMPH1*) par sa large distribution tissulaire et sa grande diversité d'isoformes, qui lui confèrent des fonctions spécifiques (Ramjaun & McPherson 1997, Dourlen et al 2025).

Chez l'humain, au moins une quinzaine d'isoformes de *BIN1* ont été décrites à ce jour, reflétant la complexité transcriptionnelle du locus (Dourlen et al 2025). Ces isoformes diffèrent par l'inclusion ou l'exclusion de certains exons, ce qui conditionne leur composition en domaines fonctionnels, leur distribution cellulaire et leurs rôles biologiques.

Les isoformes de *BIN1* présentent des profils d'expression qui varient selon les tissus et les types cellulaires (Figure 8). L'isoforme la plus longue (isoforme 1) est exprimée presque exclusivement dans le système nerveux central, en particulier dans les neurones (Butler et al 1997). Elle comprend tous les domaines protéiques de *BIN1* en dehors du domaine PI et se localise principalement dans le cytoplasme neuronal, notamment au niveau des terminaisons synaptiques. À l'inverse, certaines isoformes plus courtes sont spécifiques aux muscles squelettiques par exemple l'isoforme 8 (Butler et al., 1997, Prokic et al 2020). Cette isoforme musculaire possède le motif PI, liant les phosphoinositides qui renforce l'ancrage de *BIN1* iso8 à la membrane plasmique et favorise la biogenèse des tubules T (Lee et al 2002, Böhm et al 2013). Des localisations nucléaires de *BIN1* ont également été rapportées dans le muscle en lien avec ses interactions avec *c-Myc* mais elles ne relèvent pas de l'exon 11 (Sakamuro et al., 1996). D'autres isoformes dites ubiquitaires sont exprimées à bas bruit dans de nombreux tissus. Ainsi, la diversité isoformique de *BIN1* s'accompagne de fonctions différentielles selon le type cellulaire : les formes neuronales participent aux processus membranaires (endocytose, trafic vésiculaire) au niveau des synapses, tandis que les formes musculaires ou

ubiquitaire peuvent remplir des fonctions nucléaires ou structurales spécifiques aux tissus où elles s'expriment. Enfin, des travaux récents de transcriptomique ont affiné cette distribution cellulaire : dans le cerveau humain, l'expression globale de *BIN1* est particulièrement enrichie chez les oligodendrocytes, puis chez les astrocytes et les neurones (Marques-Coelho et al 2021). En parallèle, au niveau des isoformes, les formes 1-3 prédominent dans les neurones et les astrocytes tandis que les microglies expriment surtout des isoformes plus courtes, suggérant des fonctions distinctes selon le type cellulaire et l'isoforme dans la MA (De Rossi et al 2016, Taga et al 2020).

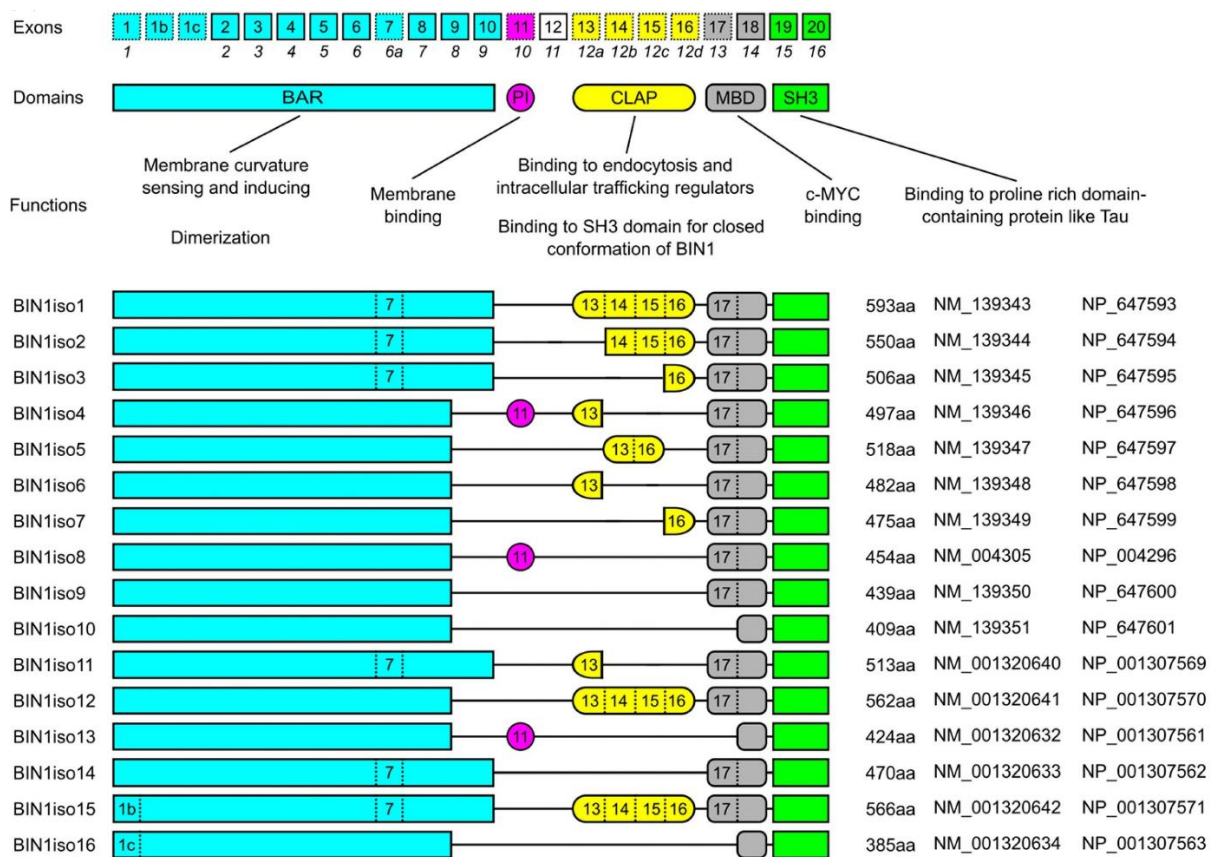


Figure 8. Représentation schématique des exons, domaines protéiques et principales isoformes de BIN1. Les exons sont numérotés et colorés selon les domaines qu'ils codent. En position N-terminale, le domaine BAR (bleu, exon 1-10), l'insert PI (rose, exon 11), le domaine CLAP (jaune, exons 13-16), le MBD (Myc-binding domain, gris, exon 17-18) et le domaine SH3 (vert, exon 19-20). Les schémas inférieurs montrent les 16 isoformes principales de BIN1 identifiées à ce jour, leur composition en exons, leur taille et leurs références NM/NP. Les isoformes neuronales longues incluent le domaine CLAP et sont localisées dans les cellules du système nerveux, les isoformes musculaires contiennent l'exon 11. Les isoformes plus courtes sont d'expression ubiquitaire. Enfin, certaines isoformes atypiques présentent des combinaisons alternatives ou tronquées impliquées dans des contextes pathologiques, notamment le mélanome.

Domaines protéiques de BIN1

La protéine BIN1 présente une structure modulaire composée de plusieurs domaines conservés, chacun contribuant à ses fonctions cellulaires spécifiques (Prokic et al 2014, Dourlen et al 2025) (Figure 8). En position N-terminale, le domaine BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) permet à BIN1 de former des dimères et de s'insérer à la face interne des membranes. Ce domaine induit et stabilise la courbure membranaire, générant des invaginations tubulaires ou vésiculaires indispensables à l'endocytose et au remodelage membranaire (Peter et al 2004). Juste après le BAR, certaines isoformes possèdent un motif PI (domaine *phosphoinositide-binding*) encodé par l'exon 11. Ce motif, présent notamment dans les isoformes musculaires, lie les phosphatidylinositols membranaires et renforce l'action du domaine BAR : sa délétion réduit fortement la capacité de BIN1 à courber les membranes (Lee et al 2002, Böhm et al 2013). Les isoformes neuronales de BIN1 intègrent un domaine CLAP (*Clathrin and AP2-binding*) issu des exons 13-16. Ce module permet le recrutement local de la clathrine et du complexe adaptateur AP-2 sur les membranes, facilitant la formation de vésicules tapissées de clathrine (Slepnev et al 2000, Yoshida et al 2004).

BIN1 comporte également, selon l'isoforme, un domaine MBD (*Myc-binding domain*, exons 17-18) capable d'interagir avec le proto-oncogène c-Myc (Sakamuro et al 1996, Elliott et al 1999). Ce domaine confère à BIN1 des propriétés de régulation transcriptionnelle via l'inhibition de c-Myc, modulant par exemple l'acétylation des histones et a été associé à une activité anti-oncogénique dans certains contextes cellulaires (Elliott et al 1999). Enfin, en position C-terminale, BIN1 possède un domaine SH3 (*Src Homology 3*) présent dans toutes les isoformes connues. Le domaine SH3 reconnaît les motifs riches en prolines (séquences PXXPR) de nombreuses protéines partenaires (Yu et al 1994). Parmi ses interactions établies figurent plusieurs effecteurs clés de l'endocytose neuronale : par exemple, le SH3 de BIN1 se lie à la dynamine-2, une GTPase requise pour la fission des vésicules, ainsi qu'à la synaptojanine et à l'endophiline, deux protéines impliquées dans le bourgeonnement et le déshabillage des vésicules (Grabs et al 1997, Cestra et al 1999). L'interaction SH3-PXXP est déterminante pour la fonction de BIN1 : il a été montré que des mutations pathogènes de BIN1 abolissant la liaison de son domaine SH3 à la dynamine provoquent des défauts sévères de remodelage membranaire et sont responsables de formes héréditaires de myopathie centronucléaire (Nicot et al 2007, Zambo et al 2024). Notons que le domaine SH3 de BIN1 peut également se lier directement à la protéine Tau, riche en motifs proline, établissant ainsi un lien physique entre BIN1 et le cytosquelette neuronal (Sottejeau et al 2015, Lasorsa et al 2018). L'ensemble de ces domaines confère à BIN1 le rôle d'un adaptateur polyvalent qui peut agir en quelque sorte comme un pont moléculaire entre la courbure membranaire, l'internalisation vésiculaire et diverses voies de signalisation intracellulaire, un rôle

particulièrement crucial dans les cellules excitables telles que les neurones (Dourlen et al 2025).

Fonctions physiologiques de BIN1 dans le cerveau

Dans le système nerveux central, BIN1 est exprimé par les neurones matures, notamment sous la forme de l'isoforme 1. Au sein du neurone, BIN1 se concentre dans des domaines sous-membranaires spécifiques : on le retrouve particulièrement au niveau du segment initial de l'axone (AIS) et des nœuds de Ranvier, ainsi qu'aux terminaisons synaptiques (Butler *et al.*, 1997). Cette distribution stratégique suggère que BIN1 contribue à l'organisation de microdomaines membranaires spécialisés et aux échanges vésiculaires dans les neurones. En effet, étant donné sa structure modulaire, BIN1 intervient dans plusieurs processus clés de la biologie neuronale.

BIN1 joue un rôle essentiel dans la dynamique membranaire neuronale. Les isoformes neuronales contenant le domaine CLAP interagissent directement avec la clathrine et le complexe AP-2, tandis que leur domaine SH3 recrute les effecteurs de la fission vésiculaire, notamment la dynamine et la synaptojanine (Ramjaun & McPherson 1997, Malki et al 2017). Au cours de la neurotransmission, BIN1 pourrait façonner les membranes présynaptiques via son domaine BAR tout en coordonnant la fission des vésicules par ses interactions SH3, facilitant la récupération rapide des vésicules après exocytose (Ramjaun & McPherson 1997, Peter et al 2004, De Rossi et al 2020). Toutefois, des études de perte de fonction montrent que BIN1 n'agit pas comme un acteur constitutif de l'endocytose. Dans certains modèles cellulaires, son invalidation augmente l'endocytose de la transferrine, suggérant qu'il modère le processus en conditions basales (Calafate et al 2016). Ce rôle régulateur, plutôt qu'initiateur, pourrait s'expliquer par une redondance fonctionnelle avec l'amphiphysine I et par la participation de BIN1 à des étapes plus tardives du tri et du recyclage endosomal (Dourlen et al 2025). En accord avec cette hypothèse, la perte de BIN1 induit un défaut de recyclage de la transferrine vers la membrane plasmique et son accumulation dans les endosomes, traduisant un dysfonctionnement du recyclage endosomal (Perdigão et al 2021). Ces anomalies sont associées à une altération de l'axe Rab8a-EHBP1L1-BIN1, un module moléculaire essentiel pour le retour des vésicules de recyclage vers la surface cellulaire (Nakajo et al 2016). Enfin, BIN1 interagit également avec le complexe AP-1 au niveau du trans-Golgi, soulignant que ses fonctions s'étendent au-delà du compartiment synaptique et englobent l'ensemble du trafic intracellulaire neuronal, du trans-Golgi aux endosomes de recyclage (Huser et al 2013).

Au-delà de l'endocytose, BIN1 établit un couplage étroit entre membranes et cytosquelette d'actine. Son domaine BAR, en plus de courber les membranes, peut se lier directement aux filaments d'actine et stabiliser des faisceaux d'actine en conditions neuronales, suggérant un rôle d'interfaces membrane-actine (Dräger et al 2017). Par ailleurs, son domaine SH3 recrute plusieurs régulateurs de la polymérisation actinique, notamment N-WASP qui active le complexe Arp2/3 ainsi que la kinase c-Abl. Cela connecte ainsi BIN1 aux voies de nucléation et de réorganisation de l'actine (Falcone et al 2014, Dräger et al 2017, De Rossi et al 2016). Ces interactions positionnent BIN1 comme un coordonnateur de la dynamique actine-membrane au niveau des sites d'endocytose et des domaines spécialisés du neurone. Au segment initial de l'axone (AIS), BIN1 est enrichi dans la couche corticale sous-membranaire, en co-localisation avec l'ankyrine-G, composant central du réseau actine-spectrine de ce microdomaine (Butler et al 1997, Letierrier et al 2018). Ce positionnement stratégique suggère que BIN1 contribue à la stabilité structurale de l'AIS et à l'ancrage des complexes de canaux ioniques et d'adhésion au cytosquelette, participant ainsi à la compartimentation fonctionnelle et à l'excitabilité neuronale.

L'expression de *BIN1* n'est pas restreinte aux neurones : elle est également élevée dans plusieurs populations gliales, en particulier dans les oligodendrocytes matures (Marques-Coelho et al 2021). Notamment, il a été découvert qu'une proportion majeure de BIN1 cérébral provient des oligodendrocytes matures, avec une forte localisation de la protéine BIN1 dans les tractus de substance blanche (De Rossi et al 2016). L'expression de BIN1 augmente parallèlement à la myélinisation postnatale, et la perte de BIN1 chez la souris exacerbe la démyélinisation dans des modèles de lésion, suggérant une contribution de BIN1 aux remodelages membranaires liés à la formation et au maintien de la myéline (De Rossi et al 2016). Dans les microglies, BIN1 participe à des processus membranaires et immunitaires : sa diminution altère l'activation pro-inflammatoire comme la réponses transcriptionnelles et la sécrétion de cytokines. Cela indique que BIN1 serait requis pour la mise en place d'un état microglial actif et pour des programmes de signalisation liés à l'inflammation et à la neurodégénérescence (Taga et al 2020, Sudwarts et al 2022).

Les études *in vivo* confirment l'importance physiologique de BIN1. Une perte de fonction constitutive de *BIN1* chez la souris provoque une létalité périnatale, due principalement à une atteinte musculaire sévère empêchant l'alimentation (Müller et al 2003). Les souris *BIN1*^{-/-} présentent une désorganisation profonde des fibres musculaires (tubules T et triades altérés, noyaux centraux) similaire à la myopathie centronucléaire (Müller et al 2003), ce qui concorde avec les observations chez l'humain où des mutations bialléliques de *BIN1* causent des myopathies héréditaires (Nicot et al 2007). Comme expliqué précédemment, dans le système nerveux, une redondance fonctionnelle existe entre BIN1 (amphiphysine II) et amphiphysine I

(Dourlen et al 2025). Cette compensation explique qu'une délétion spécifique de *BIN1* dans le cerveau de souris n'entraîne ni phénotype neurodéveloppemental majeur, ni déficit neurologique aigu, contrairement à la perte d'amphiphysine I (Di Paolo et al 2002, De Rossi et al 2020). Il semble qu'en conditions basales, d'autres voies puissent compenser l'absence de BIN1 dans les neurones. Néanmoins, cette compensation a ses limites : BIN1 contribue de manière subtile mais réelle à l'efficacité de l'endocytose neuronale et devient critique lorsque les neurones sont soumis à un stress ou à une activité synaptique intense (De Rossi et al 2020). Par exemple, la suppression conditionnelle de *BIN1* dans les neurones du cortex et de l'hippocampe de souris adultes provoque un défaut de libération présynaptique des neurotransmetteurs, avec un cumul anormal de vésicules en réserve dans les terminaux synaptiques. Cela conduit *in fine* à des troubles spécifiques de la mémoire spatiale (De Rossi et al 2020). Ce résultat souligne que BIN1 est requis pour une neurotransmission efficace et pour la plasticité synaptique supportant les fonctions mnésiques.

BIN1 et la maladie d'Alzheimer

L'implication de BIN1 dans la MA est soutenue par de multiples arguments, qu'ils soient génétiques, moléculaires, anatomopathologiques ou fonctionnels. *BIN1* a émergé en 2009–2010 comme le deuxième facteur de risque génétique le plus significativement associé à la MA, après *APOE ε4* (Seshadri et al 2010, Lambert et al 2013). Plusieurs études d'association pangénomique à grande échelle ont confirmé que des variantes polymorphes du locus *BIN1* modulent le risque de développer la MA (Lambert et al 2013, Kunkle et al 2019, Bellenguez et al 2022). Fait notable, ces variants à risque sont situés dans des régions régulatrices non-codantes du gène et semblent influencer l'expression ou l'épissage de BIN1 plutôt que la séquence protéique elle-même (Chapuis et al 2013). Par exemple, un allèle d'insertion intronique associé au risque confère une activité transcriptionnelle accrue, menant à des niveaux plus élevés d'ARN messager de BIN1 dans le cerveau (Chapuis et al 2013). De plus, des analyses d'imagerie et de biomarqueurs indiquent que les variants à risque de *BIN1* sont corrélés à l'ampleur de la pathologie Tau mesurée *in vivo* (Tau-TEP et Tau dans le liquide cébrospinal), mais pas à la charge amyloïde (imagerie amyloïde ou Aβ42 dans le LCS) chez les individus âgés sans démence (Franzmeier et al 2019). L'ensemble de ces données suggère que l'effet pathogénique de BIN1 s'exercerait préférentiellement sur les lésions associées à Tau plutôt que celles associées à l'amyloïde.

Au niveau post-mortem, BIN1 présente des altérations d'expression ou de localisation dans les cerveaux atteints de MA. Plusieurs études transcriptomiques ont rapporté une augmentation des niveaux de transcrits de BIN1 dans le cerveau de patients Alzheimer par rapport à des témoins (Chapuis et al 2013). Cependant, la situation semble complexe : la

protéine BIN1 est exprimée par divers types cellulaires cérébraux et des changements spécifiques d'isoformes peuvent survenir pendant la maladie. Par exemple, une diminution a été rapportée chez des patients MA d'une sous-population d'astrocytes exprimant des isoformes de BIN1 habituellement enrichies dans les neurones, ce qui pourrait favoriser l'accumulation de Tau pathologique (Taga et al 2020). Inversement, l'activation des microglies s'accompagne d'une augmentation de certaines isoformes courtes de BIN1 dans les cerveaux atteints de la MA, reflet potentiel d'une réponse immunitaire ou d'un stress cellulaire (Taga et al 2020). Ainsi, il apparaît que la dérégulation de BIN1 dans la MA n'est pas univoque : elle varie selon le type cellulaire et l'isoforme considéré, traduisant la multifonctionnalité de BIN1 dans le cerveau (Dourlen et al 2025).

Les fonctions physiologiques pléiotropes de BIN1 peuvent, en contexte pathologique, être altérées d'une manière qui favorise les lésions caractéristiques de la MA. Nous examinons ci-dessous le rôle possible de BIN1 dans chacune des lésions présentées précédemment.

Implication de BIN1 dans la pathologie amyloïde

Plusieurs données suggèrent que BIN1 pourrait moduler le métabolisme de la protéine APP et la production des peptides A β , éléments constitutifs des plaques séniles. Sur le plan cellulaire, la réduction de l'expression de BIN1 a été associée à une augmentation de la genèse d'A β . En particulier, des expériences *in vitro* ont montré qu'une invalidation de BIN1 provoque l'accumulation de la β -sécrétase BACE1 dans les endosomes précoces, en retardant son acheminement vers les lysosomes pour dégradation (Miyagawa et al 2016). Il en résulte une augmentation intracellulaire de BACE1, ce qui favorise sa rencontre avec APP et intensifie le clivage amyloïdogène, menant à une surproduction de peptides A β 42 (Miyagawa et al 2016). D'autres études confirment que BIN1 est nécessaire au bon recyclage endosomal de BACE1 : sa présence facilite la fission et l'évacuation des tubules endosomaux contenant BACE1, notamment dans les axones, empêchant son accumulation excessive dans les endosomes (Ubelmann et al 2017). À l'inverse, la perte de fonction de BIN1, qu'elle résulte d'une invalidation (Miyagawa et al 2016) ou de mutations associées à la MA (Perdigão et al 2021), exacerbe l'activité amyloïdogène et provoque une accumulation d'A β ⁴² associée à une augmentation de la taille des endosomes précoces.

Sur le plan *in vivo*, l'impact de BIN1 sur les dépôts amyloïdes a été exploré dans des modèles murins. Récemment, des souris 5xFAD (modèle de plaques A β agressif) portant un variant codant rare de BIN1 potentiellement associé à un risque accru de MA (mutation K358R sur l'isoforme 1) ont présenté une charge de plaques amyloïdes significativement augmentée par rapport aux témoins 5xFAD classiques (García-Aguado et al 2024). Ce variant BIN1 a

également modifié la réaction gliale autour des plaques, avec une moindre activation des astrocytes et des microglies en périphérie des dépôts (García-Aguado et al 2024). Cela pourrait refléter une diminution de la clairance des peptides A β par la glie en l'absence d'une activation gliale adéquate. À l'inverse, une autre étude n'a pas mis en évidence d'augmentation de la charge amyloïde ni d'altération majeure des phénotypes A β dans des modèles murins APP (Andrew et al 2019). Mis en regard des données récentes (García-Aguado et al 2024), cela souligne qu'il persiste un débat sur le rôle de BIN1 dans la pathologie amyloïde, vraisemblablement dépendant du contexte expérimental (nature de l'altération de BIN1, isoforme ciblée, modèle, âge et fond génétique) et des cellules impliquées (notamment la glie).

Pris ensemble, ces résultats soulignent que l'impact de BIN1 sur l'axe amyloïde demeure contextuel et encore débattu : si le variant rare K358R peut amplifier les dépôts A β et remodeler la réactivité gliale *in vivo*, le consensus reste à établir quant à la portée de ce mécanisme dans la MA humaine. En l'état des preuves supplémentaires, l'association du locus BIN1 avec la maladie semble s'exercer préférentiellement dans la physiopathologie de la protéine Tau, plutôt que par une modulation franche du métabolisme d'APP.

Interactions de BIN1 avec la pathologie Tau

Le lien entre BIN1 et la protéine Tau, l'autre lésion centrale de la MA, a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années, mais il a été établi pour la première fois dans une étude pionnière du laboratoire (Chapuis et al 2013). En combinant analyses génétiques, transcriptomiques et fonctionnelles, l'étude a démontré que les variants à risque du locus BIN1 modulent l'expression de BIN1 dans le cerveau humain et que cette modulation est spécifiquement corrélée à la charge en Tau, indépendamment des dépôts amyloïdes. Cette découverte a constitué un tournant majeur, positionnant BIN1 comme le premier facteur de risque génétique de la MA à être directement relié à la pathologie Tau, et a ouvert la voie aux travaux ultérieurs cherchant à déchiffrer les bases moléculaires de l'interaction BIN1-Tau (Chapuis et al 2013).

Sur le plan moléculaire, BIN1 interagit physiquement avec Tau : le domaine SH3 de BIN1 peut se lier aux motifs PXXP présents dans la région riche en proline de Tau, établissant un complexe BIN1-Tau (Sottejeau et al 2015, Lasorsa et al 2018). Cette interaction directe est finement régulée par des modifications post-traductionnelles. En particulier, la phosphorylation de Tau sur des résidus clés liés à la MA comme la Thr231 diminue son affinité pour le domaine SH3 de BIN1 (Sottejeau et al 2015). Réciproquement, BIN1 lui-même peut subir une phosphorylation notamment sur sa Thr348 qui influence sa conformation : à l'état non phosphorylé, BIN1 adopte une conformation « fermée » où son domaine SH3 interagit au

niveau intramoléculaire avec son propre domaine CLAP; la phosphorylation en Thr348 ouvrirait BIN1 et rendrait son SH3 plus disponible pour lier Tau (Sartori et al 2019). Ainsi, l'association BIN1-Tau est soumise à une double régulation par phosphorylation, l'une sur Tau, l'autre sur BIN1, qui peut modifier la stabilité du complexe (Sottejeau et al 2015, Sartori et al 2019).

Dans les cerveaux de patients MA, on observe effectivement une altération de la distribution de BIN1 et de Tau : BIN1 tend à se relocaliser hors du compartiment neuronal somato-dendritique, tandis que Tau hyperphosphorylée s'accumule de manière inappropriée jusque dans les terminaisons synaptiques (Glennon et al 2020). La dissociation du complexe BIN1-Tau due aux modifications pathologiques pourrait ainsi libérer Tau et favoriser sa toxicité, en particulier au niveau des synapses où Tau anormal perturbe la fonction neuronale.

Des expériences fonctionnelles soutiennent le rôle modulateur de BIN1 vis-à-vis de Tau. Une invalidation de BIN1 dans des neurones en culture entraîne l'accumulation de Tau phosphorylée aux synapses et perturbe la morphologie des épines (Glennon et al 2020). Par ailleurs, des manipulations de BIN1 modulent le trafic postsynaptique (Rab11/Arf6, AMPAR) et la morphologie d'épines (Schürmann et al 2019). De plus, la réduction de BIN1 diminue la libération extracellulaire de Tau par les neurones, tandis que sa surexpression augmente la sécrétion de Tau via vésicules et exacerbe la charge en Tau *in vivo* (PS19) (Crotti et al 2019, Glennon et al 2020). Ceci indique que BIN1 pourrait faciliter l'export physiologique de Tau hors des neurones via les exosomes par exemple, et qu'en son absence Tau s'accumule à l'intérieur des cellules.

Au-delà de la cellule, BIN1 peut également influencer la propagation intercellulaire des agrégats de Tau à travers le cerveau. Dans des modèles cellulaires neuronaux, la diminution de BIN1 accélère la propagation de Tau pathologique, tandis que sa surexpression la freine (Calafate et al 2016). Le mécanisme proposé implique le contrôle de l'endocytose : en temps normal, BIN1 exerce un effet limitant sur l'endocytose, ce qui restreint l'internalisation d'oligomères extracellulaires de Tau. En cas de déficit en BIN1, ce frein saute et les neurones internalisent plus efficacement les oligomères/fibrilles de Tau extracellulaires, qui peuvent ensuite échapper des endosomes et déclencher la nucléation de Tau pathologique endogène dans la cellule receveuse (Calafate et al 2016). Par ailleurs, BIN1 peut aussi promouvoir la dissémination de Tau via les vésicules extracellulaires. Des expériences ont montré que la surexpression de BIN1 augmente la sécrétion de Tau sous forme exosomale en culture et aggrave la charge en Tau pathologique *in vivo* chez des souris transgéniques exprimant une Tau mutée (PS19) (Crotti et al 2019). À l'inverse, l'invalidation spécifique de BIN1 dans les microglies de souris PS19 réduit significativement la libération de Tau associé aux exosomes

in vitro, et diminue la propagation de Tau agrégé dans le cerveau des souris (Crotti et al 2019). Ces observations soulignent un rôle de BIN1 dans la progression des enchevêtrements neurofibrillaires : d'un côté, BIN1 neuronal protège peut-être la synapse en empêchant Tau pathologique de s'y accumuler et en freinant l'entrée de Tau extérieur. De l'autre, BIN1 notamment exprimé par la glie favorise la dissémination de Tau en facilitant sa sortie cellulaire dans des vésicules. Le bilan net de ces effets interdépendants de BIN1 sur la pathologie Tau reste complexe. Il pourrait dépendre du type cellulaire considéré, du type d'isoforme exprimé et du stade de la maladie. Il est en tout cas admis aujourd'hui que la contribution de BIN1 à la MA passe essentiellement par l'axe Tau plutôt que par l'axe amyloïde, hypothèse confortée par de récents travaux en génétique humaine qui retrouvent une association de *BIN1* avec d'autres tauopathies comme la démence à corps de Lewy plutôt qu'avec des pathologies amyloïdes isolées (Dourlen et al 2025).

Rôle de BIN1 dans l'activation gliale et l'inflammation

La neuroinflammation chronique est un facteur important dans la MA, caractérisée notamment par l'activation soutenue des microglies et des astrocytes entourant les plaques amyloïdes et les neurones en souffrance. BIN1, longtemps ignoré dans ce contexte, émerge aujourd'hui comme un modulateur potentiel de la réponse gliale dans la MA. En effet, un certain nombre de gènes de risque de la MA (*TREM2*, *CD33*, *CR1*, etc.) agissent dans les microglies; BIN1 pourrait s'inscrire dans ce réseau de régulation immunitaire bien que son rôle exact reste à préciser. Des études récentes indiquent que BIN1 est nécessaire à l'établissement d'un profil pro-inflammatoire complet dans les microglies activées. Par exemple, l'inhibition de BIN1 par siRNA dans des cultures primaires de microglies de souris compromet fortement la capacité de ces cellules à produire des cytokines inflammatoires en réponse à un stimulus (Sudwarts et al 2022). En l'absence de BIN1, les microglies stimulées présentent une hyporéactivité : l'expression de nombreux gènes inflammatoires (*IL-1 β* , *TNF α* , *IL-6*, etc.) normalement induits est significativement réduite. De même, chez des souris génétiquement modifiées pour ne pas exprimer BIN1 spécifiquement dans les microglies, une stimulation par le LPS provoque une réaction atténuée par rapport aux souris contrôles (Sudwarts et al 2022). Ces données indiquent que BIN1 est requis pour qu'une microglie adopte un état pleinement activé et pro-inflammatoire en situation de stress immunitaire. Lorsque BIN1 fait défaut, la signature transcriptionnelle de la microglie stimulée demeure plus proche d'un état homéostatique qu'elle ne le serait normalement (Sudwarts et al 2022). Sur le plan mécanistique, la perte de BIN1 s'accompagne d'une diminution de l'expression de facteurs de transcription maîtres tels que PU.1 et IRF1, connus pour piloter le programme inflammatoire microglial (Sudwarts et al 2022). Des analyses de co-expression et de réseaux relient BIN1 à des modules

transcriptionnels impliqués dans la MA : les modules microgliaux dominés par TYROBP/TREM2/APOE (Zhang et al 2013, Mostafavi et al 2018) montrent des connexions fonctionnelles avec des modules non microgliaux où BIN1 est enrichi notamment la myéline et les oligodendrocytes, suggérant des interactions inter-modules pertinentes pour la pathologie (McKenzie et al 2017, Dourlen et al 2025). À la différence de TREM2 dont la présence amplifie la réponse inflammatoire, BIN1 apparaît plutôt comme un facteur permissif indispensable à l'établissement de la réponse. Ainsi, un déficit en BIN1 pourrait conduire à une neuroinflammation altérée ou inefficace, possiblement délétère en empêchant les microglies de réagir adéquatement aux dépôts amyloïdes ou de phagocyter les débris neuronaux (Sudwarts et al 2022, Gao et al 2023, Dourlen et al 2025).

Les astrocytes pourraient également voir leur réactivité modulée par BIN1. L'étude du variant BIN1(K358R) mentionnée plus haut a montré, chez les souris 5xFAD, une réduction notable de la réaction astrocytaire autour des plaques amyloïdes. En présence du variant à risque, les astrocytes étaient moins nombreux ou moins hypertrophiés au contact des dépôts, malgré une charge amyloïde plus élevée. Fait surprenant, cette moindre activation gliale s'est accompagnée d'un taux réduit de neurodégénérescence et une meilleure préservation des synapses que les 5xFAD standard (García-Aguado et al 2024). Aussi, dans des cerveaux humains de la MA, une sous-population d'astrocytes qui exprime des isoformes neuronales de BIN1 est significativement réduite, et cette diminution corrèle positivement avec la charge en Tau phosphorylée (Taga et al 2020).

Pris ensemble, ces éléments soutiennent que BIN1 agit comme un régulateur fin de l'immunité cérébrale : il est requis pour l'établissement d'une activation microgliale efficace, tandis que des variations d'expression ou d'isoformes dans la glie s'alignent avec la charge en Tau et des altérations de l'homéostasie globale (Sudwarts et al 2022, Taga et al 2020, Dourlen et al 2025).

Influence de BIN1 sur la fonction et la survie synaptiques

La perte progressive des synapses est le corrélat le plus étroit du déclin cognitif dans la MA. Les altérations de BIN1 décrites ci-dessus pourraient contribuer directement à cette dégénérescence synaptique, de plusieurs façons. Premièrement, des études récentes soulignent que BIN1 joue un rôle particulièrement important dans les synapses GABAergiques inhibitrices. En effet, l'invalidation de BIN1 dans des cultures neuronales entraîne une réduction du nombre de synapses inhibitrices fonctionnelles ce qui provoque en compensation une augmentation de la libération de GABA par les synapses restantes, du fait de l'accélération du cycle exocytose–endocytose de leurs vésicules (Barata et al 2025). Plus précisément, en absence de BIN1, les vésicules synaptiques contenant le transporteur vésiculaire GABA

(vGAT) sont recyclées et exocytées plus rapidement qu'à la normale, ce qui aboutit à une diminution de la taille des endosomes recyclants dans les terminaisons GABAergiques et, à terme, à un épuisement de ces synapses (Barata et al 2025). Dans les synapses glutamatergiques excitatrices, la perte de BIN1 perturbe également la physiologie vésiculaire, quoique de manière plus modérée où l'on observe par exemple une réduction de l'exocytose de vésicules à glutamate VGLUT1 (Barata et al 2025). Les conséquences fonctionnelles d'une telle dérégulation diffèrent selon le type de synapse : dans les circuits inhibiteurs, la disparition progressive de synapses GABAergiques induite par BIN1 cause un déséquilibre synaptique au profit d'une hyperexcitabilité neuronale. En culture et chez la souris, un déficit en BIN1 se traduit par une élévation du calcium basal intra-neuronal et une augmentation de la fréquence de décharge spontanée, signes d'hyperactivité résultant de la levée de l'inhibition (Saha et al 2024). L'hyperactivité neuronale est un phénomène documenté dans les stades précoces de la MA et peut contribuer à la surcharge de l'activité cérébrale et des réseaux excitateurs. D'autre part, BIN1 semble également important pour le maintien des synapses excitatrices elles-mêmes. Des souris avec une perte de fonction conditionnel de BIN1 restreint aux neurones montrent, en vieillissant, une diminution de la densité des synapses excitatrices de l'hippocampe, associée à un défaut de libération de glutamate et à des altérations de l'ultrastructure pré-synaptique (De Rossi et al 2020). Par exemple, l'absence de BIN1 dans les neurones entraîne une baisse de la probabilité de relargage des vésicules synaptiques, de sorte qu'un nombre accru de vésicules restent bloquées dans la réserve, signe d'un frein partiel de l'exocytose. *In vivo*, ces anomalies se traduisent par des troubles de la mémoire spatiale chez la souris (De Rossi et al 2020). Ainsi, dans la MA, on peut envisager que des altérations de BIN1 favorisent la perte synaptique via plusieurs mécanismes convergents : facilitation de la toxicité de Tau aux synapses, induction d'hyperactivité excitatrice délétère, et inefficacité de la neurotransmission soutenue menant à un déclin des réseaux neuronaux. Afin de replacer ces données dans un cadre plus large, j'ai compilé dans le tableau suivant les principales études ayant exploré les fonctions de BIN1 dans différents modèles expérimentaux (Figure 9).

En résumé, BIN1 émerge comme un acteur multifonctionnel au carrefour des voies pathogéniques de la MA. Ses dysfonctionnements peuvent concourir à plusieurs lésions clés de la MA : favoriser l'accumulation d'A β , moduler la propagation et la toxicité de Tau, influencer sur l'activation gliale et le profil neuroinflammatoire et compromettre l'intégrité des synapses. Il est notable que ces effets ne sont pas indépendants les uns des autres mais possiblement interconnectés.

Références	Espèces	Manipulation
Müller et al 2003	Souris	cKO
létalité péri-/néonatale avec cardiomyopathie et myofibrilles ventriculaires désorganisées		
Nicot et al 2007	Humain	Identifications génétiques
Identification initiale de mutations de BIN1 chez des patients CNM récessive. interaction BIN1-DNM2 altérée (SH3) et défauts des tubules T, établissant le rôle pathogène de BIN1 et une voie commune avec DNM2		
Chapuis et al 2013	Humain / Drosophile	BIN1 section post-mortem et surexpression BIN1 et Amph
L'allèle rs59335482 accroît la transcription de BIN1 et son expression cérébrale (↑ risque MA, OR ≈ 1.2). Chez la drosophile, la réduction d'Amph atténue la toxicité Tau-induite. Interaction et co-localisation BIN1-Tau confirmées dans modèles cellulaires et murins.		
Sottejeau et al 2015	Neurones en culture (in vitro)	Analyses GST/NMR
Interaction directe BIN1-Tau, liaison diminuée quand Tau est phosphorylé en Thr231.		
Calafate et al 2016	Neurones rats	Invalidation et surexpression
La diminution de BIN1 augmente le flux endocytaire, favorise l'internalisation d'agrégats de Tau et accélère leur propagation		
Cowling et al 2017	Souris	KO muscle embryonnaire/adulte
Létalité néonatale type CNM. BIN1 inhibe DNM2 pendant la maturation. Dnm2 ^{+/-} sauve la létalité → balance BIN1-DNM2 cruciale pour les tubules T.		
Andrew et al 2019	Souris	Invalidation de BIN1
Altérations du métabolisme d'Aβ en neurones en culture. Pas d'effet évident in vivo sur la charge amyloïde (modèles APP) ni sur les phénotypes majeurs.		
Crotti et al 2019	Souris	Surexpression BIN1 + KO microglial (PS19 Tau)
La surexpression neuronale de BIN1 amplifie la pathologie Tau, tandis que son invalidation microgliale réduit la libération et la propagation de Tau via les vésicules extracellulaires.		
Schürmann et al 2019	Neurones en culture (in vitro)	Invalidation de BIN1
L'invalidation de BIN1 réduit la transmission AMPA et la présence de GluA1 en surface, traduisant un déficit postsynaptique sans altération présynaptique démontrée.		
Sartori et al 2019	Souris	Surexpression BIN1 dans modèle hTau/PS19

La surexpression de BIN1 aggrave la mémoire à court terme mais préserve la mémoire spatiale/à long terme, empêche la relocalisation somatique de Tau et renforce l'interaction BIN1-Tau via la phosphorylation de BIN1 en Thr348.		
De Rossi et al 2020	Souris	cKO neuronal cortex/hippocampe
BIN1 est localisé aux terminaisons présynaptiques ; son invalidation entraîne un déficit de libération présynaptique aux synapses excitatrices de CA1 et une altération de la mémoire spatiale.		
Prokic et al 2020	Souris	KO constitutif et isoforme-spécifique
Le KO constitutif de BIN1 est léthal néonatal. Chez l'adulte, le muscle basal est préservé mais la délétion de l'exon 11 (isoformes musculaires, domaine PI) altère la régénération et l'organisation des triades.		
Glennon et al 2020	Cortex MA humain + neurones rats	Invalidation de BIN1
Dans le cerveau MA et en neurones primaires, la perte de BIN1 s'accompagne d'une accumulation synaptique de Tau phosphorylée, d'altérations d'épines et d'une libération de Tau diminuée		
Lambert et al 2022	Drosophile / hiNs	Surexpression isoforme-spécifique
BIN1 iso1 est neurotoxique et provoque un dérèglement de la taille des endosomes précoces (iso8/iso9 neutres). Dans les hiNs, le KO BIN1 rétrécit les endosomes (sauvé par iso1, pas iso9) et la surexpression iso1 les agrandit avec augmentation de la mort neuronale.		
Ponnusamy et al 2023	Souris	cKO neurones cortex/hippocampe (PS19 Tau)
La perte de BIN1 atténue la pathologie Tau et l'atteinte synaptique dans l'hippocampe, mais l'aggrave dans le cortex/thalamus avec déclin accéléré et survie réduite, indiquant un effet dépendant des régions.		
García-Agudo et al 2024	Souris	5xFAD croisé avec BIN1 ^{K358R}
Le variant K358R accentue la charge amyloïde et atténue la réactivité astrocytaire et oligodendrocytaire autour des plaques.		

Figure 9. Principaux modèles expérimentaux ayant permis l'étude de BIN1. Résumé des modèles animaux et cellulaires utilisés pour explorer les fonctions et les dérégulations de BIN1. Sont indiqués le type de modèle, la manipulation génétique ou expérimentale, et les principaux phénotypes observés. Ces travaux couvrent à la fois les fonctions musculaires de BIN1 dans les myopathies centronucléaires et ses rôles neuronaux dans les modèles de tauopathie et de maladie d'Alzheimer, en mettant en évidence les contributions isoforme-spécifiques, la dynamique endosomale et les interactions avec Tau.

PTK2B/Pyk2 : une tyrosine kinase au carrefour des signaux synaptiques

PTK2B : Gène et isoformes

Le gène *PTK2B* (protein tyrosine kinase 2 beta) est localisé sur le chromosome 8 (8p21.2) et code une protéine tyrosine kinase non-réceptrice de la famille FAK (Focal Adhesion Kinases)

appelée Pyk2 (Proline-rich tyrosine kinase 2) ou FAK2. La famille FAK comprend FAK1 et FAK2/Pyk2, deux kinases des adhésions focales qui convertissent les signaux d'adhésion et les contraintes mécano-chimiques en réponses intracellulaires en reliant les intégrines et certains récepteurs, notamment couplés aux protéines G, aux voies de signalisation Src, MAPK et à l'organisation de l'actine (Zhao et al 2010, de Pins et al 2021). Pyk2 se distingue particulièrement de FAK1 par son enrichissement et son activité marquée dans les neurones, ainsi que par une activation consécutive à l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire (Lev et al 1995).

Pyk2 est composée d'environ 1000 acides aminés. Le locus *PTK2B* est de grande taille avec plus de 40 exons et produit plusieurs isoformes par épissage alternatif, dont une isoforme majeure de 1009 acides aminés et une variante plus courte d'environ 970 acides aminés (Figure 10). Sur le plan de l'expression, Pyk2 est fortement exprimé dans le système nerveux central, en particulier dans les neurones du cortex cérébral et de l'hippocampe (Xiong et al 1998). Son expression est enrichie dans les neurones du prosencéphale, en particulier au niveau hippocampique et cortical, ce qui est cohérent avec un rôle dans la plasticité et les fonctions cognitives supérieures (Giralt et al 2017, de Pins et al 2021). À côté des neurones, Pyk2 est également exprimé dans les cellules gliales : on le retrouve notamment dans la microglie du cerveau adulte (Tian et al 2000). Des travaux récents ont mis en lumière l'importance de Pyk2 dans les cellules microgliales, où cette kinase participe aux réponses immunitaires cérébrales notamment dans des contextes amyloïde/Tau via la modulation d'états d'activation et de fonctions effectrices comme la phagocytose (Lee et al 2024). Dans les astrocytes, l'expression de *PTK2B* est plus faible que dans les neurones ; néanmoins, Pyk2 est essentielle à leur mobilité lors de la réponse à une lésion du parenchyme cérébral, en contrôlant la dynamique d'actine et la réorganisation cytosquelettique nécessaires à la migration des astrocytes réactifs (Giralt et al 2016). L'ensemble de ces données indique que *PTK2B* est un gène largement exprimé dans le cerveau, avec une distribution prédominante dans les populations neuronales tout en ayant une présence fonctionnelle dans les cellules gliales immunitaires.

En dehors du système nerveux, Pyk2 est également fortement exprimée dans les cellules d'origine hématopoïétique, notamment dans les monocytes/macrophages (Okazaki et al 1997, Duong et al 2000), les lymphocytes T et B (Astier et al 1997, Katagiri et al 2000), les neutrophiles (Fuortes et al 1999) et les plaquettes (Cipolla et al 2013). Dans ces lignées, elle participe à la signalisation des intégrines, à la réorganisation du cytosquelette d'actine et à la migration cellulaire, souvent en coordination ou en redondance partielle avec FAK. Une isoforme hématopoïétique spécifique de Pyk2, dépourvue de certains motifs C-terminaux présents dans la forme neuronale (Figure 10), a été décrite dans les cellules myéloïdes et

contribue à la régulation des adhésions focales, du mouvement amiboïde et des réponses immunitaires (Dikic et al 1998, Xiong et al., 1998, Okigaki et al 2003). Ces fonctions, centrées sur les interactions entre les intégrines, la signalisation calcique et les kinases Src, soulignent la conservation des mécanismes de contrôle d'adhésion et de migration au-delà du tissu neuronal.

Domaines protéiques de Pyk2

La protéine Pyk2, issue du gène *PTK2B*, possède une organisation de domaine similaire à FAK qui conditionne ses fonctions cellulaires (Figure 10). À son extrémité N-terminale, le domaine FERM (Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin) assure à la fois un rôle de ciblage subcellulaire et une fonction auto-inhibitrice, en modulant l'accès du domaine kinase au site d'autophosphorylation. Ce domaine contribue au recrutement de Pyk2 aux membranes et à l'interaction avec des récepteurs transmembranaires, notamment les intégrines, qui ancrent la kinase au sein des complexes d'adhésion (Klingbeil et al 2001, Lietha et al 2007, Loving et al 2019).

Le domaine kinase de Pyk2 constitue le moteur enzymatique de la protéine. Comme pour FAK, son activité tyrosine-kinase est contrôlée par un équilibre entre auto-inhibition et activation, convertissant des signaux mécaniques ou calciques en phosphorylations en cascade sur des cibles intracellulaires. L'activation repose principalement sur la signalisation calcique. Une élévation du Ca^{2+} intracellulaire, notamment via les récepteurs NMDA ou les canaux voltage-dépendants, favorise la liaison Ca^{2+} /calmoduline à un segment du linker entre le domaine kinase et le domaine FAT, induisant la dimérisation et l'autophosphorylation de la Y402 (Lev et al 1995). Dans les neurones, le clustering par PSD-95 (liaison C-terminale riche en prolines) regroupe Pyk2 à la densité post-synaptique et renforce cette autophosphorylation dépendante du Ca^{2+} (Bartos et al 2010, Giralt et al 2017). L'autophosphorylation de Y402 crée un site de liaison de haute affinité pour le domaine SH2 des kinases de la famille Src, permettant la formation d'un complexe Pyk2-Src (Dikic et al 1996). Cette association initie une amplification de la signalisation tyrosine-kinase : Src phosphoryle à son tour les tyrosines Y579 et Y580 dans la boucle d'activation, ainsi que Y881, stabilisant l'état actif de Pyk2 et propageant le signal vers des cibles adjacentes (Blaukat et al 1999, Shi et al 2004)

En C-terminal, le domaine FAT (Focal Adhesion Targeting) joue un rôle clé dans l'ancrage de Pyk2 aux complexes d'adhésion focale et dans la stabilisation de ses interactions intracellulaires. Ce module est essentiel pour positionner Pyk2 à des interfaces critiques où

convergent les signaux d'adhésion, de mécanique et de remodelage cytosquelettique (Vanarotti et al 2014, de Pins et al 2019).

Enfin, les linkers entre ces différents domaines comprennent plusieurs segments riches en prolines qui contiennent des motifs PXXP notés PR1, PR2 et PR3 sur la figure 10. Ceux-ci servent de sites d'interaction avec les protéines à domaine SH3 (Kami et al 2002). Grâce à eux, Pyk2 recrute une grande diversité de partenaires moléculaires, comme l'adaptateur Grb2 (Blaukat et al 1999), la protéine postsynaptique PSD-95, qui stabilise Pyk2 au sein des zones post-synaptiques et module la transmission glutamatergique (Bartos et al 2010). Ces interactions proline-SH3 donnent à Pyk2 un rôle central d'échafaudage, lui permettant de coordonner signalisation calcique, organisation synaptique et dynamique du cytosquelette.

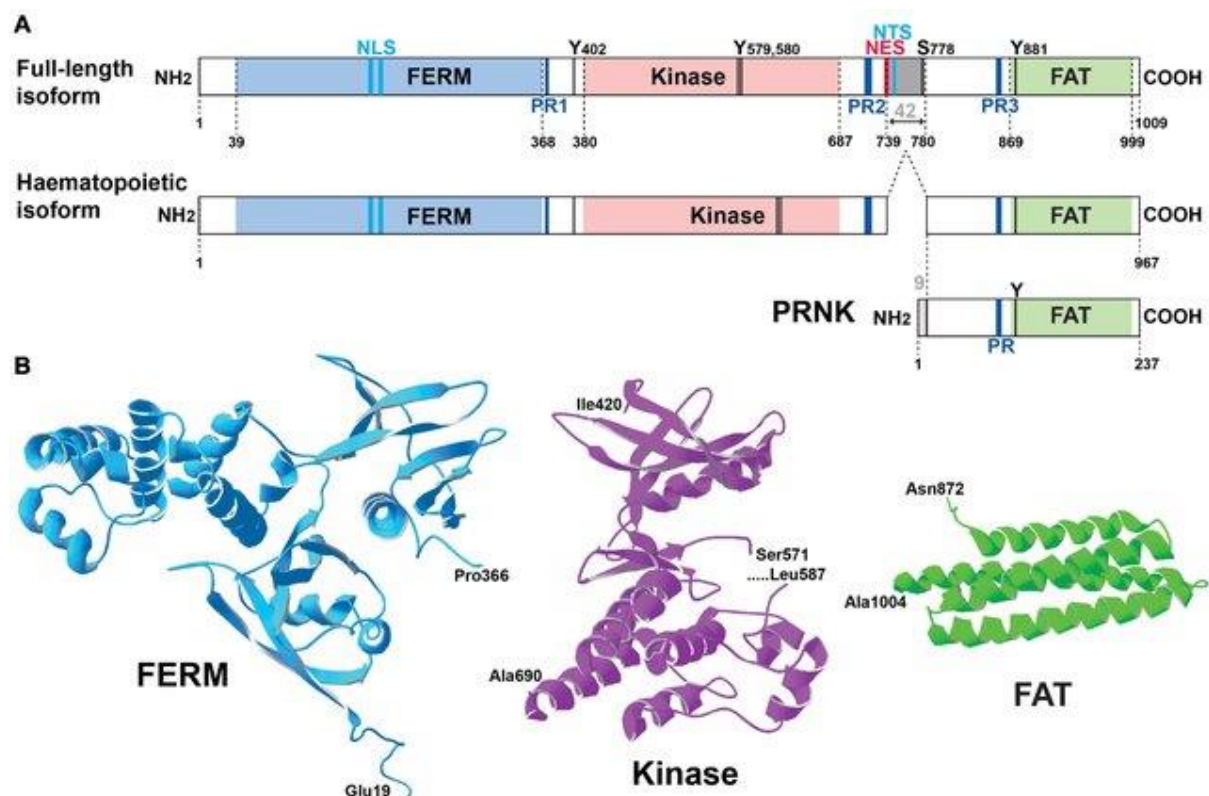


Figure 10. Isoformes de PTK2B et structure des domaines protéiques. A. Schéma des principales isoformes de PTK2B : l'isoforme complète (full-length) et l'isoforme hématopoïétique diffèrent notamment par la longueur de la région C-terminale. Les domaines fonctionnels sont indiqués : domaine FERM contenant un signal de localisation nucléaire (NLS), domaine kinase, domaine FAT (focal adhesion targeting) et régions riches en proline (PR1 et PR2). Des sites de phosphorylation clés (Y402, Y579, Y580, Y881) et motifs de signalisation nucléaire (NTS, NES) sont également représentés. En bas à droite, l'isoforme PRNK (Proline-rich non-kinase), tronquée et dépourvue de domaine kinase, est schématisée. B. Représentation tridimensionnelle des structures cristallographiques des domaines FERM (en bleu), kinase (en violet) et FAT (en vert) de PTK2B (de Pins et al 2019).

Fonctions physiologiques de Pyk2 dans le cerveau

Compte tenu de son profil d'expression neuronal et de ses interactions moléculaires, Pyk2 remplit des fonctions physiologiques cruciales dans le cerveau, notamment au niveau des synapses. Dans les neurones du cortex et de l'hippocampe, Pyk2 est localisé au sein des compartiments post-synaptiques où il participe à la signalisation dépendante des récepteurs NMDA et à la maturation des épines dendritiques (Bartos et al 2010, Giralt et al 2017). Son rôle dans la plasticité synaptique a été mis en évidence par des études fonctionnelles sur des modèles murins. Par exemple, des souris invalidées pour le gène *PTK2B* (souris Pyk2^{-/-}) présentent une transmission synaptique basale et une potentialisation à long terme (LTP) normales, suggérant que Pyk2 n'est pas requis pour les mécanismes élémentaires de la neurotransmission excitatrice (Salazar et al 2019). En revanche, ces souris KO montrent une abolition de la dépression à long terme (LTD) au niveau de l'hippocampe. Cela indique que Pyk2 est nécessaire à certaines formes de plasticité synaptique, en l'occurrence l'induction de la LTD hippocampique (Salazar et al 2019). Ce déficit de LTD en l'absence de Pyk2 s'accompagne de modifications subtiles de la morphologie dendritique : des altérations dans le remodelage des épines dendritiques et de la densité synaptique ont été rapportées (Salazar et al 2019, Giralt et al 2017), cohérentes avec le rôle de Pyk2 dans le couplage entre signaux synaptiques et réorganisation du cytosquelette actine. Par ses effets sur la plasticité synaptique et potentiellement sur la dynamique des épines, Pyk2 contribue ainsi aux bases cellulaires de l'apprentissage et de la mémoire.

Des travaux récents ont permis de réconcilier les observations contradictoires en montrant que l'impact de Pyk2 sur la plasticité dépend du protocole d'induction de la LTP et des modes de recrutement calcique associés (Mastrolia et al 2021). Ainsi, l'activation de Pyk2 favorise la potentialisation induite par des stimulations de haute fréquence (où le flux Ca²⁺ est soutenu et homogène), alors qu'elle devient délétère lors de stimulations de type θ -burst, plus proches des oscillations physiologiques, en exacerbant la désorganisation des épines et la perte de récepteurs glutamatergiques (Mastrolia et al 2021). Ces résultats suggèrent que Pyk2 peut agir comme un commutateur calcique dépendant du contexte d'activité, modulant différemment la plasticité selon la nature du signal synaptique. Ils confortent l'idée que, dans la MA, la dérégulation spatio-temporelle de l'activation de Pyk2 constitue un déterminant central de la vulnérabilité synaptique (Mastrolia et al 2021).

Parallèlement, d'autres modèles expérimentaux soutiennent l'importance de Pyk2 dans les fonctions cognitives. Alors que l'absence de Pyk2 n'entraîne pas de déficit cognitif majeur en conditions basales et peut même améliorer certaines performances par exemple la mémoire de peur contextuelle, les effets apparaissent dépendre du type de tâche et des protocoles

utilisés, comme l'illustrent des altérations sélectives de mémoire spatiale et une sensibilité au mode d'induction de la plasticité dans l'hippocampe dorsal des souris Pyk2^{-/-} (Mastrolia et al 2022, Zheng et al 2022). Dans le sens inverse, une surexpression de Pyk2 restreinte à l'hippocampe accroît l'efficacité synaptique et améliore des performances mnésiques dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer, renforçant l'idée que des variations d'expression/activité de Pyk2 modulent la cognition selon le contexte (Giral et al 2018). Ces résultats rejoignent l'idée que Pyk2 agit comme un facilitateur de la plasticité structurelle et fonctionnelle des synapses. Au-delà de son rôle post-synaptique, Pyk2 peut soutenir la survie neuronale en activant des voies trophiques. D'une part, l'élévation de Ca²⁺ déclenche l'axe Pyk2 → ERK/CREB, déjà mis en évidence dans des préparations neuronales (Yao et al 2009). D'autre part, selon le contexte, Pyk2 peut aussi contribuer à l'activation de PI3K/Akt, comme montré par l'association fonctionnelle de Pyk2 avec la sous-unité p85-PI3K et l'impact de sa déficience sur la signalisation PI3K (Chapman et al 2015). Ainsi, Pyk2 contribue à la résistance des neurones au stress et au remodelage synaptique en réponse à l'activité. Enfin, au-delà du compartiment neuronal, Pyk2 participe aux fonctions gliales cérébrales. Dans la microglie, son activation régule la motilité et la phagocytose des prolongements microgliaux en réponse aux signaux de l'environnement neuronal (Lee et al 2024). Ceci indique que Pyk2 assure une coordination neuro-gliale, en modulant à la fois la plasticité synaptique et l'état réactif des cellules immunitaires du cerveau. L'ensemble de ces observations place PTK2B/Pyk2 comme un régulateur clé de l'homéostasie synaptique et des processus neurobiologiques sous-tendant la mémoire.

PTK2B et la maladie d'Alzheimer

Implication de PTK2B dans la pathologie amyloïde

Pyk2 est aujourd'hui reconnu comme un intermédiaire clé dans les effets neurotoxiques de l'Aβ. Des études fonctionnelles montrent que l'activation aberrante de Pyk2 par les oligomères Aβ initie des cascades délétères dans le neurone, menant à une dysfonction synaptique. En effet, une étude a démontré que des souris dépourvues de Pyk2 sont protégées contre la toxicité synaptique induite par Aβ. *In vitro*, l'absence de Pyk2 empêche la suppression de la LTP normalement provoquée par des oligomères Aβ, et *in vivo*, des souris APP/PS1 Pyk2^{-/-} conservent une densité de synapses et des performances mnésiques intactes malgré la charge amyloïde (Salazar et al 2019). Fait notable, la délétion de Pyk2 n'affecte ni l'accumulation de plaques amyloïdes ni la réactivité gliale chez ces animaux, ce qui indique que la protection provient d'une interruption des signaux toxiques en aval d'Aβ plutôt que d'une réduction des dépôts (Salazar et al 2019). Autrement dit, la présence de Pyk2 est requise pour

que les signaux A β perturbent la plasticité synaptique et la mémoire, en induisant par exemple l'hyperphosphorylation de protéines synaptiques et la perte de récepteurs glutamatergiques au niveau des dendrites (Salazar et al 2019). Une étude de notre équipe a aussi montré, dans un modèle microfluidique reproduisant les contacts synaptiques exposés à A β , que la surexpression post-synaptique de Pyk2 prévient la perte de connectivité induite par A β et maintient l'intégrité des marqueurs PSD-95/Homer1 (Kilinc et al 2020). Ce résultat établit que Pyk2 peut agir localement comme un facteur de stabilisation synaptique sous stress amyloïde. Parallèlement, une autre étude a rapporté que la surexpression de Pyk2 dans le cerveau de souris modèles APP améliore la transmission synaptique et les performances cognitives, suggérant que dans le contexte pathologique, l'activité de Pyk2 peut être inadéquate ou dérégulée (Giralt et al 2018). Ce résultat paradoxal indique que Pyk2 joue un rôle complexe vis-à-vis de l'A β : tout en médiant la signalisation amyloïde toxique, un déficit local de son activation pourrait également contribuer à la vulnérabilité des synapses sous le stress A β (Salazar et al 2019, Giralt et al 2018, de Pins et al 2019).

Interactions de PTK2B avec la pathologie Tau

Un premier lien fonctionnel entre PTK2B et la toxicité de Tau a été mis en évidence par le laboratoire à l'aide du modèle de l'œil rugueux de Drosophile (Dourlen et al 2017). Dans ce crible génétique systématique des gènes à risque identifiés par GWAS, l'inactivation de l'orthologue de PTK2B appelé Fak atténue significativement la dégénérescence induite par Tau dans ce modèle, indiquant que PTK2B/Fak agit comme modulateur négatif de la toxicité tau-dépendante. Cette observation, confirmée avec différentes lignées exprimant Tau, démontre que l'effet protecteur est robuste et spécifique, positionnant PTK2B comme un acteur clé en aval de Tau dans les processus de vulnérabilité neuronale (Dourlen et al 2017).

Les études qui ont suivi propose que Pyk2 pourrait constituer un pivot reliant les deux lésions cardinales de la MA : l'agrégation d'A β activerait Pyk2, lequel déclencherait à son tour des voies favorisant la hyperphosphorylation et l'agrégation de Tau (Lee et al 2019, Li & Götz 2018, de Pins et al 2021). Cette hypothèse s'appuie sur l'idée qu'une activation chronique de Pyk2 en réponse à la pathologie amyloïde pourrait moduler indirectement l'activité des kinases de Tau dans les neurones. Par ailleurs, des travaux expérimentaux suggèrent une influence directe de Pyk2 sur Tau. Par exemple, une étude a observé *in vitro* qu'une activation accrue de Pyk2 peut intensifier la phosphorylation de Tau via des kinases comme GSK3 β (Brody et al 2022). Cependant, de manière surprenante, ces mêmes auteurs ont montré dans un modèle murin de tauopathie PS19 exprimant la protéine Tau mutée P301S que l'élimination de Pyk2

aggrave la pathologie Tau : les souris $Pyk2^{-/-}$ présentent une augmentation de la phosphorylation et de l'accumulation de Tau, accompagnée d'une perte synaptique exacerbée et d'un déclin cognitif plus sévère par rapport aux témoins (Brody et al 2022). Ce résultat indique qu'en conditions chroniques de tauopathie, Pyk2 endogène exerce un effet modérateur sur les anomalies Tau, possiblement en freinant certaines cascades pro-Tau par exemple via la régulation négative de kinases telles que LKB1 ou p38 MAPK (Brody et al 2022). Ainsi, Pyk2 semble jouer un rôle dual vis-à-vis de Tau : d'un côté, il pourrait contribuer à la cascade pathogénique menant à l'hyperphosphorylation de Tau notamment en présence d'amyloïde et d'une neuroinflammation associée, de l'autre, il jouerait dans les neurones un rôle compensateur limitant les excès de phosphorylation de Tau. Cette double facette souligne la complexité de l'implication de Pyk2 dans la tauopathie de la MA, dépendant du contexte cellulaire et temporel.

Rôle de PTK2B dans l'inflammation

Au-delà des neurones, Pyk2 intervient dans la composante neuro-inflammatoire de la MA via son expression dans la microglie. La microglie activée s'accumule autour des plaques amyloïdes, et il a été montré que l'exposition au peptide A β induit une augmentation de l'activation de Pyk2 dans ces cellules immunitaires cérébrales (Lee et al 2024). Pyk2 y module alors divers aspects de la réponse microgliale. D'une part, son activation contribue à la signalisation pro-inflammatoire : des microglies exprimant Pyk2 activé libèrent davantage de cytokines pro-inflammatoires et peuvent entretenir un état réactif délétère pour le tissu neural environnant (Lee et al 2024). D'autre part, Pyk2 influence les fonctions motrices et phagocytaires de la microglie. Par exemple, l'inhibition pharmacologique de Pyk2 augmente la migration des microglies vers les dépôts amyloïdes et renforce leur capacité de phagocytose de l'A β , tout en réduisant la production de médiateurs inflammatoires (Lee et al 2024). Ce résultat suggère que l'activité de Pyk2 favorise normalement un phénotype microglial moins phagocytaire et plus inflammatoire, et qu'en la bloquant on peut au contraire orienter la microglie vers une action nettoyante accrue et une moindre neuroinflammation (Lee et al 2024). Ainsi, dans la MA, Pyk2 pourrait contribuer à un cercle vicieux neuro-inflammatoire : activée par les agrégats amyloïdes, la microglie via Pyk2 produit des facteurs pro-inflammatoires qui aggravent les lésions neuronales et peuvent même, par diffusion de ces signaux, exacerber la pathologie Tau dans les neurones voisins (Lee et al 2024). L'implication de Pyk2 dans la microglie illustre comment un facteur génétique de susceptibilité peut agir à l'interface des cascades amyloïde et Tau en modulant la réponse immunitaire cérébrale.

Influence de PTK2B sur la perte synaptique

La perte progressive des synapses est un corrélat majeur du déclin cognitif dans la MA, et Pyk2 s'impose comme un régulateur critique de la stabilité et de la vulnérabilité synaptique face aux stress pathologiques. Comme expliqué précédemment, en conditions physiologiques, Pyk2 participe au maintien de l'homéostasie synaptique et de la plasticité. À ce titre, la position centrale de Pyk2 au sein des complexes d'adhésion via ses interactions avec les intégrines et l'échafaudage paxilline/taline (Vanarotti et al 2014) médiées par le domaine FAT en fait un nœud de contrôle mécano-chimique régulant la stabilité structurelle et fonctionnelle des épines dendritiques (Giralt et al 2017, de Pins et al 2021). Par son activation dépendante du calcium, il orchestre le remodelage du cytosquelette d'actine et la distribution des récepteurs post-synaptiques, ce qui est essentiel pour l'expression de certaines formes de plasticité à long terme (Bartos et al 2010, Giralt et al 2017). Dans un contexte pathologique, cette fonction de Pyk2 devient un enjeu double : un dérèglement de son activité peut à la fois permettre les dégâts causés par les toxines amyloïdes et affaiblir les mécanismes de défense synaptiques. Comme discuté précédemment, la signalisation excessive via Pyk2 médiée par A β conduit à des modifications synaptiques délétères avec la perte d'épines dendritiques, le retrait de récepteurs NMDA/AMPA et un dysfonctionnement de la potentiation qui rendent les synapses particulièrement vulnérables (Bartos et al 2010, Salazar et al 2019). Le fait que l'élimination de Pyk2 protège les synapses de ces influences toxiques souligne à quel point cette kinase sert de relais aux effets délétères de l'A β sur la connectivité synaptique. En parallèle, des indices suggèrent qu'un déficit d'activation de Pyk2 dans les synapses affectées pourrait aussi contribuer à la vulnérabilité : en rétablissant l'activité de Pyk2 dans un modèle murin Alzheimer, on parvient à restaurer en partie la fonction synaptique et les capacités de mémoire (Giralt et al 2018). Cela suggère qu'une sous-activation de Pyk2, par exemple due à un stress chronique ou à des altérations de sa localisation, pourrait priver la synapse de signaux trophiques nécessaires, la rendant moins résistante aux agressions pathologiques. Dans cette continuité, une étude utilisant un système microfluidique isolant les synapses de neurones hippocampiques de rat a montré que la surexpression postsynaptique de Pyk2 protège de la synaptotoxicité induite par A β , confortant l'idée d'un rôle local protecteur de Pyk2 à la synapse (Kilinc et al 2020). De la même manière que pour BIN1, le tableau suivant synthétise les travaux majeurs consacrés à PTK2B, en mettant en parallèle les modèles utilisés et les principaux phénotypes décrits (Figure 11).

En somme, Pyk2 apparaît comme un déterminant majeur de la résilience synaptique. Son dysfonctionnement, qu'il s'agisse d'une hyperactivation incontrôlée par l'A β ou au contraire d'une activité insuffisante dans les synapses en souffrance, contribue directement à la

dégénérescence synaptique caractéristique de la MA. Cette compréhension positionne Pyk2 comme une cible potentielle dans l'optique de préserver ou restaurer les synapses : moduler son activité pourrait permettre de contrer à la fois les signaux neurotoxiques amyloïdes et le déficit de plasticité observé au cours de la maladie (Salazar et al 2019, de Pins et al 2021).

Références	Espèces	Manipulation
Bartos et al 2010	Souris	Tranche hippocampe <i>ex vivo</i>
Le Ca ²⁺ via NMDAR recrute/autophosphoryle Pyk2 au poste-synapse (clustering avec PSD-95), reliant l'entrée calcique à la signalisation tyrosine.		
Dourlen et al 2017	Drosophile	Invalidation/surexpression + Tau
PTK2B module la toxicité de Tau in vivo (interaction génétique robuste œil/aile), identifiant PTK2B comme modulateur fonctionnel des loci GWAS MA.		
Giralt <i>et al</i> 2017	Souris	cKO et R6/1 + AAV-Pyk2
Déficits marqués de mémoire spatiale et de LTP CA1, avec altérations NMDAR/PSD-95/épines. Dans R6/1, Pyk2 est réduit dans l'hippocampe. Sa restauration locale par AAV améliore les marqueurs synaptiques et la mémoire.		
Giralt <i>et al</i> 2018	Souris	KO x 5xFAD et surexpression
L'absence de Pyk2 n'apporte pas de bénéfice cognitif. La surexpression hippocampique de Pyk2 rétablit l'autophosphorylation, améliore les marqueurs synaptiques et la mémoire, malgré une légère hausse de plaques.		
Salazar <i>et al</i> 2019	Souris	APP/PS1 x Pyk2 ^{-/-}
Pyk2 ^{-/-} protège la LTP de l'effet des oligomères d'Aβ et, in vivo, empêche perte synaptique et déficits de mémoire sans effet sur Aβ ni gliose, indiquant un rôle spécifique de Pyk2 dans la dysfonction synaptique induite par Aβ.		
Lee <i>et al</i> 2019	Neurones souris	Biochimie et imagerie cellulaire
Pyk2 postsynaptique inhibe Graf1c, active RhoA et déclenche la perte d'épines induite par Aβ; l'effet requiert l'activité kinase de Pyk2 et sa surexpression diminue la densité d'épines.		
Kilinc et al 2020	Neurones rats	Surexpression + oligomères d'Aβ
La surexpression de Pyk2 spécifiquement dans le compartiment post-synaptique protège contre la synaptopathie induite par les oligomères d'Aβ.		
Mastroia <i>et al.</i> , 2021	Souris	Pyk2 ^{-/-} + Délétion ciblée de Pyk2 dans CA1 dorsal + sauvatage

Déficit de mémoire spatiale corrigé par réexpression de Pyk2 dans l'hippocampe dorsal. La délétion CA1 reproduit le phénotype. La LTP CA1 est altérée avec SHF, mais normale avec STB, clarifiant les divergences antérieures et montrant une dépendance au protocole d'induction.		
Brody <i>et al.</i> , 2022	Souris & iPSC	Tau ^{P301S} (PS19) x Pyk2 ^{-/-}
L'absence de Pyk2 accroît la phosphorylation/agrégation de Tau, la perte synaptique avec C1q, aggrave les déficits mnésiques et réduit la survie. Le profil de signalisation implique la désinhibition de LKB1 et p38/MAPK. En iPSC, l'inhibition de Pyk2 ne montre pas d'effet pro-Tau convaincant, suggérant un rôle globalement protecteur de Pyk2 <i>in vivo</i> .		
López-Molina <i>et al</i> 2024	Souris	cKO dans les neurones hippocampiques + Surexpression dans CA1
La réduction de Pyk2 en CA1 diminue dominance et agressivité, tandis que sa surexpression altère des comportements sociaux. Chez des patients schizophrènes, Pyk2 est augmenté en CA1 avec des signatures mitochondriales associées.		
Lee et al 2024	Souris (microglie)	Inhibition pharmacologique de Pyk2 + Aβ
L'inhibition de Pyk2 induit une multinucléation microgliale associée à une phagocytose accrue et une inflammation atténuée, suggérant un levier pour la clairance d'Aβ.		

Figure 11. Modèles expérimentaux de PTK2B et principaux phénotypes associés. Présentation des modèles animaux, cellulaires et microgliaux utilisés pour caractériser les rôles de Pyk2 dans le cerveau. Les études listées explorent les fonctions physiologiques de PTK2B dans la plasticité synaptique et la mémoire, ainsi que son implication dans la pathogénie amyloïde, tau et neuro-inflammatoire de la maladie d'Alzheimer. Chaque ligne précise le type de modèle, la manipulation génétique ou pharmacologique, et les principaux effets observés.

L'étude conjointe de BIN1 et PTK2B met en évidence des rôles complémentaires dans la régulation synaptique et la pathologie de la MA. Pour en comprendre les bases mécanistiques, un modèle génétique *in vivo* est indispensable. La Drosophile, déjà utilisée avec succès pour relier les gènes de risque Alzheimer à la toxicité de Tau, offre un cadre expérimental puissant pour disséquer ces interactions (Chapuis et al 2013, Dourlen et al 2017). Ces travaux pionniers ont mis en évidence l'intérêt et confirmé l'efficacité du modèle drosophile pour ce type d'investigation. C'est dans cette continuité que nous avons choisi de l'employer à nouveau dans le cadre de ce projet de thèse.

Comme présenté précédemment, à partir des travaux sur *BIN1* et sur *PTK2B* (Chapuis et al 2013, Dourlen et al 2017, Lambert et al 2022), nous pouvons remarquer l'utilisation d'un modèle *in vivo* original, le modèle de la Drosophile, en plus du modèle *in vivo* de la souris. Dans le cadre de ce travail de thèse, en complément du modèle de culture primaire de neurones hippocampiques de rat, j'ai choisi d'employer de nouveau le modèle de la Drosophile, que je présente ci-dessous.

La Drosophile

La drosophile (*Drosophila melanogaster*) est un petit insecte holométabole de l'ordre des diptères, mesurant environ 2 à 3 mm, dont le cycle de vie rapide (une dizaine de jours à 25 °C) et la forte fécondité (une centaine de descendants par femelle) en font un organisme modèle privilégié pour les études génétiques. La drosophile dispose d'un vaste ensemble d'outils génétiques, comprenant des lignées mutantes et transgéniques ainsi que des systèmes d'expression spatio-temporelle contrôlée et de suppression ciblée, qui permettent de moduler finement l'expression des gènes *in vivo*. Environ 70 % des gènes humains impliqués dans des maladies possèdent un orthologue chez la drosophile, ce qui explique son large emploi dans la modélisation de pathologies humaines, notamment neurodégénératives (Reiter et al 2001). Grâce à la conservation des voies de signalisation neuronales et à la simplicité de son système nerveux bien cartographié, la drosophile est devenue un modèle majeur en neurobiologie fonctionnelle et comportementale. Sa jonction neuromusculaire (JNM), en particulier, constitue un système synaptique de référence, permettant une analyse fine et reproductible des mécanismes de développement, de plasticité et de transmission synaptique (Menon et al 2013).

La jonction neuromusculaire de la Drosophile : un modèle de référence pour l'étude de la synapse et des boutons synaptiques

Au sein des modèles expérimentaux utilisés pour étudier la transmission synaptique *in vivo*, la jonction neuromusculaire (JNM) larvaire de la Drosophile occupe une place centrale. Il s'agit d'une interface bien caractérisée entre les motoneurones et les fibres musculaires du système moteur larvaire. Ce sont des synapses de grande taille et facilement accessibles, et leur architecture répétée et stéréotypée permet, d'un individu à l'autre, d'identifier les mêmes branches et boutons synaptiques. Cette configuration autorise des mesures morphologiques et fonctionnelles fines, comparables et hautement reproductibles (Menon et al 2013). Bien que périphérique sur le plan anatomique, cette synapse récapitule les grands principes de la neurotransmission excitatrice observée dans le cerveau des mammifères, à commencer par l'usage du glutamate comme neurotransmetteur principal. Cela en fait un système modèle particulièrement pertinent pour aborder les processus synaptiques fondamentaux impliqués dans la physiopathologie de la MA.

Morphologiquement, la JNM est composée d'arborisations terminales de motoneurones formant des structures appelées boutons synaptiques le long de leurs branches axonales. Ces boutons sont des unités fonctionnelles spécialisées, où se concentrent les vésicules synaptiques, les protéines de la machinerie d'exocytose et de recyclage, ainsi que les éléments du cytosquelette nécessaires à la structuration de la zone active (ZA) (Menon et al 2013). Les ZA correspondent aux spécialisations présynaptiques où s'opèrent l'ancrage et la pré-activation des vésicules en vue de l'exocytose (Fouquet et al 2009). À la JNM de *Drosophile*, elles s'organisent autour d'un échafaudage protéique notamment Bruchpilot/BRP, RIM/RIM-BP, Munc13/Unc13 qui aligne des vésicules prêtes à fusionner avec des canaux calciques voltage-dépendants, assurant un couplage Ca^{2+} -exocytose. Morphologiquement, la ZA se manifeste par une projection dense en "T-bar" sur laquelle s'attachent les vésicules, en vis-à-vis d'un appareil postsynaptique enrichi en récepteurs du glutamate ; cet alignement trans-synaptique optimise la probabilité de libération et la précision temporelle de la transmission. Le nombre et la maturation des ZA au sein d'un bouton conditionnent ainsi la force synaptique et sa plasticité (Graf et al 2012, Kawasaki et al 2004, Böhme et al 2016).

Du côté post-synaptique, la membrane musculaire est enrichie en récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluR), fonctionnellement proches des récepteurs AMPA des vertébrés (Kim YJ et al 2012). L'interface synaptique est également stabilisée par un dense réseau de protéines d'échafaudage et de signalisation, rendant cette structure hautement informative pour l'analyse du dialogue synaptique et de la plasticité (Kittel et al 2006, Thomas et al 2010).

La JNM présente des atouts expérimentaux particulièrement puissants pour l'exploration de la biologie synaptique. Sa facilité de dissection chez les larves de stade 3, combinée à son accessibilité optique, permet une visualisation directe des structures pré et postsynaptiques par imagerie confocale ou super-résolution. Cette visibilité fait de la JNM un système unique pour l'analyse morphométrique des boutons synaptiques, un aspect central des travaux présentés ultérieurement dans cette thèse. Il est possible de quantifier avec une grande précision le nombre, la taille et l'organisation spatiale des boutons dans des contextes génétiques ou expérimentaux variés. La dynamique de ces boutons, reflet de l'activité synaptique et de la plasticité structurale, peut ainsi être finement corrélée à l'expression de gènes d'intérêt ou à des manipulations moléculaires ciblées (Menon et al 2013). Ainsi, la jonction neuromusculaire offre un cadre idéal pour étudier *in vivo* l'impact fonctionnel des orthologues de gènes humains associés à la MA.

Amph : un orthologue de BIN1 dans le système nerveux de la drosophile

Description de Amph et homologie avec BIN1

Chez *Drosophila melanogaster*, le gène *Amph* (pour *Amphiphysin*) est l'orthologue de *BIN1*. *Amph* code une protéine contenant un domaine BAR, un domaine SH3, ainsi qu'un domaine intermédiaire riche en motifs de liaison aux protéines impliquées dans l'endocytose, reflétant une conservation structurale et fonctionnelle significative avec les isoformes neuronales de *BIN1* humain (Leventis et al 2001). La conservation des domaines BAR et SH3 chez *Amph* (Figure 12) suggère une capacité similaire à remodeler les membranes, interagir avec des partenaires du trafic vésiculaire, et jouer un rôle pivot dans les processus dynamiques qui sous-tendent la communication synaptique. L'expression d'*Amph* est bien marquée dans le système nerveux central aux stades larvaire et adulte, avec une accumulation notable au niveau de la jonction neuromusculaire où la protéine est plutôt en post-synaptique (Leventis et al 2001, Razzaq et al 2001). Les jeux de données transcriptomiques confirment une expression dans le système nerveux central (FlyAtlas/FlyAtlas2), cohérente avec un rôle dans la transmission synaptique, sans qu'une prédominance convaincante dans un type neuronal particulier soit établie à ce jour (Davie et al 2018, Brunet Avalos et al 2019).

Chez la drosophile, un seul gène, *Amph*, couvre le spectre fonctionnel de la famille des amphiphysines. Au cours de l'évolution des vertébrés, une duplication a donné naissance à deux paralogues, AMPH1 et AMPH2/BIN1, qui se sont ensuite spécialisés, avec des rôles plus spécifiques selon les tissus. Cette configuration fait de la drosophile un modèle simplifié pour explorer, dans un système unique, les fonctions portées par les domaines conservés de la famille amphiphysine, notamment dans le contexte neuronal (Leventis et al 2001, Giraud et al 2024). Ainsi, *Amph* est considéré comme un modèle efficace pour étudier les fonctions synaptiques de BIN1, et ses altérations permettent de mimer certains aspects de la pathologie neurodégénérative chez la Drosophile.

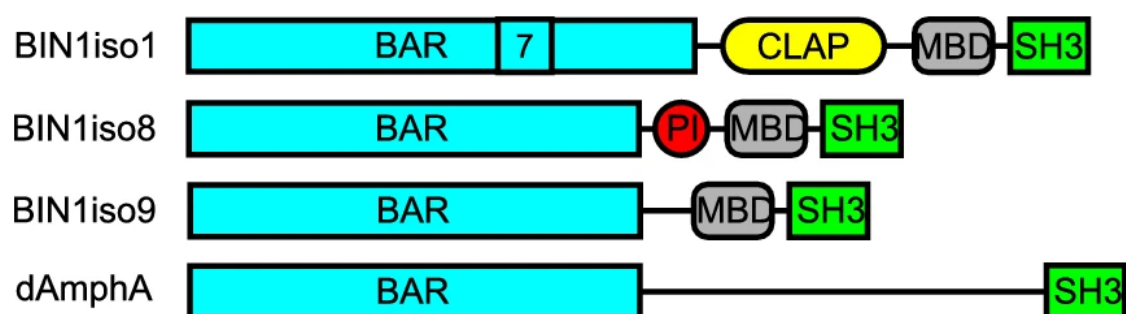


Figure 12. Organisation des domaines de différentes isoformes de BIN1 humain et de l'orthologue drosophile *Amphiphysin*. Les isoformes humaines de BIN1 présentent un agencement caractéristique vu précédemment incluant le domaine BAR, le domaine CLAP, un MBD et le domaine SH3. Chez la drosophile, l'orthologue *Amph* conserve à la fois le domaine BAR et le domaine SH3, soulignant la conservation évolutive de fonctions clés liées au remodelage membranaire et aux interactions protéine-protéine. Cette conservation suggère que les fonctions associées au domaine BAR sont maintenues entre la *Drosophile* et l'Homme, et que le domaine SH3, essentiel dans l'interaction BIN1-PRD chez les mammifères, pourrait permettre une interaction fonctionnelle similaire entre *Amph* et *Fak* à la JNM de *Drosophila* (Lambert et al 2022).

Fonctions synaptiques d'*Amph* chez la *Drosophile*

La protéine *Amph* de *Drosophile* est classiquement décrite comme un facteur régulateur du trafic membranaire, grâce à ses deux domaines structuraux majeurs : un domaine BAR en N-terminal, capable de déformer les membranes et un domaine SH3 en C-terminal. Chez les mammifères, ce domaine recrute des partenaires tels que la dynamine et la synaptojanine pour catalyser la fission vésiculaire (Takei et al 1999, Slepnev et al 2000). Fortes de ces propriétés établies chez les mammifères, les premières hypothèses postulaient qu'*Amph* serait indispensable à l'endocytose synaptique. Cependant, les études génétiques chez la *Drosophile* ont révélé une situation plus nuancée. Des mutants nuls pour *Amph* se sont avérés viables et n'affichent pas les défauts massifs d'endocytose attendus : même sous stimulation soutenue, les synapses de larves *Amph*^{-/-} conservent une capacité efficace de recyclage vésiculaire, et la transmission neurotransmetteur reste globalement fonctionnelle (Leventis et al 2001). Ce résultat fut surprenant car il contredisait la vision d'*Amph* comme un composant absolument requis pour l'endocytose vésiculaire (Leventis et al 2001). À la place, il suggère qu'*Amph* ne joue pas un rôle universel dans le cycle vésiculaire, mais pourrait agir de manière contextuelle en modulant la courbure des membranes et l'assemblage de complexes protéiques, plutôt qu'en assurant directement la recapture des vésicules (Zelhof et al 2001, Leventis et al 2001).

Amph remplit en effet un rôle plus large d'organisateur structural des domaines membranaires neuronaux. En l'absence d'*Amph*, aucune perturbation morphologique majeure de la JNM n'est apparente, mais on observe des altérations plus subtiles de l'architecture synaptique et du positionnement de certaines protéines clés. Par exemple, des protéines de la densité postsynaptique telles que Discs-large ou Scribble perdent leur localisation normale chez les mutants *Amph*^{-/-} (Zelhof et al 2001). En l'absence d'*Amph*, aucune perturbation morphologique majeure de la JNM n'est apparente, mais on observe des altérations plus subtiles de l'architecture synaptique et du positionnement de certaines protéines clés. Notamment, dans un contexte mutant pour *past1*, la perte d'*Amph* induit des défauts postsynaptiques marqués et modifie l'organisation des sous-domaines membranaires (Koles et al 2015).

De plus, la molécule d'adhésion Fasciclin II (FasII, homologue de NCAM) présente un défaut de recyclage membranaire. En effet, chez les larves *Amph^{-/-}*, le niveau de FasII à la surface postsynaptique est significativement réduit alors que son niveau total reste inchangé, signe que la réinsertion de FasII dans la membrane synaptique est sévèrement inhibée sans *Amph* (Mathew et al 2003). Des tests d'internalisation *in vivo* confirment que la recapture des molécules de FasII est fortement compromise en l'absence d'*Amph*, ce qui met en évidence la fonction d'*Amph* dans le recyclage ciblé de composants postsynaptiques plutôt que dans l'endocytose globale des vésicules (Mathew et al 2003).

Par ailleurs, *Amph* est localisée de façon prédominante dans le compartiment postsynaptique de la JNM larvaire, plutôt que dans les terminaisons présynaptiques uniquement (Zelhof et al 2001, Leventis et al 2001). Bien que l'immunomarquage montre un enrichissement postsynaptique, les défauts de locomotion observés chez les mutants *Amph* semblent surtout refléter des fonctions musculaires extra-synaptiques d'*Amph*, sans altérer significativement la morphologie ni la physiologie basale de la JNM (Leventis et al 2001). L'effet d'*Amph* résulterait principalement d'un défaut d'organisation des tubules T dans la fibre musculaire, voire d'un découplage excitation-contraction, plutôt que d'un blocage direct de l'endocytose vésiculaire au niveau présynaptique (Leventis et al 2001).

Amph collabore également avec d'autres protéines de remodelage membranaire pour soutenir l'intégrité de la synapse. Notamment, une étude a montré qu'*Amph* se colocalise avec la protéine EHD Past1 et l'homologue de Syndapin dans le réticulum sous-synaptique (SSR) du muscle, et qu'en absence de Past1 ces partenaires s'accumulent en agrégats membranaires anormaux dépendants d'*Amph* dans le SSR (Koles et al 2015). Ce résultat illustre le rôle d'*Amph* dans l'élaboration et le maintien de la structure tubulo-réticulaire du compartiment postsynaptique. L'ensemble de ces observations indique qu'*Amph* n'est pas qu'un simple facteur d'endocytose, mais agit comme un organisateur structural et fonctionnel de la synapse. Au niveau de la JNM de *Drosophile*, *Amph* façonne l'architecture synaptique et régule le recyclage de protéines essentielles comme FasII, contribuant à l'organisation des sous-domaines membranaires du muscle et à une transmission neuromusculaire efficace via le contrôle du trafic et de l'agencement membranaires (Zelhof et al 2001, Leventis et al 2001, Mathew et al 2003, Koles et al 2015).

Le modèle de la *Drosophile* offre ainsi un cadre pertinent pour étudier l'effet de la perte de fonction d'*Amph* sur l'organisation synaptique, et pour explorer des mécanismes conservés susceptibles d'éclairer la physiopathologie des synapses dans les maladies neurodégénératives.

Fak : un orthologue de *PTK2B* à la fonction synaptique conservée chez la drosophile

Description de *Fak* et homologie avec *PTK2B*

Le gène *Fak56D* (focal adhesion kinase 56D), que j'appellerai *Fak* dans le reste du projet, code une tyrosine-kinase cytosolique d'environ 140 kDa. Il constitue l'unique orthologue de la famille FAK chez la Drosophile et correspond, chez les vertébrés, aux deux paralogues FAK/PTK2 et Pyk2/PTK2B (Palmer et al 1999). Comme chez les mammifères, *Fak* comprend trois domaines structuraux majeurs : un domaine N-terminal de type FERM liant la kinase à la membrane et aux intégrines, un domaine catalytique central de tyrosine kinase, et un domaine C-terminal FAT pour le ciblage aux sites d'adhésion (Palmer et al 1999, Fox et al 1999). Il a été montré que *Fak56D* partage environ 33 % d'identité de séquence avec la FAK humaine, la conservation la plus forte portant sur le domaine kinase et le domaine FAT (Fox et al 1999). L'alignement révèle également des motifs protéiques conservés notamment les séquences riches en prolines qui sont capable d'interagir avec des partenaires protéiques dotés d'un domaine SH3 (Fox et al 1999). Ainsi, *Fak* est considéré comme l'orthologue fonctionnel de PTK2B/Pyk2 chez l'humain.

Fonctions synaptiques de *Fak* chez la Drosophile

Chez la Drosophile, *Fak* est exprimée de manière ubiquitaire au cours du développement, avec des niveaux particulièrement élevés dans le système nerveux central embryonnaire et larvaire ainsi qu'aux sites d'attache musculaire (Fujimoto et al 1999, Grabbe et al 2004).

Des études fonctionnelles montrent que la perte de *Fak* s'accompagne de perturbations majeures des fonctions neuronales et gliales. En particulier, les mutants présentent un comportement épileptique après stimulation mécanique, un ralentissement de la conduction des potentiels d'action le long des nerfs segmentaires, ainsi que des blocages de la transmission synaptique lors de stimulations à haute fréquence (Ueda et al 2008). De plus, *Fak* est fortement exprimée dans les cellules gliales entourant les axones, et l'inactivation spécifique de *fak* dans les glies reproduit les défauts de conduction observés (Ueda et al 2008). Ces résultats suggèrent que *Fak* joue un rôle essentiel dans la fonction des cellules gliales assurant la propagation de l'influx nerveux, en particulier pour la transmission neuromusculaire dépendante du calcium *in vivo* (Ueda et al 2008). Il faut noter que la littérature sur *Fak* en contexte neuronal demeure limitée (comparativement à PTK2B), et ces conclusions reposent principalement sur une seule étude. Néanmoins, *Fak* apparaît, comme PTK2B,

comme un régulateur potentiel de la signalisation neuronale, de la plasticité synaptique et de l'organisation du cytosquelette neuronal (Ueda et al 2008, de Pins et al 2021).

À la JNM de *Drosophile*, Fak occupe également une position clé en aval des intégrines pour moduler l'organisation locale de la synapse et la signalisation intracellulaire qui en découle (Tsai et al 2008). Dans cette étude, Fak exerce à ce niveau une fonction de frein moléculaire limitant la croissance synaptique via une inhibition de la voie MAPK/ERK. En effet, chez les mutants fak, l'activité d'ERK est excessivement élevée (accumulation de ERK diphosphorylée) et la réduction de l'activité ERK suffit à supprimer le phénotype de surcroissance synaptique des mutants (Tsai et al 2008). En conséquence, la mutation nulle de *Fak* induit une surcroissance de la JNM larvaire, qui se manifeste par une augmentation anormale du nombre de boutons synaptiques et une ramification exacerbée des terminaisons axonales motrices au niveau de la synapse. La réintroduction de *Fak* spécifiquement dans les motoneurones présynaptiques suffit à corriger ce phénotype, confirmant que la fonction de Fak est requise au niveau présynaptique pour restreindre l'expansion de la jonction (Tsai et al 2008).

Dans une étude complémentaire, il a été montré que la neurofibromine, produit du gène *NF1*, interagit physiquement avec Fak et agit comme un cofacteur de sa signalisation inhibitrice afin de restreindre la croissance des terminaisons synaptiques (Tsai et al 2012). Ce mécanisme s'inscrit dans un réseau complexe de régulation impliquant la machinerie d'adhésion cellulaire, les voies kinases (MAPK, PKA/cAMP) et des éléments du cytosquelette. Bien que les détails de cette cascade restent à préciser, l'ensemble de ces données renforce l'idée que Fak est un régulateur central de la morphogenèse synaptique au niveau de la JNM (Tsai et al 2012).

Les hypothèses au centre de ce projet de thèse

Synapse centrale et vulnérabilité génétique

Au-delà des lésions classiques A β , Tau et de la neuroinflammation, les données humaines placent la synapse au centre de la MA. Pour rappel, la perte synaptique est un marqueur précoce de la maladie et c'est le paramètre qui corrèle le mieux avec la sévérité clinique et le déclin cognitif (Terry et al 1991). Les grandes GWAS et méta-analyses ne pointent pas vers une cascade amyloïde linéaire, mais vers des réseaux de gènes dont les fonctions s'exercent au niveau même des synapses : endocytose et recyclage des récepteurs, remodelage lipidique des microdomaines membranaires, régulation immunitaire du "synapse pruning", et signalisation d'adhésion focale contrôlant la stabilité des jonctions (Harold et al 2009, Lambert et al 2013, Kunkle et al 2019, Bellenguez et al 2022). Ces convergences suggèrent que les

mécanismes de vulnérabilité de la maladie d'Alzheimer s'enracinent dans la physiologie synaptique.

Au regard de ces convergences génétiques et fonctionnelles, plusieurs auteurs ont proposé de dépasser la vision linéaire de la cascade amyloïde pour envisager la maladie d'Alzheimer comme une pathologie des interactions synaptiques et de l'adhésion cellulaire. Dans ce contexte, les cribles génétiques et fonctionnels réalisés dans notre laboratoire ont identifié plusieurs modulateurs de Tau et d'APP dont les produits convergent sur des voies communes de signalisation et d'ancrage au cytosquelette, impliquant notamment FERMT2, PTK2B, ou CASS4. Ces observations ont conduit à la formulation d'un modèle intégrateur, plaçant au centre de la pathogenèse un "cœur d'adhésion focale" (Figure 13, A), constitué de ces effecteurs situés à l'interface entre la membrane, le cytosquelette et les voies de signalisation synaptique (Dourlen et al 2019). Ce réseau moléculaire assurerait, en conditions physiologiques, la coordination entre les fonctions d'APP et de Tau, tandis que sa dérégulation pourrait relier de manière unifiée les désordres d'endocytose, de signalisation calcique et de plasticité synaptique décrits dans la MA. Ainsi, le modèle du "cœur d'adhésion focale" propose une lecture transversale des mécanismes pathogéniques, où la synapse n'est plus la victime terminale de la cascade amyloïde, mais le lieu d'intégration primaire des altérations moléculaires (Figure 13, B)(Dourlen et al 2019).

Cette hypothèse de vulnérabilité synaptique d'origine génétique suppose que la dérégulation de certains facteurs de risque génétique pourrait conduire à une toxicité synaptique d'une part. D'autre part, si plusieurs facteurs de risque génétique sont impliqués dans la vulnérabilité synaptique, certains pourraient interagir entre eux et former potentiellement une voie de signalisation. De l'hypothèse principale découlent donc deux hypothèses particulières que je vais présenter à l'aide d'exemple dans les deux paragraphes suivants.

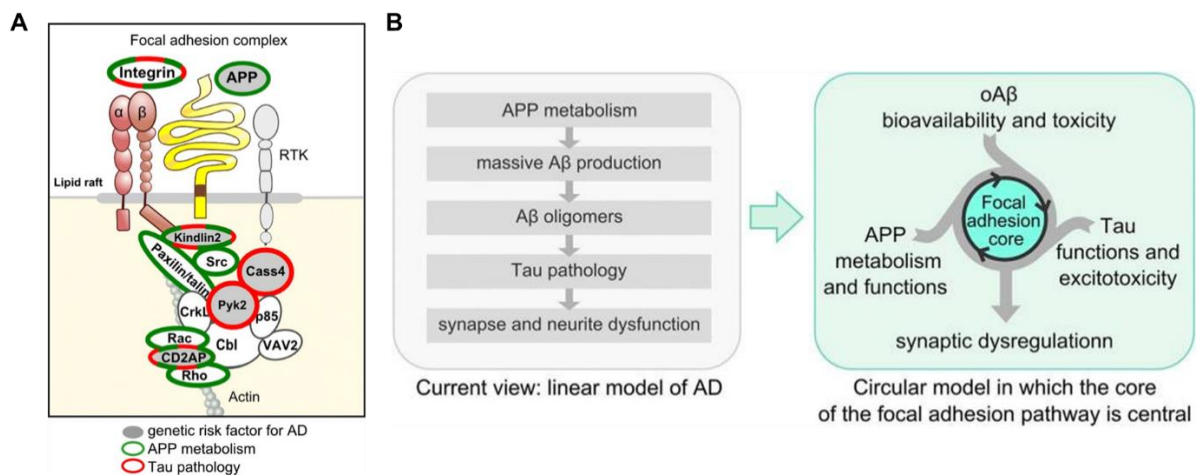


Figure 13. Évolution des modèles physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer : de la cascade linéaire à un modèle circulaire intégrant la voie des adhésions focales. (A) Schéma du complexe d'adhésion focale (intégrines, FERMT2/Kindlin-2, PTK2B/Pyk2, CASS4, paxilline/taline, Src, adaptateurs et effecteurs en aval, RTK, etc.) ancré dans des microdomaines lipidiques. Le code visuel indique en gris = gènes/loci associés au risque de MA (GWAS), en vert = acteurs liés au métabolisme/fonctions d'APP, en rouge = acteurs reliés à la pathologie Tau. Ce cadre met l'accent sur une vision intégrée et dynamique où le module d'adhésion focale orchestre des boucles de rétroaction aux synapses. (B) Modèle linéaire "classique" de la maladie d'Alzheimer : le métabolisme de l'APP conduit à une production excessive d'A β , à la formation d'oligomères toxiques, puis à la pathologie Tau, culminant en une dysfonction synaptique et neuritique. Modèle "circulaire" intégrant un cœur d'adhésion focale au centre d'interactions bidirectionnelles entre (i) le métabolisme/fonctions de l'APP et la biodisponibilité/toxicité des oligomères d'A β , (ii) les fonctions de Tau et l'excitotoxicité, et (iii) la dysrégulation synaptique. (Adapté de Dourlen et al., 2019.)

Isoformes de BIN1 et synaptotoxicité

Un travail de l'équipe a montré que l'expression de l'isoforme1 de BIN1, spécifiquement, entraînait une dégénérescence progressive des neurones photorécepteurs de l'œil de la Drosophile (Lambert et al 2022). Ceci n'était pas retrouvé pour les isoformes 8 et 9. De plus la dégénérescence neuronale était caractérisée par la présence anormale de vésicules de grande taille présentant des marqueurs d'endosome précoce et tardif, suggérant qu'une altération du trafic endolysosomal pouvait en être à l'origine (Lambert et al 2022). En effet, la modulation de régulateurs des endosomes précoces et de recyclage, tels que Rab11, a permis d'inhiber la dégénérescence induite par l'isoforme 1 de BIN1 indiquant que la dérégulation du trafic endolysosomal était responsable de la dégénérescence neuronale (Lambert et al 2022). Des résultats non publiés montraient, en plus, une atteinte précoce de la transmission synaptique des neurones photorécepteurs avant leur dégénérescence, ainsi que la présence anormale de vésicules endosomales de grande taille dans les terminaisons synaptiques des neurones photorécepteurs.

Ces résultats sont intéressants car (1) ils apportent des connaissances sur le rôle spécifique des nombreuses isoformes du facteur de risque génétique *BIN1* et (2) renforcent l'hypothèse

particulière émise dans le paragraphe précédent, que la dérégulation de l'expression certains facteurs de risque génétique, en l'occurrence certaines isoformes du gène *BIN1*, pourrait conduire à une toxicité synaptique. Répondre à cette hypothèse a constitué le premier objectif de ce travail de thèse.

Vers une interaction entre BIN1 et PTK2B

La seconde hypothèse à laquelle j'ai souhaité répondre pose la question de savoir si certains facteurs de risque génétique pourraient interagir entre eux et former potentiellement une voie de signalisation à l'origine d'une vulnérabilité synaptique. Je me suis orienté vers une potentielle interaction entre les facteurs de risque *BIN1* et *PTK2B*.

Plusieurs arguments indépendants mais convergents étayent l'hypothèse d'une interaction entre ces deux gènes. D'abord, une approche de criblage des loci à risque de la MA a été réalisée *in vivo* chez la drosophile par notre équipe. La protéine Tau humaine est exprimée sous le contrôle du promoteur GMR dans l'œil et induit un phénotype d'œil rugueux, c'est-à-dire une surface oculaire dégradée reflétant la neurotoxicité de Tau. 54 gènes candidats ont été criblé pour identifier leur rôle suppresseur ou enhanceur sur la toxicité de Tau (Dourlen et al 2017). Ce criblage confirme d'abord que l'orthologue *Amph* de *BIN1* modifie la toxicité de Tau dans ce modèle. Dans le même crible, *Fak* (orthologue de *PTK2B*) se révèle un modulateur robuste de la toxicité de Tau : aussi bien sa réduction que sa surexpression atténuent le phénotype induit par Tau dans l'œil de drosophile (Dourlen et al 2017). Mis en regard des effets observés pour *Amph*, ces résultats indiquent que *BIN1* et *PTK2B* sont tous deux des modulateurs de la toxicité de Tau dans ce modèle suggérant une potentielle participation à une voie commune de signalisation régulant la toxicité de Tau.

Sur le plan structuro-fonctionnel, une interaction directe entre BIN1 et PTK2B est plausible. En effet, le SH3 de BIN1 reconnaît des sites riches en proline PXXPXR portés par FAK et les isoformes neuronales de FAK se lient spécifiquement au domaine SH3 de BIN1 (Messina et al 2003). Cette interaction impliquant la région riche en proline de FAK a été confirmée par co-immunoprécipitation des deux protéines. De plus, la perturbation de l'interaction FAK-Amphiphysine par l'internalisation d'un peptide riche en proline correspondant au site d'interaction altère l'endocytose dans des synaptosomes, argument fonctionnel en faveur d'un rôle de FAK dans le trafic membranaire synaptique (Messina et al 2003). D'autres travaux ont, plus généralement, établi que les domaines riche en proline (PRD) de FAK servent de plateformes d'ancrage pour des domaines SH3 comme celui de l'endophiline A2, ce qui renforce la plausibilité d'une interface similaire autour de BIN1-PTK2B (Wu et al 2005). Étant donné la

conservation des PRD entre FAK et PTK2B, un couplage analogue entre BIN1-SH3 et PTK2B-PRD est donc mécaniquement attendu (Figure 14).

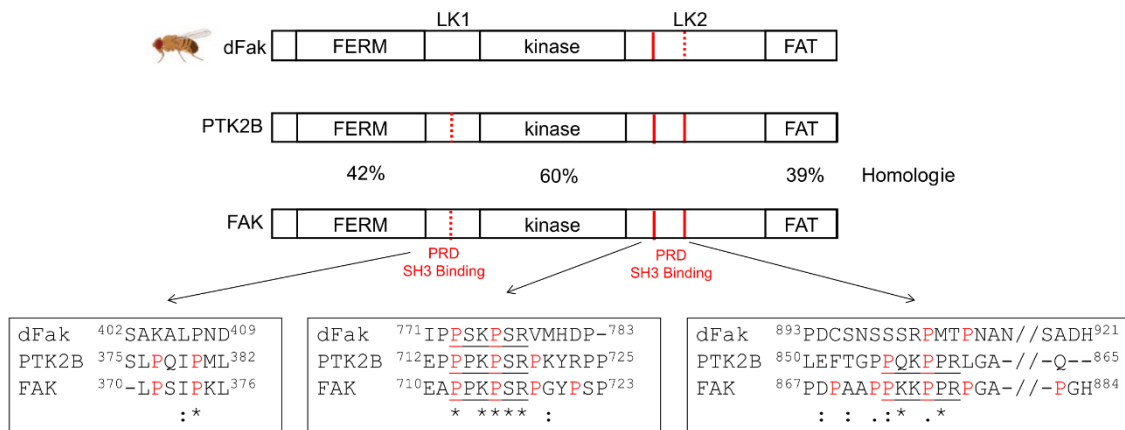


Figure 14. Conservation des domaines fonctionnels et des motifs riches en proline de Fak, PTK2B et FAK. Représentation schématique de l'organisation des domaines de la protéine FAK humaines, de son paralogue PTK2B (Pyk2) et de son orthologue de drosophile dFak. Les domaines FERM, kinase et FAT sont conservés entre les trois protéines, avec des pourcentages d'homologie respectifs de 42 %, 60 % et 39 % entre FAK et PTK2B. Les deux régions inter-domaines (linkers LK1 et LK2) contiennent des motifs riches en proline (PRD) susceptibles d'interagir avec des domaines SH3, notamment celui de BIN1. L'alignement des séquences situées dans ces régions met en évidence la conservation partielle des motifs PXXP (trait en pointillé) PXXPXR (trait plein). Dans le linker 1, les séquences humaines présentent un motif PXXP plutôt bien conservé. Dans le linker 2, le PRD1 montre une forte conservation entre les trois espèces. Le PRD2 est plus divergent, bien que la séquence riche en proline soit globalement bien maintenue entre FAK et PTK2B. Chez la drosophile, le PRD1 du linker 2 constitue la région la plus conservée et la plus susceptible de participer à des interactions avec des protéines à domaine SH3 telles qu'Amph.

Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire soutiennent l'hypothèse d'une interaction directe entre BIN1 et PTK2B/Pyk2. En effet, des expériences de co-immunoprécipitation réalisées à partir d'extraits de cellules HeLa co-surexprimant les isoformes neuronales de BIN1 (isoformes 1 ou 9) et l'isoforme longue de PTK2B montrent qu'il est possible de précipiter BIN1 en ciblant PTK2B, et réciproquement. Parallèlement, une collaboration avec l'équipe d'Isabelle Landrieu (Université de Lille) a permis d'obtenir, par résonance magnétique nucléaire (RMN), des résultats d'un contact direct entre le domaine SH3 de BIN1 et des peptides contenant les motifs riches en proline de PTK2B (Thèse Lucy Martin). Ces données convergentes, bien que préliminaires, renforcent l'hypothèse d'une interaction directe et potentiellement fonctionnelle entre BIN1 et PTK2B.

Consécutivement à ces éléments, plusieurs questions se posent : BIN1 et PTK2B interagissent-ils vraiment physiquement ? Cette interaction est-elle fonctionnelle, dans les

neurones ? Quelles voies morphologiques et/ou fonctionnelles cette interaction pourrait-elle réguler ? Répondre à ces questions constitue le second objectif de mon travail de thèse.

Objectifs et stratégie expérimentale

Mon travail de thèse a donc deux objectifs :

- Premièrement, évaluer la synaptotoxicité des isoformes de BIN1. Pour cela, j'ai testé l'impact de trois isoformes de BIN1 sur la morphologie des JNMs de larves de *Drosophile*, à savoir le nombre et la structure des boutons synaptiques, et la densité de boutons satellites. De plus, j'ai évalué une implication du trafic endolysosomal dans les phénotypes observés en testant si l'expression d'un régulateur des endosomes de recyclage, Rab11, pouvait moduler ces phénotypes. Ce travail s'inscrit dans la continuité du travail initié par Erwan Lambert, le doctorant qui m'a précédé dans l'équipe. Il m'a permis de me familiariser avec l'analyse de la jonction neuromusculaire, d'acquérir une expertise technique utile pour mon second objectif et a abouti à la publication de mon premier article, auquel j'ai contribué en tant que co 1er auteur (Lambert et al 2025).
- Deuxièmement, évaluer l'interaction potentielle entre les facteurs de risque *BIN1* et *PTK2B*. Ce second objectif a constitué le noyau central de ma thèse. Pour y parvenir, j'ai utilisé deux modèles expérimentaux complémentaires : le modèle de la *Drosophile* et la culture primaire de neurones hippocampiques de rat. D'abord *in vivo* chez la *Drosophile*, j'ai généré et analysé des recombinants ciblant les orthologues *Amph* et *Fak*, en versions simples et doubles KO. Le but était de se concentrer sur les phénotypes épileptiques et locomoteurs décrits pour *Fak* et *Amph* dans la littérature et de tester si la mutation de l'autre gène en plus du premier modifiait le phénotype connu, pour mettre en évidence des interactions génétiques additives, épistatiques ou synergiques. Pour approfondir les résultats obtenus, je me suis focalisé sur la JNM. J'ai quantifié la morphologie des boutons synaptiques, l'arborisation des ramifications et la densité des zones actives. J'ai également complété les résultats par des analyses électrophysiologiques de la JNM et de la rétine des mouches. Pour tester la conservation des résultats en modèles mammifères, dans des neurones hippocampiques en culture primaire, j'ai invalidé l'expression des gènes *BIN1* et *PTK2B* indépendamment, puis de manière combinée par ARN interférence. J'ai d'abord étudié la proximité BIN1-PTK2B par PLA, puis caractérisé le rôle synaptique

de l'interaction en quantifiant l'architecture du réseau dendritique et la densité synaptique.

Dans l'ensemble, ce travail éclaire à la fois sur la synaptotoxicité spécifique de BIN1 isoforme 1 en la reliant à des altérations morphologiques et fonctionnelles et sur l'interaction fonctionnelle entre *BIN1* et *PTK2B*, évaluée *in vivo* à la JNM et *in vitro* dans des neurones de rats. En articulant ces deux volets, il affine notre compréhension du rôle des facteurs de risque génétique de la MA à la synapse, en montrant comment spécificité d'isoforme et interactions géniques peuvent façonner les phénotypes synaptiques. Il ouvre, enfin, sur des pistes mécanistiques qui pourraient s'avérer pertinentes en physiologie comme en pathologie, qui seront discutées à l'issue des résultats.

Matériels et Méthodes

Gestion des Drosophiles

Les Drosophiles étaient élevées sur un milieu nutritif standard (Nutri-Fly GF, Genesee Scientific, San Diego, CA, USA) sous un cycle de lumière/obscurité de 12h:12h à 18°C pour le maintien des stocks et à 25°C pour les croisements et l'amplification. Pour les collectes, les croisements et les expériences de dissection et d'électrophysiologie, les mouches ont été anesthésiées au CO₂ avant d'être manipulées.

Pour le projet 1, les lignées utilisées : UAS-BIN1iso1, UAS-BIN1iso9, UAS-BIN1iso8, UAS-dAmphA ont été décrites précédemment (Lambert et al 2022). Les autres lignées ont été obtenues auprès du Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC, Bloomington, IN, USA) : UAS-Luciferase (BDSC #35788), UAS-mCD8::GFP (BDSC #27400), UAS-GFP (BDSC #35786), UAS-Rab11:GFP (BDSC #8506) et nSyb-Gal4 (BDSC #42714).

Pour le projet 2, pour le protocole de recombinaison, les lignées suivantes ont été utilisées : Fak^{CG1/CG1} provenant du laboratoire de Ruth Palmer (*PTK2B* KO), Amph^{26/26} (*BIN1* KO, BDSC #6498), If/CyO.

Pour l'étude morphologique et électrophysiologique ainsi que pour les électrorétinogrammes les lignées utilisées issues de la recombinaison sont les suivantes : WT (Fak⁺,Amph⁺), Fak KO (Fak^{CG1},Amph⁺), Amph KO (Fak⁺,Amph²⁶) et double KO (Fak^{CG1},Amph²⁶).

Les expériences ont utilisé la lignée w(CS10) comme témoin : il s'agit d'un fond génétique Canton-S dans lequel la mutation w¹¹¹⁸ a été stabilisée par une série d'environ dix rétrocroisements, également appelée "cantonnisation". Cette lignée a été décrite et utilisée comme référence "WT" dans plusieurs travaux (Zimmerman et al 2012, Shiraishi et al 2014).

Recombinaison génétique

Les lignées initiales utilisées pour la recombinaison sont Fak^{CG1} (mutation perte de fonction de *Fak* fournie par le laboratoire de R. Palmer) et Amph²⁶ (lignée perte de fonction d'*Amph* venant de BDSC #6498). Les deux loci sont portés par le chromosome 2. Pour la récupération et la maintenance des chromosomes recombinants à ce locus, la mutation marquante *lf* (invisible fly) a été employée afin d'identifier les porteurs, en association avec le balancier *CyO* (Curly of Oster) destiné à limiter la recombinaison. La recombinaison méiotique, naturellement présente chez les femelles F1 et absente chez les mâles, a permis la récupération des chromosomes recombinants. Des femelles vierges Amph²⁶ homozygotes ont été croisées à des mâles Fak^{CG1} homozygotes afin d'obtenir, parmi la descendance, des mâles et femelles Fak^{CG1/+},Amph^{26/+} hétérozygotes pour les deux mutations. Les femelles F1 hétérozygotes ont ensuite été croisées avec des mâles *lf/CyO*. La méiose des femelles F1 a généré quatre classes de gamètes (parentaux et recombinants), permettant de récupérer des individus : Fak^{CG1/CG1},Amph^{26/26} (double mutant), Fak^{CG1/CG1},Amph^{+/+}, Fak^{+/+},Amph^{26/26} et Fak^{+/+},Amph^{+/+} (recombinant « WT »). Chaque individu recombinant obtenu a été immédiatement croisé à *lf/CyO* pour établir une lignée balancée. Après expansion, des homozygotes ont été obtenus par croisement au sein des lignées équilibrées.

PCR génomique

Les réactions de PCR (volume final 25 µL) contenaient : tampon PCR 1×, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 0,2 mM de chaque, Taq ADN polymérase 0,02 U/µL (Invitrogen, réf. 18038240), 0,1 µM de chaque amorce, de l'ADN génomique (ADNg) comme matrice, et de l'H₂O stérile pour compléter à 25 µL. Les amorces utilisés sont les suivantes : Amph_Ex1F avec Amph_Ex1R (séquences décrites plus bas) pour Amph²⁶ et Fak_Ex16F avec Fak_Ex16R (séquences décrites plus bas) pour Fak^{CG1}. Les tubes contenant le mélange de PCR ont été placés dans le thermocycleur où la PCR a été effectuée. Les réactions de PCR ont été conduites avec une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivie de 40 cycles comprenant une dénaturation à 94°C pendant 50s, une hybridation à 57 °C pendant 50s et une extension à 72°C pendant 50s ; une extension finale a été réalisée à 72°C pendant 5 min. Après la PCR, 7µL de chaque tube sont placés dans un puits d'un gel d'agarose à 3% contenant du GelRed (Millipore SCT123), la migration a été effectuée à 200 volts à l'aide d'un générateur pendant 30 minutes. Une fois la migration terminée, les bandes ont été révélées sous lumière ultraviolette à l'aide d'une caméra E-Box Vilber.

Les amorces utilisées pour les PCR de génotypage ont été conçues à l'aide du logiciel Primer3. Elles ciblent respectivement l'exon 16 du locus Fak et l'exon 1 du locus Amph :

- Fak_Ex16F : CCGATAATAGGGTGTGGCGA
- Fak_Ex16R : GCCCAGACAGCACAGTTG
- AmphEx1F : TTT-CTT-CTC-CGT-TCG-TCC-GT
- AmphEx1R : CCA-AAC-AAT-ATC-GGC-CCC-AC

Test de l'épilepsie chez la Drosophile

L'épilepsie a été évaluée chez la drosophile à l'aide du test « bang-sensitive » (BS), dans lequel un choc mécanique induit des crises et une paralysie chez les mutants sensibles à ce traitement (Pavlidis & Tanouye 1995). Deux contrôles externes ont été inclus pour cette expérience : contrôle positif = Fak^{CG1} homozygote décrit comme présentant un phénotype épileptique et contrôle négatif = w(CS10). Le test a été réalisé sur des adultes mâles et femelles âgés de 8 jours post-éclosion qui ont vécu dans des conditions similaires (cycle 12h/12h jour/nuit, température constante à 22°C). Les mouches ont été placées par groupes de cinq dans un tube en plastique vide sans nourriture 30min avant l'essai. Les tests ont été réalisés à température ambiante (22°C) sous éclairage constant. Les tubes ont été soumis à une agitation brève standardisée grâce à un vortex de paille (≈10 s, à puissance maximale ≈ 3000 tr/min, constante d'une session à l'autre). Immédiatement après l'arrêt, chaque individu a été filmé en plan fixe pendant un intervalle de plusieurs secondes à l'aide d'une caméra numérique (même distance et même éclairage pour toutes les conditions). Les vidéos ont été analysées ensuite et la réponse a été quantifiée de façon qualitative binaire :

- « Pas d'épilepsie » : la mouche se redresse immédiatement et grimpe sans phase d'immobilité/convulsions.
- « Épilepsie » : la mouche présente une immobilité transitoire avec convulsions (tremblements des pattes/ailes, perte de posture) durant quelques secondes, puis récupère et se remet à grimper.

Le taux d'épilepsie (%) a été calculé pour chaque lignée.

Test de locomotion par géotaxie négative

La locomotion a été évaluée par startle-induced negative geotaxis (SING) : après un bref choc mécanique, des groupes d'adultes sont déposés dans un cylindre gradué et la hauteur grimpée (distance verticale) dans un laps de temps défini est quantifiée sur répétitions standardisées. Ce protocole est bien décrit et appliqué dans la littérature (Benzer 1967, Miquel et al 1972, Coulom & Birman 2004).

Les drosophiles ont été collectées quotidiennement après éclosion et transférées dans de nouveaux tubes d'élevage afin d'assurer un âge homogène au moment du test, fixé à 8 jours post-éclosion. Le tri sous CO₂ a permis de séparer les individus par sexe, les femelles étant analysées séparément des mâles. Les mouches ont ensuite été réparties selon la manière suivante : 5 individus par contenant. Pour standardiser et paralléliser les mesures, nous avons conçu un dispositif à six voies à partir de pipettes stériles de 50 mL de type sérologique tronquées à leur extrémité supérieure pour faciliter l'introduction des mouches via un entonnoir. L'extrémité inférieure de chaque pipette a été obturée par une couche de PDMS (quelques dizaines de millimètres d'épaisseur), polymérisée de façon à former une surface plane, évitant la sortie des mouches et assurant un repère « zéro ». Les six pipettes ont été solidarisées dans un support rigide, formant un rack stable permettant l'enregistrement simultané de 6 lots de mouches par vidéo. Le dispositif mesure 25 cm de hauteur et comporte une graduation tous les 2,5 cm, définissant une grille de score de 0 à 10. Au début de chaque essai, le rack est tapoté de façon brève et standardisée sur la paillasse afin de rassembler les mouches au fond de chaque voie. Les mouches pouvaient ensuite grimper pendant 10 s. Cette séquence « tapotage → 10 s d'ascension » était répétée 5 fois par lot, avec un intervalle bref entre essais pour remettre les mouches en position de départ. Chaque session permettait ainsi de générer 5 mesures successives par lot, et 6 lots en parallèle par vidéo. Les essais ont été filmés en plan fixe de façon à capturer simultanément les 6 voies. Pour chaque essai, la hauteur maximale atteinte par chaque individu a été déterminée, puis agrégée au niveau du lot et moyennée sur les 5 répétitions. L'ordre de passage des géotypes/sexes a été randomisé entre sessions pour limiter les biais temporels. Les paramètres environnementaux ont été maintenus constants au cours d'une session : 22°C, lumière rouge et absence de bruits externes.

Dissection et marquage des JNM

Pour les expériences de dissection des projets 1 et 2, des larves femelles ont été sélectionnées (absence des disques gonadiques) au 3^e stade. Les larves ont d'abord été transférées

quelques secondes dans une goutte de PBS 1x (Tampon Phosphate Salin, 70011-036) chauffée à 70°C pour les euthanasier et garantir un étirement homogène entre chaque larve. Elles ont ensuite été transférées dans une goutte de milieu de dissection Schneider (ThermoFisher 21720024) froid sur une boîte recouverte de Sylgard. Les larves ont été épinglées, face dorsale vers le haut, à l'aide de deux épingles : l'une aux spiracles postérieurs, l'autre au niveau du pharynx. Une incision en "I" a ensuite été réalisée le long de la ligne médiane dorsale : d'abord une coupe transversale à l'extrémité postérieure, puis une coupe longitudinale dirigée vers l'extrémité antérieure. Après ajout de quelques gouttes de milieu, les organes internes ont été retirés avec précaution, en conservant la structure motoneurones-muscle. Les volets de paroi ont été délicatement étalés et tendus pour aplatir la préparation (Brent et al 2009) (Figure 15). La fixation a été réalisée 20 min à température ambiante dans du PFA 4 %, suivie de 3 lavages de 5 min dans du PBS 1x. Environ 10 à 15 larves ont été disséquées par condition.

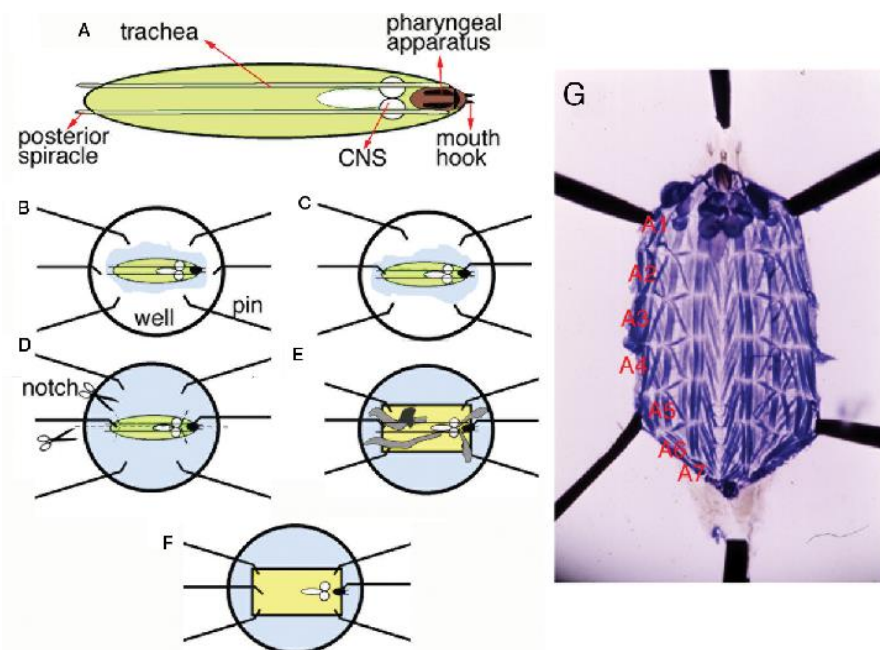


Figure 15. Préparation larvaire de *Drosophila* pour la dissection de la jonction neuromusculaire. (A) Schéma d'une larve de troisième stade illustrant les principaux repères anatomiques : les spiracles postérieurs, la trachée, le système nerveux central (CNS), et l'appareil pharyngé antérieur. (B-F) Étapes de la dissection larvaire sous microscope : la larve est d'abord immobilisée dorsalement sur une plaque de silicone à l'aide d'épingles insérées aux extrémités postérieure et antérieure (B-C). Une incision longitudinale dorsale est ensuite pratiquée à l'aide de ciseaux fins (D), puis la cuticule est ouverte et épinglée latéralement pour exposer la musculature (E). Les organes internes (tube digestif, trachées) sont retirés pour dégager la paroi musculaire (F). (G) Image montrant la musculature segmentaire abdominale (segment A1-A7) prête pour l'analyse morphologique ou immunohistochimique. Source = Ramachandran & Budnik 2010

La perméabilisation/blocage a été effectuée pendant 30 min avec du PBT 0,3 % (PBS + 0,3 % Triton X-100) supplémenté de 5 % de sérum d'âne et de chèvre (NDS/NGS), suivie de trois lavages de 5 min dans du PBS 1x. Les anticorps primaires ont été incubés une nuit à 4 °C en PBT 0,1 %. Après un rinçage bref, 3 lavages de 10 min avec PBS 1x ont été réalisés. Les anticorps secondaires ont été incubés pendant 2 h à température ambiante dans l'obscurité avec du PBT 0,1 %. Les préparations ont ensuite été lavées 3 fois 10 min dans du PBS 1x, puis montées dans du glycérol 90 %/PBS 1x.

Électrorétinogramme

Les drosophiles ont été collectées quotidiennement après émergence et transférées dans de nouveaux tubes d'élevage afin d'assurer un âge exact au moment du test, avec trois points d'analyse correspondant à 1, 15 et 25 jours post-éclosion. Pour chaque génotype testé, entre 10 et 15 mouches femelles par âge ont été analysées. Les mouches ont été fixées sur des lames en verre avec un adhésif double face de façon à orienter la tête toujours du même côté pour isoler l'œil et éviter tout mouvement sans pour autant blesser ou abîmer la mouche. Toutes les analyses ont été réalisées dans un environnement contrôlé et homogène : pièce dans l'obscurité, température constante de 22°C et même période horaire. Les électrodes d'enregistrement utilisées étaient des micro-capillaires en verre remplies de NaCl 1 M, une fois installées l'électrode de mesure a été posée sur la cornée tandis que l'électrode de référence a été insérée dans le thorax. Les mouches ont reçu des stimulations lumineuses par flashes de 1 s à ~1000 lux, 5 répétitions par mouche. Les paramétrages d'intensité, de durée et d'orientation du faisceau lumineux étaient identiques entre conditions et sessions d'expérimentation. Les enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés à l'aide du logiciel pCLAMP/Clampex. Les signaux ont ensuite été traités et analysés sous Clampfit et Igor Pro pour l'extraction des paramètres de réponse. La quantification et les analyses statistiques ont été effectuées sous R.

Électrophysiologie sur JNM

D'abord, des larves femelles ont été sélectionnées (absence des disques gonadiques) au 3^e stade. Elles ont ensuite été transférées dans une goutte de milieu HL3 froid sur une boîte recouverte de Sylgard. Les larves ont été épinglées, face dorsale vers le haut, à l'aide de deux épingles : l'une aux spiracles postérieurs, l'autre au niveau du pharynx. Une incision en "I" a ensuite été réalisée le long de la ligne médiane dorsale : d'abord une coupe transversale à l'extrémité postérieure, puis une coupe longitudinale dirigée vers l'extrémité antérieure. Après

ajout de quelques gouttes de milieu, les organes internes ont été retirés avec précaution, en conservant le cerveau, les motoneurones et la paroi musculaire. La concentration de CaCl_2 du milieu dans lequel la larve était immergée a ensuite été ajustée selon le paradigme : 2 mM pour les potentiels évoqués (EJPs) et les trains de stimulation, 0,5 mM pour l'enregistrement des potentiels spontanés (mEJPs). À ce moment-là, la chaîne nerveuse a été sectionnée pour rendre accessibles les projections des motoneurones.

Les enregistrements ont été réalisés à température ambiante. Les muscles 6/7 du segment abdominal A2 ont été identifiés. Le motoneurone innervant les muscles 6/7 a été identifié également et aspiré dans une électrode de stimulation. L'électrode de mesure a été délicatement introduite dans le muscle 6 en veillant bien à ne pas l'abîmer ni le transpercer. Les électrodes de référence ont été placées dans le milieu HL3 + CaCl_2 où la larve était immergée.

Les paramètres de stimulation et d'enregistrement étaient les suivants en fonction des analyses :

- Potentiel de jonction exciteur miniature (mEJP) : en 0,5 mM Ca^{2+} , enregistrement au repos (sans stimulation) pendant des fenêtres de 5 min.
- Potentiel de jonction exciteur évoqué (eEJP) : en 2 mM Ca^{2+} , stimulation 0,2 Hz (impulsions sub-maximales calibrées au début de chaque cellule), recueil d'un train de réponses isolées pour l'estimation d'amplitude.
- Trains : en 2 mM Ca^{2+} , stimulations 10 Hz (durée : 10min) pour évaluer la dynamique synaptique (dépression/facilitation).

Les analyses ont été conduites sous Clampfit puis R (agrégation, statistiques, graphes).

Culture primaire de neurones de rat

Des hippocampes ont été isolés à partir de rats nouveau-nés (P0–P1). Les dissections ont été réalisées dans du HBSS tamponné au HEPES froid. Après extraction des hippocampes, trois lavages successifs ont été effectués dans le milieu de dissection (HBSS/HEPES). Les tissus ont été incubés avec de la trypsine 0,04 % (0,5 mL par cerveau) pendant 5 min à 37°C sous agitation douce. La solution de trypsine a ensuite été retirée au maximum, puis l'enzyme neutralisée par addition de MEM + SVF (sérum de veau foetal) complété avec de la DNase. Les hippocampes ont de nouveau été lavés trois fois avec MEM/SVF. Les tissus ont été transférés dans 2 mL de milieu de culture Neurobasal-A (NBA) complété avec B27 et glutamate, puis dissociés doucement à la pipette. La suspension cellulaire a été centrifugée à 1 000 rpm pendant 8 min, le surnageant a été éliminé et le culot resuspendu dans 2 mL du même milieu. Les cellules ont été comptées, puisensemencées sur lamelles placées en

plaques 24 puits prétraitées au poly-D-lysine à la densité de 150 000 cellules par puits. Les cultures ont été maintenues à 37 °C, 5 % CO₂. Un changement complet de milieu a été réalisé à DIV1 (volume final 500 µL par puits). À DIV8, 250 µL de milieu ont été retirés par puits. Un mélange de milieu NBA contenant du Polybrene (5×) et des lentivirus (Figure 18) a été préparé et 50 µL ont été ajoutés par puits. Après 6 h d'incubation à 37 °C, le volume a été complété à 500 µL avec du milieu frais. Les neurones ont été maintenus en culture jusqu'à DIV21 pour permettre leur maturation.

Immunofluorescence

Les cellules ont été fixées pendant 20 minutes avec du PFA 4% puis rincées pendant 5 min au PBS 1x (70011-036). Les préparations ont ensuite été perméabilisées pendant 5 min à température ambiante dans une solution de PBS-Triton X-100 0,3 % (PBT 0,3 %), puis rincées et saturées pendant 2h à RT dans du PBT 0,1 % complété de 5 % de sérum d'âne normal (NDS) et 5 % de sérum de chèvre normal (NGS) sous agitation douce. Les anticorps primaires ont ensuite été incubés une nuit à 4 °C dilués dans du PBT 0,1 % soit directement en plaques sous agitation, soit sur lamelles en retournant la lamelle sur une goutte (~50 µL) (sans agitation). Après trois rinçages et trois lavages (PBS 1×, 5–10 min), les anticorps secondaires conjugués ont été appliqués 2 h à RT à l'obscurité dans du PBT 0,1 %, suivis des mêmes séquences de rinçages et de lavages. Lorsque requis, une contre-coloration nucléaire a été réalisée au Hoechst 33342 (1/10 000, 5 min), suivie de rinçages dans du PBS 1x. Les lamelles ont été montées dans un milieu aqueux Fluoromount, tandis que les préparations en plaques ont été conservées avec une fine couche de glycérol pour éviter le dessèchement, à 4 °C et à l'abri de la lumière jusqu'à l'acquisition. Des contrôles sans anticorps primaires, avec anticorps secondaires seuls ont systématiquement été inclus pour évaluer le bruit de fond et la spécificité. Selon les expériences, les jeux d'anticorps pouvaient varier (Figure 17). Les observations et les acquisitions d'images ont été réalisées avec un microscope confocal de type Spinning Disk.

Proximity Ligation Assay

Pour l'expérience de proximité par ligation, le kit Duolink In Situ Detection Reagents Orange (Merck/Sigma-Aldrich, réf. DUO92007) a été utilisé selon les consignes du fabricant. Toutes les solutions de saturation, de dilution des anticorps, les tampons ligase et polymérase, ainsi que les sondes PLUS et MINUS, provenaient de ce kit.

Les cellules ont été perméabilisées avec du PBT 0,3% pendant 5 minutes. Le blocage a été effectué avec du DuoLink Blocking Solution 1x pendant 2h à 37°C en bain-marie. Les lamelles ont été incubées avec les anticorps primaires (Figure 17) dans la solution DuoLink AC Diluent pendant une nuit à 4°C. Après incubation, les lamelles ont été rincées trois fois et lavées trois fois avec du Wash Buffer A (DUOLINK) 1x pendant 10 minutes. Les anticorps secondaires couplés à des séquences nucléotidiques (sonde anti-mouse MINUS Duolink et sonde anti-rabbit PLUS Duolink), dilués à 1/5 dans Duolink AC Diluent, ont ensuite été incubés pendant 1 h à 37 °C en bain-marie. Au cours de cette étape, ces sondes reconnaissent les anticorps primaires et si les deux protéines ciblées sont suffisamment proches, les séquences nucléotidiques des sondes peuvent s'hybrider. Une boucle nucléotidique est ensuite formée à partir de cette hybridation de séquence grâce à une ligase diluée à 1/40 dans Duolink Ligation Buffer 1x, incubée pendant 30 minutes à 37°C en bain-marie. La boucle est ensuite amplifiée avec des nucléotides fluorescents dans une étape de polymérisation. La polymérase diluée à 1/80 dans Duolink Amplification Buffer 1x a été incubée pendant 2 heures à 37°C en bain-marie (Figure 16). Pour la contre-coloration, les lamelles ont été incubées avec des anticorps primaires une nuit à 4°C dans du PBT0.1%. Après une nouvelle série de rinçages et lavages, les anticorps secondaires dans du PBT0,1% ont été ajoutés sur les lamelles pendant 2h sous agitation à température ambiante. Pour finir, les lamelles, une fois rincées et lavées, ont été montées sur lame dans du milieu Fluoromount. Les observations et acquisitions d'images ont été réalisées avec un microscope confocale de type Spinning Disk.

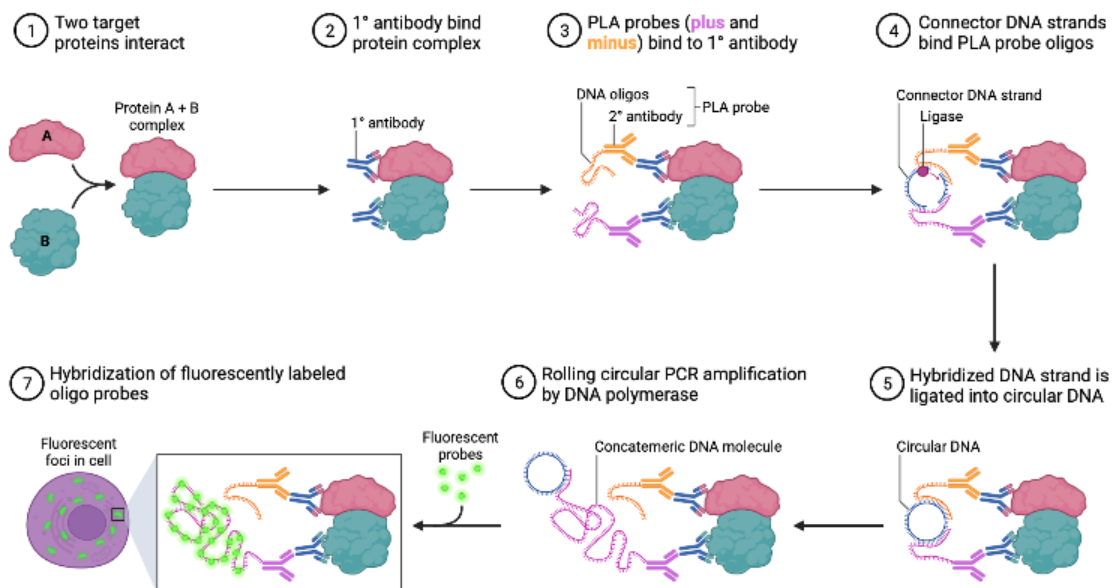


Figure 16. Principe du Proximity Ligation Assay (PLA). Deux protéines cibles en interaction sont reconnues par des anticorps primaires (1–2). Des sondes PLA complémentaires (plus et minus) se lient aux anticorps secondaires (3), puis sont rapprochées et ligaturées (4–5). L'ADN circulaire formé est

amplifié par PCR en cercle roulant (6) et révélé par hybridation de sondes fluorescentes, générant des foyers visibles correspondant aux interactions protéine–protéine (7). Figure créée avec BioRender.com.

Western Blot

Les protéines ont été extraites à l'aide d'un tampon de lyse LDS 4× complété avec un agent réducteur 1×. Un volume de 100 µL par puits a été ajouté, puis la lyse a été effectuée par grattage mécanique au cône de pipette. Les extraits protéiques, précédemment congelés à -80 °C, ont été décongelés sur glace puis soniqués à l'aide d'un sonicateur Fisher Scientific FB120 (120 W, 20 kHz), réglé sur 60 % d'amplitude. Les lysats ont ensuite été dénaturés pendant 5 min à 95 °C, replacés sur glace et brièvement centrifugés. Un gel NuPAGE 4–12 % Bis-Tris a été monté dans une cuve avec du tampon MOPS 1× (ClearLine 257086) pour la séparation des protéines de masse moléculaire inférieure à 200 kDa, et un gel NuPAGE 3–8 % Tris-acétate a été monté dans une cuve avec du tampon Tris-acétate 1× (Novex 1771522) pour les protéines de masse moléculaire supérieure à 200 kDa. Cinq microlitres de marqueur de masse moléculaire (Invitrogen 57318 pour les protéines inférieures à 200 kDa, Invitrogen LC5699 pour les protéines supérieures à 200 kDa) ont été déposés dans le premier puits, tandis que 7 µL d'échantillon protéique ont été chargés dans chacun des autres puits. La migration a été réalisée pendant environ 1 h à 150 V. Le transfert s'est fait en semi-humide sur une machine Bio-Rad Trans-Blot Turbo. Les membranes ont été rincées, colorées au Rouge Ponceau pendant 1 min pour contrôle du chargement, puis rincées à l'eau. Elles ont ensuite été bloquées pendant 2 h à RT dans du TNT 1× additionné de 5 % de lait, sous agitation, rincées, puis incubées une nuit à 4 °C dans du tampon SuperBlock (ThermoFisher 37535) contenant l'anticorps primaire approprié. Après trois rinçages et trois lavages de 10 min au TNT 1×, les membranes ont été incubées pendant 2 h à RT avec l'anticorps secondaire approprié couplé à l'enzyme HRP dans du TNT 1× + 5 % de lait, puis lavées trois fois 10 min au TNT 1× et révélées avec la solution Classico substrat HRP (Millipore WBLUC0500) pendant 1 min. Les membranes ont ensuite été conservées quelques jours à 4 °C dans du TNT 1×, puis séchées et archivées. Les images ont été exportées en format TIFF. La densité des bandes a été mesurée sous ImageJ/Fiji, et les intensités cibles ont été normalisées par rapport à un contrôle de chargement (actine ou tubuline).

Microscopie

Les préparations (lames contenant les échantillons de Drosophiles ou les lamelles de cultures primaires de neurones hippocampiques de rat) ont été imagées à l'aide d'un microscope inversé à disque tournant (spinning disk) Roper Live-SR (Nikon - Gataca Systems, tête Yokogawa CSU-W1) disponible sur le plateau de microscopie photonique BICEL sur le campus

de l'Institut Pasteur de Lille. Les acquisitions ont été réalisées avec le logiciel Metamorph. De manière générale, une acquisition en grand champ a d'abord été effectuée (objectifs 10× ou 20×) afin d'obtenir une vue globale de l'échantillon. Des acquisitions plus ciblées ont ensuite été réalisées sur les zones d'intérêt, avec des objectifs à plus fort grossissement (40×, 60× ou 100×). Toutes les acquisitions ont été réalisées sous le module de super-résolution Live-SR, et les images ont été déconvoluées directement via Metamorph. Lorsque la zone d'intérêt ne pouvait être couverte dans un seul champ, des mosaïques d'images ont été acquises. Ces mosaïques ont ensuite été assemblées (stitching) avec le logiciel ImageJ/Fiji. En fonction des expériences et des paramètres à quantifier, les images ont été traitées et analysées soit avec ImageJ/Fiji soit avec IMARIS.

Analyse d'images

Pour l'étude morphologique des JNMs, les images confocales ont été analysées avec le logiciel ImageJ/Fiji. Après acquisition, les structures d'intérêt comme les boutons synaptiques ont été délimitées à l'aide d'un détourage manuel. Pour la quantification des ramifications, l'outil « Lignes segmentées » a été utilisé. Les aires synaptiques ont été segmentées par application de seuils (Threshold puis Intermode) adaptés à chaque canal, permettant l'isolation spécifique de la zone d'intérêt. La quantification a été réalisée par la fonction « Analyse de particules » afin d'obtenir des mesures standardisées de nombre, d'aire et de périmètre. Pour la quantification des zones actives, l'outil « Multi-point » a été utilisé.

Pour les cultures de neurones de mammifère, l'analyse des signaux d'immunofluorescence (points PLA, marquages synaptiques Homer et Synaptophysine, ainsi que le volume dendritique marqué par MAP2) a été effectuée avec le logiciel IMARIS (Bitplane, Oxford Instruments). Les objets ont été reconstruits en 3D par la fonction de création de surfaces et de spots, en combinant des options de masking pour isoler les signaux d'intérêt. Les paramètres utilisés incluaient un ajustement du background threshold (seuil de fond), la prise en compte de la qualité du signal, ainsi que la définition des voxels et des volumes minimums afin de garantir une détection spécifique et reproductible.

Tests statistiques

Les analyses ont été réalisées sous R. Pour chaque jeu de données, la normalité a été évaluée par un test de Shapiro–Wilk. Lorsque la normalité était vérifiée et que l'homogénéité des variances était vérifiée, les comparaisons entre ≥ 3 groupes ont été effectuées par ANOVA, suivie d'un test post-hoc de Tukey (Tukey HSD) pour les comparaisons par paires. Lorsque l'hypothèse de normalité n'était pas satisfaite, l'effet global a été testé par Kruskal–Wallis

(bilatéral, $\alpha = p0,05$). En cas de résultat significatif, les comparaisons multiples ont été réalisées par test de Dunn avec correction de Holm pour les p-valeurs ajustées. Sauf mention contraire, les tests sont bilatéraux et le seuil de significativité est fixé à $p < 0,05$.

Liste des anticorps

pPTK2B Y402 rb	Abcam Cat# ab4800, RRID:AB_2173988
PTK2B poly Rb	Sigma-Aldrich Cat# P3902, RRID:AB_261041
PTK2B ms	Cell Signaling Technology Cat# 3480, RRID:AB_2174093
BIN1 99D ms	Millipore Cat# 05-449, RRID:AB_309738
BIN1 ms	Abcam Cat# ab54764, RRID:AB_940581
BIN1 rb	Abcam Cat# ab182562, RRID:AB_3669062
BIN1 rb	Abcam Cat# ab27796, RRID:AB_725699
GFAP ck	Synaptic Systems Cat# 173 006, RRID:AB_2619873
α -tubulin ms	Sigma-Aldrich Cat# T9026, RRID:AB_477593
Actin poly rb	Sigma-Aldrich Cat# A2066, RRID:AB_476693
GFP poly rb	Sigma-Aldrich Cat# G1544, RRID:AB_439690
Homer1 ck	Synaptic Systems Cat# 160 006, RRID:AB_2631222
Synaptophysin ms	Synaptic Systems Cat# 101 011, RRID:AB_887824
Synaptophysin ms645	Synaptic Systems Cat# 101 011C5, RRID:AB_887823
Synaptophysin ms488	Synaptic Systems Cat# 101 011C2, RRID:AB_10890165
BruchPilot	DSHB Cat# nc82, RRID:AB_2314866
Disc Large	DSHB Cat# 4F3 anti-discs large, RRID:AB_528203
HRP-488	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 123-545-021, RRID:AB_2338965
Guinea-pig-647	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 706-605-148, RRID:AB_2340476
Guinea-pig-594	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 706-585-148, RRID:AB_2340474
Guinea-pig-488	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 706-545-148, RRID:AB_2340472
Guinea-pig-405	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 706-475-148, RRID:AB_2340470
Mouse-647	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 715-605-151, RRID:AB_2340863
Mouse-594	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 715-585-151, RRID:AB_2340855
Mouse-488	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 715-545-151, RRID:AB_2341099
Mouse-405	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 715-475-151, RRID:AB_2340840
Rabbit-647	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 711-605-152, RRID:AB_2492288
Rabbit-594	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 711-585-152, RRID:AB_2340621
Rabbit-488	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 711-545-152, RRID:AB_2313584
Rabbit-405	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 711-475-152, RRID:AB_2340616
Chicken-647	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 703-605-155, RRID:AB_2340379
Chicken-594	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 703-585-155, RRID:AB_2340377
Chicken-488	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 703-545-155, RRID:AB_2340375
Chicken-405	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 703-475-155, RRID:AB_2340373
Rabbit-HRP	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 111-035-003, RRID:AB_2313567
Mouse-HRP	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 115-035-003, RRID:AB_10015289
Guinea-Pig-HRP	Jackson ImmunoResearch Labs Cat# 106-035-003, RRID:AB_2337402

Figure 17. Tableau des anticorps utilisés dans ce projet détaillant la cible et la référence ainsi que le code RRID.

Liste des lentivirus

shBIN1	pLKO.1-puro-CMV-tGFP	Merck TRCN0000380439
shNT	pLKO.1 puro	Merck SHC002V
shPTK2B 0696	pLKO.1 hpGK neo	Merck TRCN0000350696
shPTK2B 1963	pLKO.1 hpGK neo	Merck TRCN0000321963

shPTK2B 1440	pLKO.1 Neo	Merck TRCN0000361440
shPTK2B 1441	pLKO.1 Neo	Merck TRCN0000361441
shPTK2B 1378	pLKO.1 Neo	Merck TRCN0000361378
shPTK2B	pLV	VectorBuilder VB220929-1074eeq
shPTK2B	pLV	VectorBuilder VB220929-1077ttq

Figure 18. Tableau des lentivirus utilisés dans ce projet détaillant la cible, le vecteur d'origine et la référence de chacun

Résultats

Objectif 1 : Caractérisation de l'impact de la surexpression de BIN1 isoforme 1 sur la JNM de la Drosophile et de son sauvetage par Rab11

En amont des résultats présentés ci-après, nos travaux récents au sein de ce manuscrit (Lambert et al 2025, Annexe 1) ont montré que l'expression neuronale de BIN1 isoforme 1 entraîne, en amont de toute dégénérescence, une altération précoce de la transmission synaptique des photorécepteurs, concomitante à l'accumulation de vésicules endosomales anormalement dilatées dans les terminaisons présynaptiques (Lambert et al 2025). Ces observations prolongent des résultats antérieurs établissant que la toxicité de BIN1 est dépendante de l'isoforme 1 et associée à des défauts du trafic endolysosomal ; défauts qui peuvent être modulés par des régulateurs des endosomes précoces et de recyclage, notamment Rab11 (Lambert et al 2022). Pris ensemble, ces éléments soutiennent l'hypothèse que BIN1 iso 1 exerce une synaptotoxicité initiale, vraisemblablement présynaptique, liée à un dérèglement du trafic endosomal. C'est dans ce cadre que nous avons examiné l'impact de BIN1 iso 1 au niveau de la jonction neuromusculaire (JNM).

Impact des différentes isoformes de BIN1 sur la JNM

Afin d'évaluer directement l'impact d'une dérégulation de BIN1 sur la morphologie synaptique, j'ai choisi d'exprimer spécifiquement différentes isoformes de BIN1 dans les motoneurones de Drosophile grâce à un promoteur NSyb dans un système Gal4-UAS (Brand et al 1993). Cette approche permet de tester la capacité de BIN1 à induire des altérations morphologiques à la JNM et de comparer l'effet potentiel de plusieurs isoformes : BIN1 iso 9 ubiquitaire, BIN1 iso 8 musculaire et BIN1 iso 1 neuronale. J'ai ainsi réalisé une caractérisation morphométrique détaillée des JNM des muscles 6 et 7 du segment A2 des larves. Pour cela, j'ai combiné des marquages présynaptiques anti-HRP et postsynaptiques anti-Discs large, avant d'effectuer l'analyse quantitative des paramètres morphologiques. Pour distinguer les cellules

musculaires, j'ai également effectué un marquage à la phalloïdine, et pour visualiser les zones actives, un marquage anti-Bruchpilot.

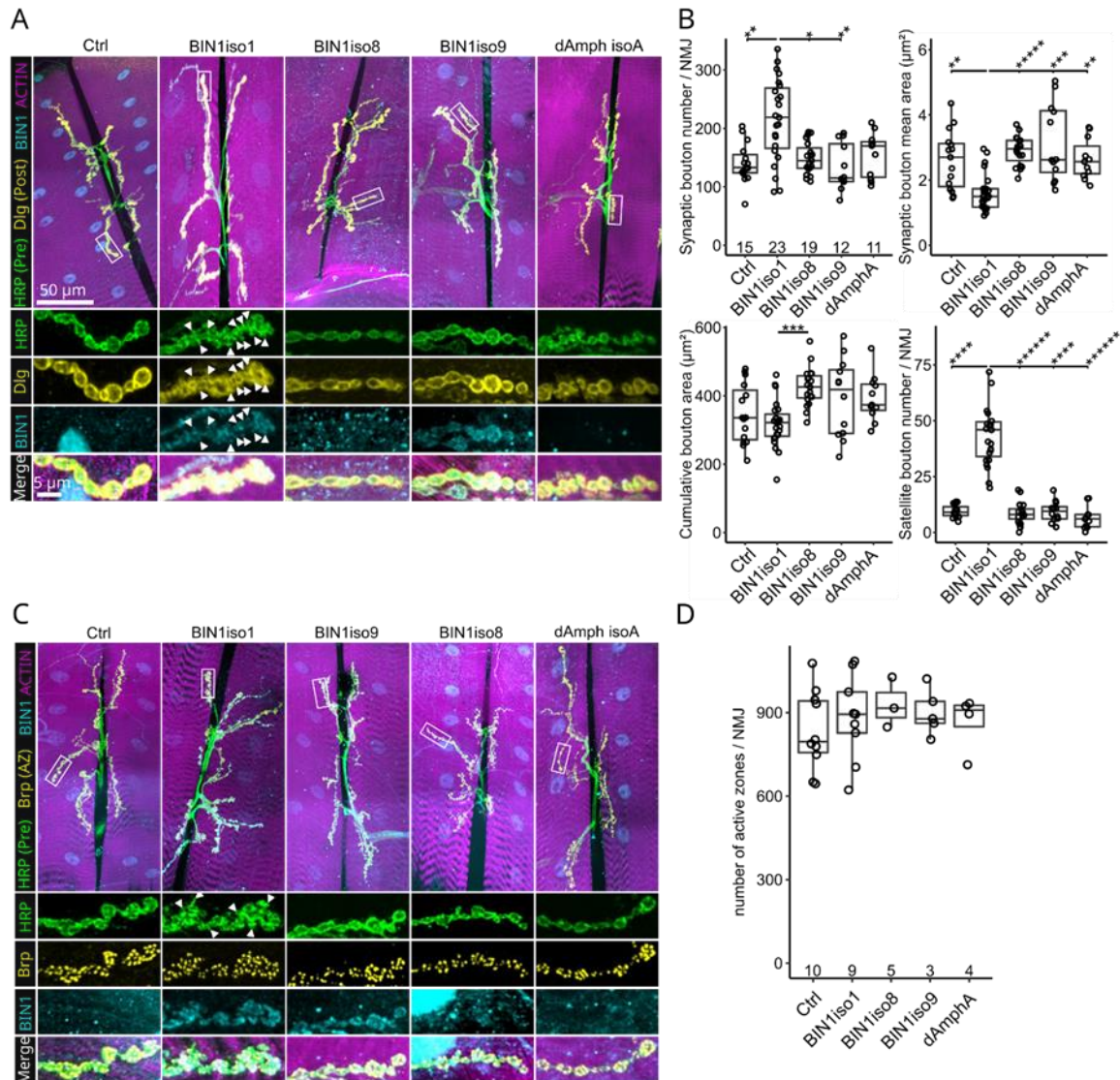


Figure 19. L'isoforme BIN1 iso1 induit des altérations morphologiques des jonctions neuromusculaires (JNM) de *Drosophile* sans modifier le nombre de zones actives. (A) Immunofluorescence de JNM de larves de 3^e stade exprimant BIN1 iso1, BIN1 iso8, BIN1 iso9, dAmph isoA ou la luciférase (contrôle) dans les motoneurones sous le promoteur Nsyb. Les marquages HRP, Dlg et actine sont utilisés respectivement pour visualiser les terminaisons des motoneurones, les compartiments post-synaptiques et les cellules musculaires. Les têtes de flèche indiquent la présence de boutons satellites. (B) Quantification des paramètres morphométriques des JNM : nombre de boutons par JNM, aire moyenne d'un bouton, aire cumulée de l'ensemble des boutons par JNM et nombre de boutons satellites par JNM. Le nombre de JNM analysées par condition est indiqué en bas du graphique en haut à gauche. Les données ont été analysées avec un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn (méthode de Holm ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 1,10^{-3}$, **** $p < 1,10^{-4}$, ***** $p < 1,10^{-5}$, ***** $p < 1,10^{-6}$). (C) Immunofluorescence de JNM de larves de 3^e stade exprimant BIN1 iso1, BIN1 iso8, BIN1 iso9, dAmph isoA ou la luciférase (contrôle) dans les motoneurones sous le promoteur Nsyb. Les marquages HRP, Brp et actine sont utilisés respectivement pour visualiser les terminaisons motoneuronales, les zones actives et les

cellules musculaires. Les têtes de flèche indiquent les boutons satellites. (D) Quantification du nombre de zones actives par JNM. L'analyse non paramétrique de Kruskal-Wallis n'a montré aucune différence statistiquement significative entre les conditions.

L'expression neuronale de différentes isoformes de BIN1 à la JNM de la Drosophile révèle un effet spécifique de l'iso1 neuronale sur l'architecture synaptique. L'isoforme neuronale humaine BIN1 iso1 induit une augmentation significative du nombre total de boutons synaptiques, associée à une réduction de leur aire moyenne et à une hausse marquée de la proportion de boutons satellites, témoignant d'une arborisation terminale altérée (Figure 19, A et B). Les boutons satellites sont de petites excroissances synaptiques qui bourgeonnent à partir d'un bouton principal et y restent reliées par un col étroit, généralement interprétées comme des unités immatures témoignant d'une croissance terminale exacerbée (Menon et al 2013, Dickman et al 2006). En revanche, les isoformes BIN1 iso8 et BIN1 iso9 ainsi que l'orthologue Drosophile Amph n'entraînent pas de modifications majeures de ces paramètres par rapport au contrôle. Ces résultats indiquent que BIN1 iso1 exerce un effet synaptotoxique particulier, caractérisé par une fragmentation morphologique des terminaisons motoneuronales. L'analyse des zones actives par le marquage de Bruchpilot (Brp) ne met toutefois en évidence aucune différence significative entre les conditions, suggérant que la synaptotoxicité induite par BIN1 iso1 affecte principalement la morphogenèse des boutons sans perturber la densité apparente des sites de libération présynaptiques (Figure 19, C et D). Dans l'ensemble, ces données prouvent l'existence d'une vulnérabilité synaptique spécifique à l'iso1 de BIN1 au niveau de la JNM des larves de Drosophile.

Étude du sauvetage de l'effet de BIN1 iso1 sur la JNM de la Drosophile par Rab11

Après avoir établi que l'expression neuronale de BIN1 isoforme 1 induit à la JNM une augmentation du nombre de boutons synaptiques ainsi que l'apparition de boutons satellites immatures, nous avons cherché à déterminer si ces altérations morphologiques pouvaient résulter d'une perturbation du trafic membranaire.

BIN1 est en effet un acteur reconnu de la dynamique membranaire et de l'endocytose (Wigge et al 1997, Pant et al 2009, Ramjaun et al 1998), et plusieurs études ont montré que des défauts d'endocytose ou de recyclage s'accompagnent de la formation de boutons satellites à la JNM, reflet d'une croissance synaptique aberrante (Menon et al 2013, Dickman et al 2006). Par ailleurs, dans les photorécepteurs, les anomalies induites par BIN1 iso 1 au niveau du corps cellulaire avaient pu être partiellement corrigées par la co-expression de Rab11, un régulateur clé de l'endosome de recyclage (Lambert et al 2022).

Ces éléments suggéraient que le phénotype observé à la JNM pourrait également impliquer un dysfonctionnement de la voie endosomale de recyclage, et nous ont conduit à tester si la stimulation de cette voie via Rab11 pouvait compenser les effets délétères de BIN1 iso 1 à la jonction neuromusculaire.

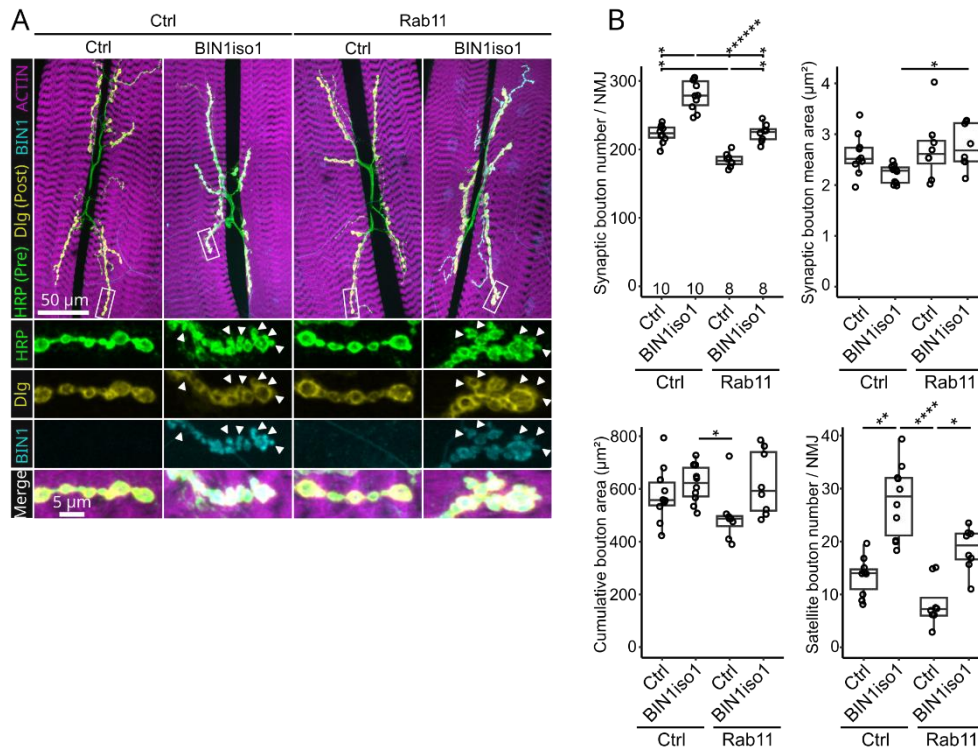


Figure 20. Rab11 n'empêche pas les défauts morphologiques induits par BIN1 iso1 aux jonctions neuromusculaires larvaires. (A) Immunofluorescence de JNM de larves de 3^e stade exprimant BIN1 iso1 et/ou Rab11 dans les motoneurones (driver *Nsyb*). *mCD8::GFP* et la luciférase sont utilisés comme contrôles respectifs pour Rab11::GFP et BIN1 iso1. Les marquages HRP, Dlg et actine sont utilisés respectivement pour visualiser les terminaisons motoneuronales, les compartiments post-synaptiques et les cellules musculaires. (B) Quantification des paramètres morphométriques des JNM : nombre de boutons par JNM, aire moyenne d'un bouton, aire cumulée de l'ensemble des boutons par JNM et nombre de boutons satellites par JNM. Le nombre de JNM analysées par condition est indiqué en bas du graphique en haut à gauche. Les données ont été analysées par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de comparaisons multiples de Dunn (méthode de Holm ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 1,10^{-4}$, ***** $p < 1,10^{-6}$).

La co-expression de Rab11 avec BIN1 iso1 n'a pas restauré la morphologie des jonctions neuromusculaires larvaires : l'augmentation du nombre total de boutons et la surabondance de boutons satellites persiste. Par ailleurs, l'expression de Rab11 seul induit un léger accroissement du nombre de boutons avec un effet d'addition dans la condition BIN1 iso1+Rab11, indiquant que Rab11 peut moduler la croissance synaptique (Figure 20).

Ces résultats montrent que la synaptotoxicité induite par BIN1 iso1 ne se corrige pas par la simple stimulation du recyclage endosomal dépendant de Rab11. Ils suggèrent un verrou situé en amont du recyclage, ou la contribution de mécanismes parallèles non strictement endosomaux.

Dans l'ensemble, ce premier projet met en évidence un effet spécifique de l'isoforme 1 de BIN1 sur la morphologie synaptique : BIN1 iso 1 altère l'architecture de la JNM de la Drosophile en augmentant le nombre de boutons et de boutons satellites tout en réduisant leur aire moyenne, sans affecter le nombre de zones actives. Étant donné le rôle de BIN1 dans le trafic membranaire, nous avons ensuite testé si la stimulation de la voie de recyclage endosomal, via la co-expression de Rab11, pouvait compenser les altérations induites par BIN1 iso 1. Cette manipulation n'a pas permis de corriger les défauts observés, suggérant que la synaptotoxicité de BIN1 iso 1 repose sur d'autres mécanismes que la seule perturbation du trafic endosomal médié par Rab11.

Ce travail confirme donc la capacité de BIN1 iso 1 à provoquer des défauts structuraux au niveau présynaptique et souligne la spécificité fonctionnelle des isoformes de BIN1. Au-delà de ces résultats, ce projet a constitué pour moi une première étape essentielle dans l'exploration expérimentale de la jonction neuromusculaire et des synapses. Il m'a permis d'acquérir les outils conceptuels et techniques nécessaires à l'analyse morphofonctionnelle de la JNM, compétences qui se sont révélées utiles pour la suite de mon travail de thèse. Enfin, il a donné lieu à une première contribution scientifique concrétisée par ma participation, en tant que co premier auteur.

En complément de mes analyses à la JNM, l'étude (présentée en annexe 1) approfondit le rôle de BIN1 isoforme 1 dans des systèmes neuronaux distincts et converge vers une toxicité présynaptique spécifique. Dans les neurones photorécepteurs de Drosophile, l'expression de BIN1 iso1 entraîne une altération précoce de la transmission synaptique avant la dégénérescence, et s'accompagne d'accumulations vésiculaires de grande taille au compartiment présynaptique, confirmées en microscopie électronique. Dans un modèle de neurones hippocampiques de rat cultivés en dispositifs microfluidiques à trois compartiments (pré / synapse / post), la surexpression présynaptique de BIN1 iso1 et non la surexpression postsynaptique réduit la connectivité synaptique morphométrique et diminue la connectivité fonctionnelle au niveau réseau sans altérer ni la fréquence moyenne de décharge ni l'amplitude des unités. À l'inverse, BIN1 Iso9 n'induit pas ces effets, soulignant la spécificité d'isoforme.

Pris ensemble, ces résultats *in vivo* et *in vitro* étendent et renforcent nos données à la JNM en positionnant BIN1 iso1 comme un modulateur présynaptique de l'intégrité synaptique, avec des effets spécifique à l'isoforme 1, répliqués à travers plusieurs systèmes.

Objectif 2 : Caractérisation de l'interaction entre les facteurs de risque génétique *BIN1* et *PTK2B* de la maladie d'Alzheimer

Étude *in vivo* chez la Drosophile

Le second objectif de ma thèse visait à explorer l'existence d'une interaction fonctionnelle entre *BIN1* et *PTK2B* aux synapses, en s'appuyant sur leurs orthologues présents chez la Drosophile : *Amph* et *Fak*. Cet objectif s'est construit à partir de plusieurs prérequis exposé lors de l'introduction : (i) l'implication génétique de *BIN1* et *PTK2B* comme facteurs de risque majeurs de la maladie d'Alzheimer, (ii) les données biochimiques et structurales suggérant une interaction directe entre BIN1 et PTK2B, et (iii) les phénotypes décrits chez la Drosophile, où *Amph* est impliqué dans la morphogenèse synaptique et le comportement locomoteur (Zelhof et al 2001, Leventis et al 2001, Mathew et al 2003), tandis que *Fak* module la croissance de la jonction neuromusculaire et restreint l'expansion synaptique via la signalisation intégrine/MAPK (Tsai et al 2008, Tsai et al 2012). Ces observations ont guidé le choix de nos phénotypes morphologiques (nombre de boutons synaptiques, ramifications, aire synaptique, distribution de Dlg et des zones actives), et fonctionnels (locomotion, susceptibilité aux crises d'épilepsie, électrophysiologie, électrorétinogramme).

Notre approche a été organisée en deux volets complémentaires : d'abord une analyse *in vivo* à la jonction neuromusculaire de la larve de Drosophile, grâce à des lignées recombinantes combinant les mutations de *Fak* et d'*Amph* afin de révéler des phénomènes d'addition, d'épistasie et de synergie, puis une transposition chez les mammifères, dans des neurones hippocampiques primaires de rats, pour évaluer la pertinence de cette interaction dans un contexte plus proche de la physiopathologie humaine.

Génétique de la Drosophile : caractéristiques des délétions *Amph* et *Fak*

Pour investiguer l'interaction fonctionnelle entre *Amph* et *Fak*, notre stratégie a consisté à utiliser des lignées perte de fonction pour chacun de ces gènes et à générer un double mutant combinant les deux délétions. L'objectif était d'évaluer, dans un même fond génétique, l'effet de la perte d'un gène sur le phénotype associé à la perte de l'autre, et inversement. Cette approche s'appuie sur l'existence de phénotypes macroscopiques et morphologiques présentés en introduction déjà décrits pour *Amph* et pour *Fak*, notamment au niveau de la

JNM, et permet de tester si ces altérations relèvent d'une voie commune ou de modules parallèles qui se compensent ou se potentialisent.

Historiquement, la lignée *Amph*²⁶ a été obtenue et caractérisée au début des années 2000, dans la continuité des travaux de Zelhof et collaborateurs, puis affinée par des analyses complémentaires qui ont confirmé la perte d'expression de la protéine *Amph* et documenté ses conséquences neuromusculaires. Quelques années plus tard, Grabbe et collègues ont décrit un allèle délété de *Fak56*, noté *DFak56*^{CG1}, dans un contexte d'étude des fonctions d'adhésion et de la viabilité. Ces deux ressources génétiques constituent aujourd'hui des références pour l'analyse des fonctions d'*Amph* et de *Fak* *in vivo* et offrent un outil particulièrement intéressant pour interroger leur interaction.

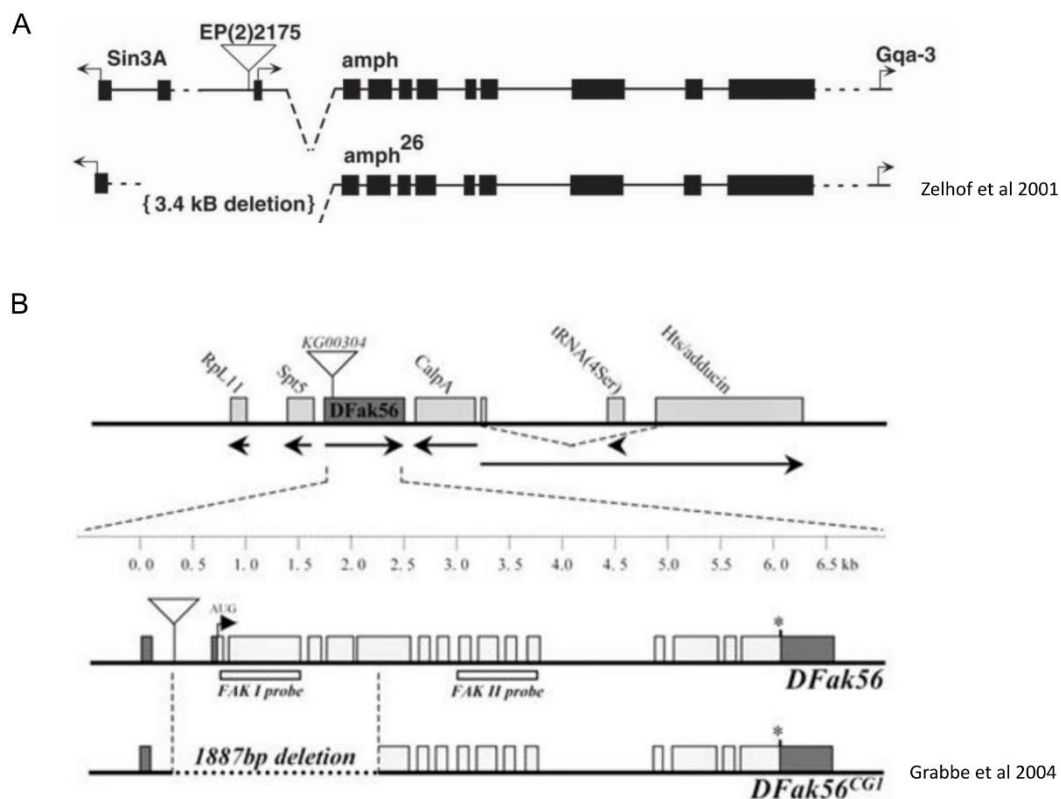


Figure 21. Description des allèles perte de fonction pour *Amph* et *Fak*. (A) *Amph*²⁶ : obtenu par excision imprécise de l'élément P EP(2)2175 en 5' de *Amph* ; la délétion retire l'exon 1 et s'étend dans l'intron 1, abrogeant l'expression d'*Amph* (allèle nul) (Zelhof et al 2001, Razzaq et al 2001). (B) *DFak56*^{CG1} : issu de l'excision imprécise de l'élément P KG03004 en 5' de *Fak56* ; la délétion enlève le P-élément et 1 887 pb du locus, supprimant la séquence 5' du gène (perte de fonction) (Grabbe et al 2004).

Chez la *Drosophile*, l'allèle *Amph*²⁶ a été obtenu par excision imprécise d'un élément P inséré en amont du gène *Amph*. L'activité de la transposase a provoqué une perte d'ADN qui emporte

l'exon initial et s'étend dans l'intron suivant, pour une délétion d'environ 3,4 kilobases. Cette lésion supprime le début du cadre de lecture et abolit l'expression de la protéine *Amph* (Figure 21, A). Dans l'étude décrivant cette délétion, la cartographie a été réalisée par Southern blot et par amplification ciblée, puis l'absence de produit protéique a été confirmée par analyses immunologiques. Une lignée issue d'une excision précise a servi de témoin isogénique (Zelhof et al 2001, Razzaq et al 2001).

L'allèle *DFak56^{CG1}* a été généré selon une approche comparable. L'excision imprécise d'un élément P localisé en région cinq prime du locus *Fak* a retiré l'insert ainsi qu'une portion du gène, pour une délétion de 1887 pb. La coupure supprime la séquence d'initiation et entraîne une perte de fonction de *Fak* (Figure 21, B). Dans l'étude, l'étendue de la délétion a été établie par hybridation avec deux sondes indépendantes et par PCR, puis les lignées mutantes ont été caractérisées sur le plan phénotypique (Grabbe et al 2004).

Ces deux lignées, viables et fertiles, fournissaient ainsi un socle génétique pour tester l'existence d'une interaction entre *Amph* et *Fak*. Afin d'en apprécier les effets combinés, j'ai ensuite mis en place une recombinaison entre les délétions *Amph²⁶* et *Fak^{CG1}* que je présente dans la section suivante.

Génétique de la Drosophile : création des lignées recombinantes doubles mutantes *Amph* et *Fak*

Afin d'évaluer *in vivo* l'existence d'une interaction fonctionnelle entre *Amph* et *Fak* à la JNM, j'ai donc construit des lignées double-mutantes par recombinaison chromosomique à partir des allèles délétés disponibles pour les deux gènes, puis vérifié les génotypes par PCR. Ce design place l'ensemble des génotypes dans un même fond génétique commun puisqu'ils proviennent du même schéma de croisement et sont élevés dans des conditions identiques. Il ne s'agit toutefois pas d'un fond isogénique au sens strict en l'absence de cycles répétés de rétrocroisements, des effets de fond résiduels peuvent persister. Pour limiter ce biais, j'ai privilégié des comparaisons réalisées au sein de lignées issues du même événement de recombinaison et élevées simultanément (Figure 22, A). Ce dispositif permet de tester explicitement l'interaction génétique entre *Amph* et *Fak* : en examinant si le phénotype du double mutant s'écarte de l'addition attendue des effets des simples mutants. Une déviation vers une sévérité accrue traduirait une synergie fonctionnelle, tandis qu'une atténuation ou une suppression du phénotype attendu indiquerait une relation épistatique à condition toutefois que le mutant ajouté ne présente pas, seul, un effet marqué sur le paramètre considéré.

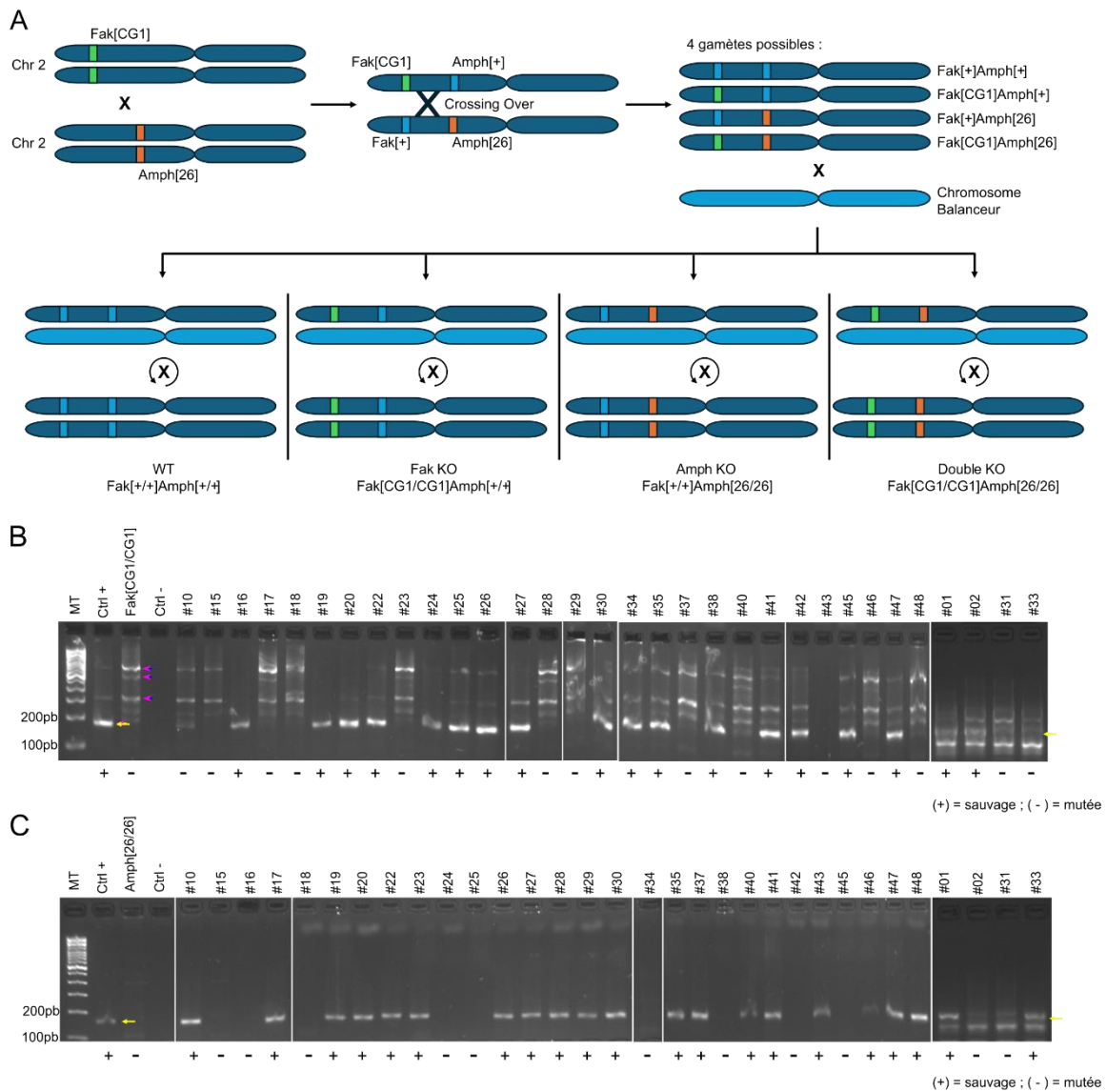


Figure 22. Génération sur le chromosome II et validation par PCR des lignées recombinantes Fak^{CG1} et Amph²⁶. (A) Schéma du protocole génétique. Les allèles délétés Fak^{CG1} et Amph²⁶, localisés sur le chromosome II, ont été mis en présence par croisement afin de permettre un événement de recombinaison homologue (crossing-over) entre les deux loci. La méiose produit quatre types de gamètes, incluant les combinaisons simples et doubles mutantes. Les recombinants d'intérêt ont ensuite été isolés à l'aide d'un balancer du chromosome II (type CyO), puis stabilisés. Le schéma récapitule les génotypes parentaux, l'événement de crossing-over et les classes génotypiques attendues (WT, simples mutants et doubles mutants). (B) Validation des recombinants au locus Fak par PCR génomique. Le couple d'amorces flanquant la délétion Fak^{CG1} donne une bande sauvage à 183 pb (flèche jaune). Les échantillons #16, #19, #20, #22, #24, #25, #26, #27, #30, #34, #35, #38, #41, #42, #45, #47 présentent la bande WT attendue. À l'inverse, les échantillons #01, #02, #10, #15, #17, #18, #23, #28, #29, #31, #33, #37, #40, #43, #46, #48 affichent un profil identique au mutant de référence Fak^{CG1} (flèches magenta), confirmant leur statut Fak KO. (C) Validation des recombinants au locus Amph par PCR génomique. Le couple d'amorces flanquant la délétion Amph²⁶ donne une bande sauvage à 160 pb (flèche jaune). Les échantillons #01, #02, #10, #17, #19, #20, #22, #23, #26, #27, #28, #29, #30, #33, #35, #37, #40, #41, #43, #47, #48 présentent la bande WT attendue. Les lignées #04, #15, #16, #18, #24, #25, #31, #34, #38, #42, #45, #46 montrent un profil identique au mutant Amph²⁶, validant leur statut Amph KO.

Les profils PCR permettent de classer sans ambiguïté les recombinants et d'identifier les homozygotes simples et doubles mutants. Au locus Fak, la présence de la bande WT (183 pb) distingue les individus sauvages, tandis que l'absence de cette bande et la concordance du profil de migration (amplification aspécifique) avec le contrôle Fak^{CG1} valident les Fak KO (Figure 22, B). Au locus Amph, la bande WT (160 pb) désigne les génotypes sauvages, et son absence, couplée au profil Amph²⁶, confirme les Amph KO (Figure 22, C). Sur cette base, et afin de limiter les effets de lignée, j'ai retenu au moins deux lignées indépendantes par génotype (et trois pour les doubles mutants) pour la suite des analyses : WT #22, #26 ; Fak KO #17, #33 ; Amph KO #04, #16 ; Double KO #15, #18, #31. Ce panel servira de référence pour l'ensemble des analyses morphologiques et fonctionnelles.

La susceptibilité épileptique associée à Fak^{CG1} n'est pas due à la perte de Fak mais à un variant de fond

La Drosophile offre un cadre robuste pour l'étude des crises de type épileptique grâce aux tests « bang-sensitive » : un stimulus mécanique standardisé qui se caractérise par une secousse au vortex déclenche, chez des génotypes sensibles, une crise motrice transitoire (Figure 23, A). Cette crise se manifeste par des tremblements, une paralysie tonique, une chute et des mouvements spasmodiques suivie d'une phase de récupération. Ainsi il est possible de quantifier la proportion d'individus présentant une crise, le temps de latence et le temps de récupération. Ce paradigme, simple et hautement reproductible, complète idéalement les mesures de locomotion basale en révélant des vulnérabilités neuronales latentes au stress mécanique, souvent liées à des déséquilibres d'excitabilité synaptique.

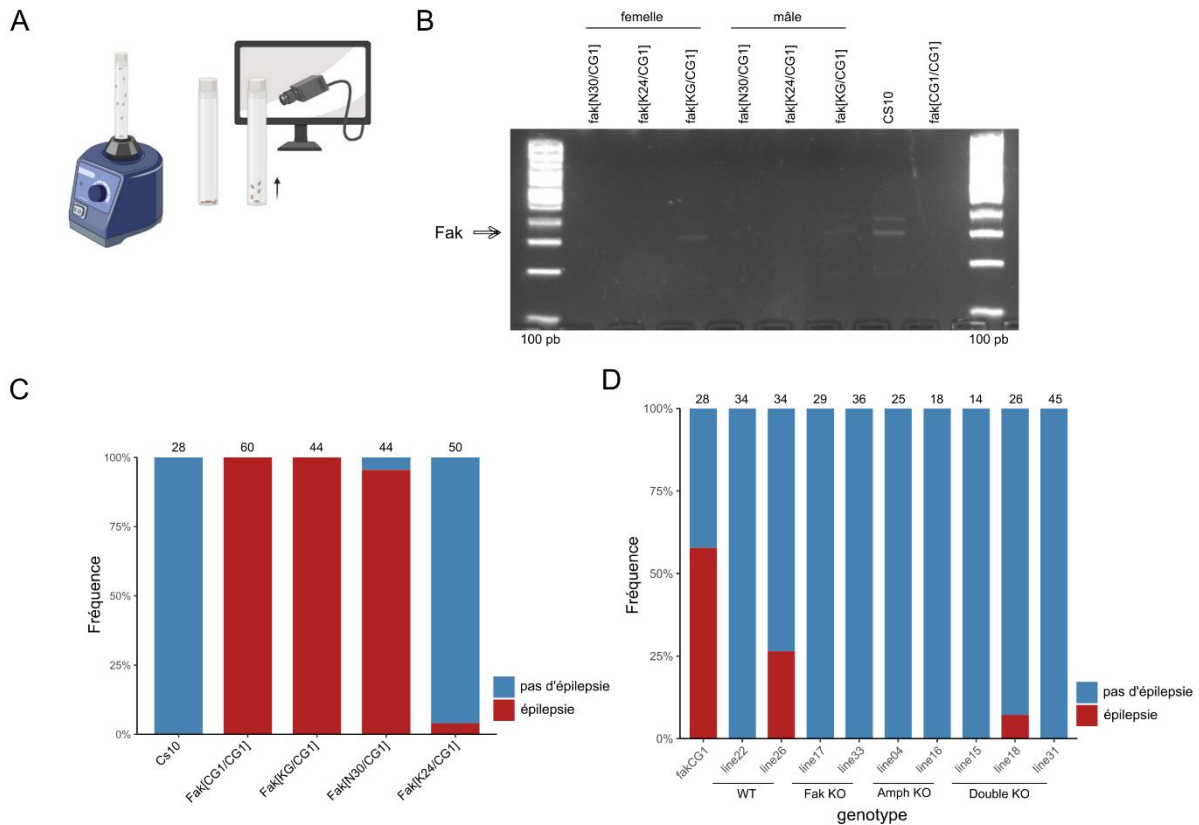


Figure 23. (A) Schéma du protocole expérimental de test d'épilepsie chez la *Drosophile*. Les mouches sont placées dans des tubes, soumises à une stimulation mécanique par vortex, puis observées sous caméra pour détecter l'apparition de crises épileptiques. (B) Génotypage *Fak* par RT-PCR à partir de l'ARN des lignées hétérozygotes composées portant les différents allèles perte de fonction pour *Fak*. *Cs10* comme contrôle positif et *Fak*^{CG1} homozygote comme contrôle négatif. (C) Quantification de la fréquence des crises épileptiques dans les différentes lignées mutées perte de fonction pour *Fak*. Les pourcentages de mouches présentant (rouge) ou non (bleu) des crises sont représentés pour chaque génotype. Contrôle *Cs10* pour l'absence de crise et contrôle *Fak*^{CG1} homozygote pour la présence de crises. (D) Quantification de la fréquence des crises épileptiques dans les lignées issues de la recombinaison entre *Fak*^{CG1} et *Amph*²⁶. Contrôle *Fak*^{CG1} homozygote pour la présence de crises.

Un phénotype de susceptibilité aux crises épileptiques a été rapporté pour la délétion *Fak*^{CG1} (Ueda et al 2008), allèle utilisé pour générer mes mutants simples et doubles. Avant d'examiner les effets synaptiques de mes recombinants, j'ai d'abord cherché à déterminer si cette susceptibilité à l'épilepsie provenait réellement de la perte de *Fak* ou d'une mutation fortuite du fond génétique, et si elle avait pu être transmise à mes lignées recombinées.

Ce point est essentiel, car une hyperexcitabilité de fond peut, à elle seule, stimuler la croissance terminale des JNM de manière activité-dépendante et biaiser les mesures morphologiques (Ueda et al 2008, Vasin et al 2014).

Pour cela, j'ai comparé plusieurs allèles perte de fonction de *Fak* disponibles au laboratoire (Fak^{KG} , Fak^{CG1} , Fak^{N30} et Fak^{K24}). J'ai vérifié leur expression par RT-PCR et évalué leur sensibilité à l'épilepsie par test « bang-sensitive » (Figure 23 B et C).

L'allèle Fak^{KG} conserve une expression résiduelle et correspond à un mutant hypomorphe, tandis que Fak^{CG1} , Fak^{N30} et Fak^{K24} apparaissent comme des allèles nuls (Figure 23, B). Les lignées $Fak^{KG/CG1}$ et $Fak^{N30/CG1}$ présentent un phénotype épileptique marqué, comparable à $Fak^{CG1/CG1}$, alors qu'aucune crise n'est détectée pour $Fak^{K24/CG1}$ (Figure 23, C). Ces résultats indiquent que la susceptibilité aux crises n'est pas directement liée à la perte de *Fak*, mais résulte vraisemblablement d'une mutation génétique secondaire dans le fond de certains mutants dérivés de Fak^{KG} .

Cette hypothèse est renforcée par l'origine des différents allèles. En effet, Fak^{CG1} et Fak^{N30} dérivent toutes deux d'excision imprécise de l'élément P initialement inséré dans Fak^{KG} . S'il existe une mutation ailleurs dans le fond génétique, alors elle va subsister dans les lignées obtenues après excision imprécise de l'élément P. À l'inverse, l'allèle Fak^{K24} a été obtenu par recombinaison entre deux éléments P distincts. La recombinaison n'étant pas limitée aux seuls éléments P, la mutation responsable de l'épilepsie ailleurs dans le génome a pu être perdue par recombinaison.

J'ai ensuite évalué si cette anomalie pouvait s'être transmise à mes lignées recombinantes dérivées de Fak^{CG1} (Figure 23 D). Contrairement à la lignée contrôle positive Fak^{CG1} , aucune crise n'a été détectée dans mes recombinants *Fak* KO, *Amph* KO ou double KO, à l'exception d'un faible taux résiduel dans la lignée témoin WT#26.

Ces observations confirment que la recombinaison a permis d'éliminer le variant épileptique et que les analyses morphologiques et électrophysiologiques ultérieures reflètent bien la perte de fonction d'*Amph* et *Fak*, indépendamment d'une hyperexcitabilité de fond. Enfin, j'ai délibérément conservé la lignée WT#26, qui présente une légère tendance bang-sensitive, comme comparateur exploratoire. Cela me permet de tester si une hyperexcitabilité de fond modifie la morphologie et/ou la fonction de la JNM par rapport à une WT strictement non épileptique.

Le double KO potentialise le déficit locomoteur observé en *Amph* KO

Un phénotype connu de la perte d'*Amph* et décrit dans la littérature est un défaut locomoteur (Leventis et al 2001). En absence d'*Amph*, le réseau des T-tubules et du réticulum sarcoplasmique est sévèrement désorganisé. Les structures dyade/triade sont anormales et des marqueurs clés sont mal localisés (Razzaq et al 2001). Cela perturbe le couplage

excitation-contraction et donc la force et la coordination musculaire. J'ai d'abord voulu avec cette expérience retrouver ce phénotype associé à la perte d'*Amph* dans nos lignées *Amph* KO issues de notre protocole de recombinaison. Ensuite nous voulions déterminer si la perte de *Fak* pouvait également induire un problème locomoteur ou bien moduler le phénotype associé à *Amph*.

Pour répondre à cette question, deux lignées recombinantes correspondant à chacun de mes 4 génotypes d'intérêts ont été testées pour la locomotion avec un test par géotaxie négative. Le système multi-pipette mit en place a permis de tester plusieurs génotypes différents en une prise vidéo. Le score des *Drosophiles* a été déterminé en fonction de la graduation atteinte dans la pipette graduée (Figure 24, A). Les variables environnementale telle que la température, la lumière et l'heure étaient soigneusement maîtrisées pour éviter toutes fluctuations extérieures.

Il a été possible de tester une cinquantaine de mouches par sexe par génotype donc environ 100 mouches par lignées. Il est connu de la littérature qu'il existe parfois une différence d'aptitude locomotrice entre les mâles et les femelles (Burnet et al 1988, Videlier et al 2019, Watanabe et al 2021). C'est pourquoi j'ai d'abord testé la différence de score entre sexe au sein d'un même génotype. Concernant nos lignées recombinante, nous n'avons pas vu de différences significatives de score entre les mouches mâles et les mouches femelles quel que soit le génotype (Figure 24, B). J'ai donc décidé de fusionner les scores des mouches mâles et femelles pour avoir une puissance statistique supérieure pour nos analyses entre génotypes.

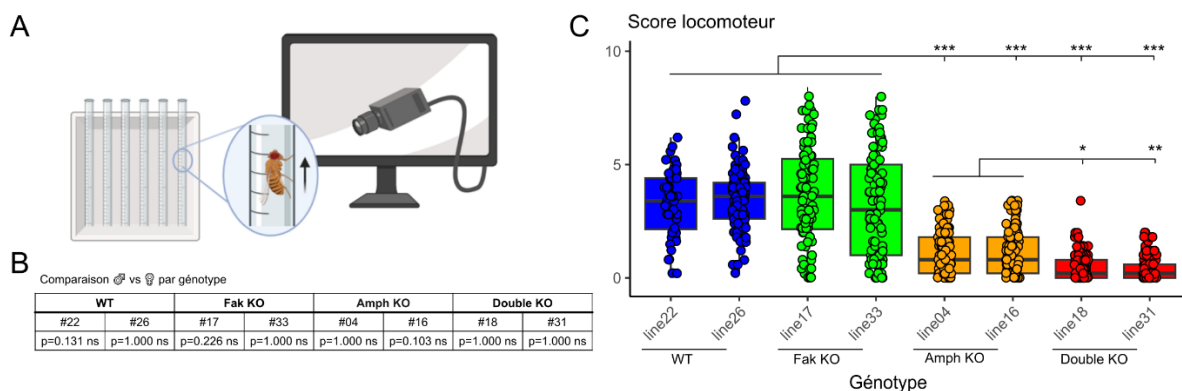


Figure 24. (A) Schéma du protocole expérimental du test de locomotion par géotaxie négative (climbing assay). À 8 jours post-éclosion, des *Drosophiles* mâles et femelles sont placées par groupes de cinq dans des tubes gradués. Après un stimulus mécanique, leur capacité à grimper est enregistrée par vidéo HD, et un score de performance est attribué en fonction de la graduation atteinte dans le tube. (B) Tableau de comparaison des scores locomoteurs entre mâles et femelles pour chaque génotype. Les *p*-values ont été obtenues par test de Wilcoxon bilatéral (comparaison M vs F au sein de chaque lignée), puis ajustées selon la méthode de Holm pour correction des comparaisons multiples. Le seuil de significativité est fixé à $p < 0,05$. (C) Résultats du test de locomotion pour les lignées WT, Fak KO, Amph

KO et Double KO. Les lignées WT présentent un score moyen d'environ 4, comparable à celui observé pour les Fak KO.

Les deux lignées WT de contrôle présentent des performances comparables, avec un score moyen de locomotion à 3,5. Les deux lignées Fak KO ne diffèrent pas significativement des contrôles et affichent, elles aussi, un score moyen à 3,5. À l'inverse, les deux lignées *Amph* KO montrent une diminution marquée et significative du score, qui se situe entre 1,5 et 2, en cohérence avec les phénotypes décrits dans la littérature pour la perte d'*Amph*. De manière intéressante, l'effet est encore accentué dans nos double KO : les lignées #15 et #18 présentent un score moyen d'environ 1, très significativement inférieur à ceux des WT et des Fak KO, et légèrement mais significativement plus bas que celui des *Amph* KO (Figure 24, C).

En conclusion, mes analyses comportementales ont permis de confirmer le déficit locomoteur associé à la perte d'*Amph*, déjà décrit dans la littérature, et de mettre en évidence un effet aggravant en condition double mutante *Amph-Fak*. Cette aggravation, de nature synergique, suggère que les deux gènes pourraient agir au sein de voies musculaires convergentes, notamment celles impliquant la dynamique du cytosquelette d'actine et l'organisation des tubules T, dont la désorganisation est à l'origine du défaut locomoteur observé.

Les défauts locomoteurs observés peuvent résulter soit d'altérations intrinsèques du muscle, soit d'anomalies neuronales, notamment au niveau synaptique. Pour distinguer ces possibilités, je me concentre dans la section suivante sur la JNM, interface entre motoneurone et fibre musculaire, afin d'évaluer un effet neuronal/synaptique potentiel d'*Amph* et *Fak*. J'analyse pour cela les phénotypes morphologiques et électrophysiologiques associés aux invalidations simples et combinées.

Analyse morphologique de la jonction neuromusculaire

La JNM larvaire de la *Drosophile* est un modèle de référence pour étudier *in vivo* l'organisation et la plasticité synaptiques. La paroi corporelle de la larve est organisée en segments répétés, chacun portant un ensemble invariant de muscles identifiés et des sites d'innervation stéréotypés, facilement accessibles à la dissection (Figure 25, A). Cette architecture permet des comparaisons quantitatives robustes et le modèle permet des analyses génétiques, d'imagerie haute résolution et d'électrophysiologie (Keshishian et al 1996, Menon et al 2013). Chaque terminaison des motoneurones se ramifie en boutons synaptiques (types Ib/Is) contenant des zones actives qui libèrent du glutamate, face à un compartiment post-synaptique spécialisé organisé par la protéine Discs-large (Dlg) et un réticulum sous-synaptique. En immunofluorescence, l'anti-HRP révèle spécifiquement les membranes

neuronaux des boutons synaptiques (Jan et al 1982), Dlg marque le domaine post-synaptique (Lahey et al 1994).

Les boutons Ib, de plus grande taille, correspondent aux terminaisons toniques, caractérisées par une activité synaptique soutenue, un grand nombre de zones actives et une transmission relativement stable. À l'inverse, les boutons Is, plus petits, sont associés à des terminaisons phasiques, qui libèrent le neurotransmetteur de manière plus brève et à fréquence plus élevée, avec un nombre réduit de zones actives (Kurdyak et al 1994). Dans le cadre de ce projet, l'analyse morphologique a été centrée sur les boutons Ib, car ils constituent la population majoritaire et présentent une architecture plus stable et mieux définie, permettant une quantification plus reproductible des paramètres morphologiques (nombre de boutons, surface synaptique, ramifications, etc.). Par ailleurs, les boutons Ib sont plus sensibles aux altérations de la croissance et de la structuration du réseau synaptique induites par des manipulations génétiques, ce qui en fait un indicateur robuste des défauts de développement ou de maintenance synaptique (Newman et al 2017).

Pour mes analyses, je m'appuyais sur les phénotypes décrits pour *Amph* : diminution du nombre de boutons synaptiques et de la taille globale de la JNM (Mathew et al 2003), mais aussi absence d'effet dans certains contextes (Zelhof et al 2001, Leventis et al 2001). J'ai tenu compte également du rôle de Fak, qui restreint la croissance de la JNM via l'axe intégrine-MAPK (Tsai et al 2008, Tsai et al 2012). J'ai retenu deux indicateurs morphologiques principaux : le nombre de boutons synaptiques et l'organisation des ramifications. Le but étant de déterminer, dans le double KO *Amph-Fak*, si les effets observés chez les simples mutants s'additionnent, s'atténuent ou se potentialisent, révélant ainsi une interaction fonctionnelle entre ces voies à la synapse.

La perte de Fak augmente le nombre de boutons synaptiques, effet sauvé par la double mutation

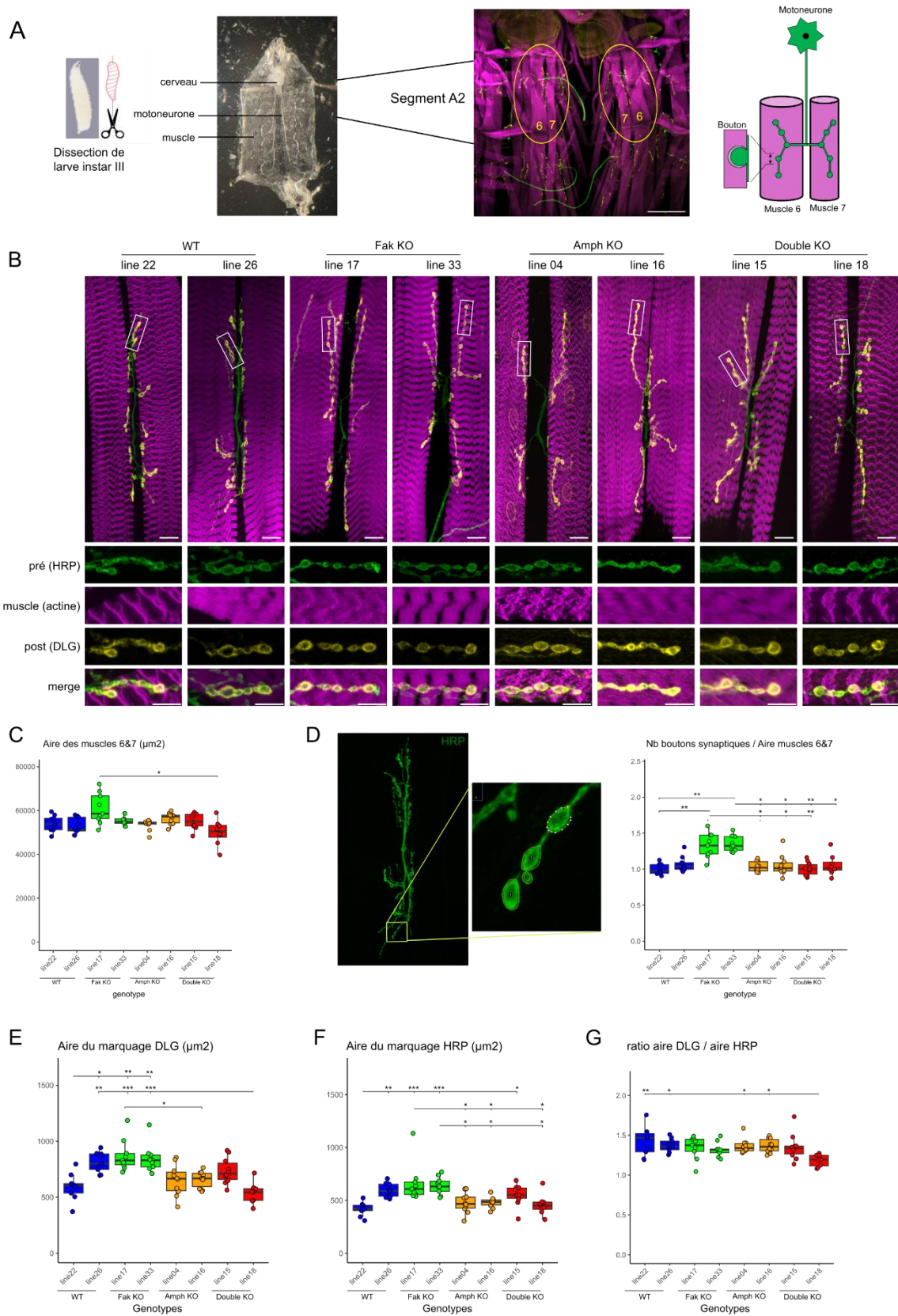


Figure 25. Amph et Fak interagissent fonctionnellement dans les mécanismes de croissance et développement des boutons synaptiques des JNMs 6&7. (A) Schéma de la préparation larvaire, de

*la structure musculaire en héli segments répétés avec une image montrant le segment A2 et les muscles 6&7 entourés en jaune + schéma représentatif de la JNM des muscles 6 et 7. (B) Imagerie confocale représentative des JNMs (contrôle WT, Fak KO, Amph KO et double KO). Les marquages utilisés sont : anti-HRP (membranes neurales présynaptiques), Dlg (compartiment post-synaptique), phalloïdine/actine (fibres musculaires). Les échelles sont indiquées sur les images. (C) Quantification de l'aire des muscles 6&7. (D) Quantification du nombre total de boutons par JNM normalisée par l'aire des muscles 6&7. L'image montre comment les boutons synaptiques sont quantifiés. (E,F,G) Quantifications de l'aire totale du marquage Dlg et du marquage HRP de la JNM et du ratio aireDLG/aireHRP au site synaptique (ROI défini par HRP). Les données ont été analysées par un test non paramétrique de Kruskal–Wallis suivi d'un post-hoc de comparaisons multiples de Dunn (correction de Holm ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 1 \times 10^{-4}$, ***** $p < 1 \times 10^{-6}$).*

Dans un premier temps, j'ai d'abord quantifié l'aire des muscles cibles 6&7 du segment A2 (Figure 25, A) : de légères variations inter-lignées ont été observées. Étant donné la dépendance connue de la taille de la JNM à la surface musculaire, l'ensemble des mesures morphométriques a été normalisé à l'aire musculaire correspondante, conformément aux protocoles robustes présentés dans la littérature (Menon et al 2013).

Après normalisation, le nombre de boutons synaptiques est significativement augmenté chez Fak KO, en accord avec le rôle pro-croissance de la voie intégrine-FAK rapporté à la JNM (Tsai et al 2008). Fait marquant, ce phénotype est sauvé dans le double mutant Fak-Amph, ce qui révèle une interaction génétique de type épistasie entre Fak et Amph dans le contrôle du nombre de boutons (Figure 25, D).

Afin d'appuyer les observations morphologiques précédentes, j'ai mesuré, pour chaque JNM, la surface totale des compartiments présynaptique (anti-HRP) et post-synaptique (anti-DLG). Cette analyse vise à vérifier si les variations du nombre de boutons synaptiques s'accompagnent d'une modification globale de la taille des zones pré- et post-synaptiques.

En cohérence avec l'augmentation du nombre de boutons observée chez les Fak KO, j'ai détecté une augmentation des aires absolues des compartiments pré- et post-synaptiques dans ce génotype. De manière intéressante, cette tendance est partiellement normalisée dans les doubles KO Amph-Fak, traduisant un rescue partiel du phénotype de croissance. Ces résultats confortent l'idée que la perte de Fak favorise une expansion synaptique, tandis que la co-invalidation avec Amph atténue cet effet. L'analyse du rapport aire pré/aire post ne révèle pas de différence majeure entre les lignées, indiquant qu'aucun compartiment n'est spécifiquement agrandi ou réduit (Figure 25, E & F). Autrement dit, la croissance des boutons reste proportionnelle entre les compartiments présynaptiques et post-synaptiques. Seule la lignée double présente un léger ratio diminué, mais cette variation reste modeste et difficile à interpréter en l'état (Figure 25, G). Ensemble, ces mesures soutiennent et affinent mes résultats précédents sur les boutons synaptiques, confirmant que l'axe Amph-Fak influence

principalement la croissance et la taille globale des terminaisons synaptiques, sans déséquilibrer la proportion entre les domaines pré- et post-synaptiques.

Pour tester la robustesse des phénotypes observés sur les JNMs des muscles 6/7, j'ai appliqué le même pipeline morphométrique aux JNMs du muscle 4 (M4), dont l'architecture en boutons et ramifications diffère mais repose sur les mêmes principes d'analyse. J'ai conservé à l'identique les conditions d'expérimentation et d'analyse afin d'assurer la comparabilité. Cette seconde série de mesures est présentée dans la Figure 26.

La JNM du muscle 4 confirme l'augmentation de boutons sous Fak KO et le sauvetage en double KO

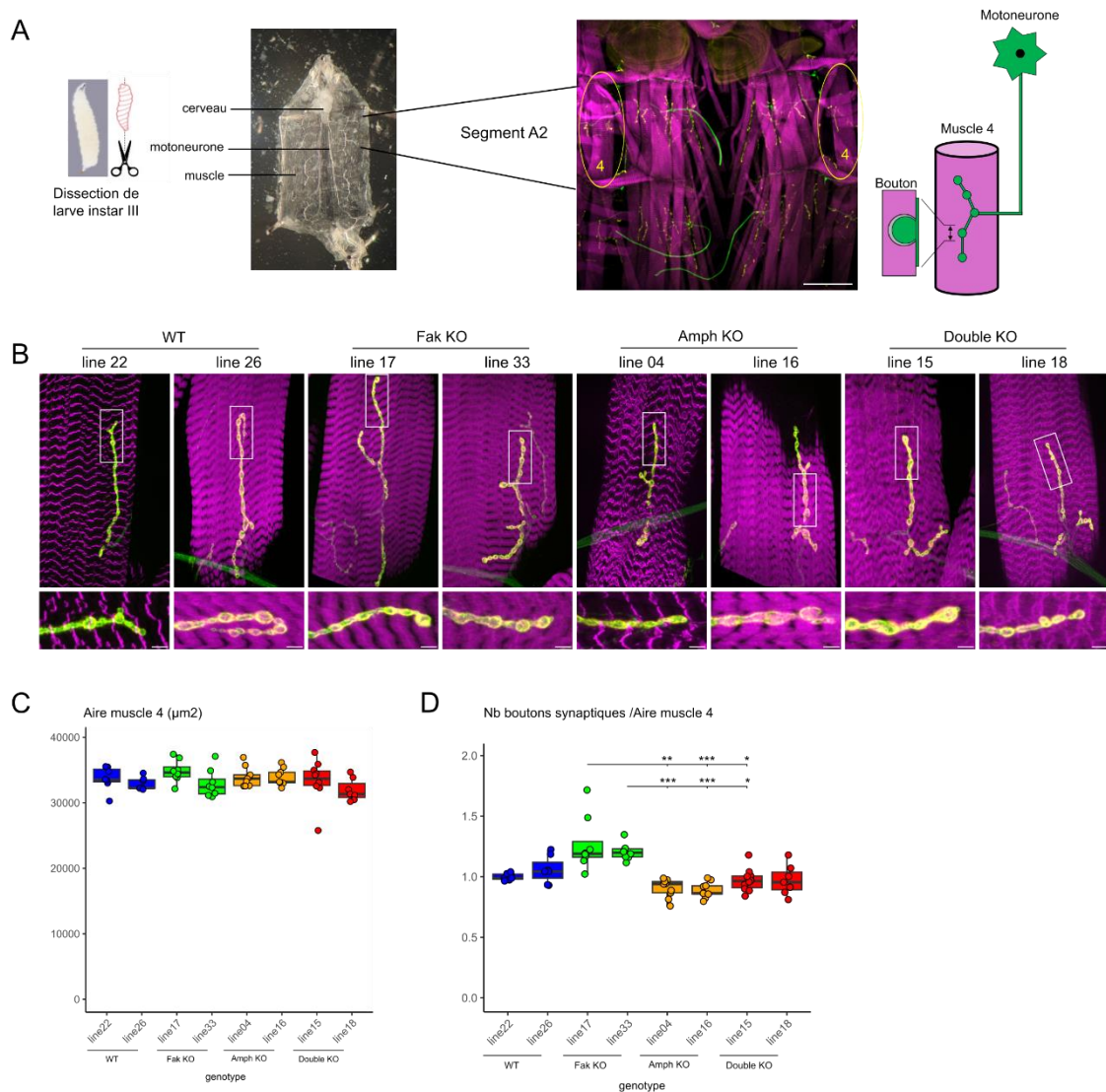


Figure 26. Amph et Fak interagissent fonctionnellement dans les mécanismes de croissance et développement des boutons synaptiques des JNMs 4. (A) Schéma de la préparation larvaire, de la structure musculaire en héli segments répétés avec une image montrant les muscles 4 du segment

A2 entourés en jaune et un schéma représentatif de la JNM du muscle 4. (B) Imagerie confocale représentative des JNMs (contrôle WT, *Fak* KO, *Amph* KO et double KO). Les marquages utilisés sont : anti-HRP (membranes neurales présynaptiques), Dlg (compartiment post-synaptique), phalloïdine/actine (fibres musculaires). Les échelles sont indiquées sur les images. (C) Quantification de l'aire des muscles 4. (D) Quantification du nombre total de boutons par JNM normalisée par l'aire des muscles 4. Les données ont été analysées par un test non paramétrique de Kruskal–Wallis suivi d'un post-hoc de comparaisons multiples de Dunn (correction de Holm ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 1 \times 10^{-4}$, ***** $p < 1 \times 10^{-6}$).

Classiquement, les JNM des muscles 6 et 7 sont privilégiées en raison de leur taille et de leur accessibilité. Ici, j'analyse aussi la JNM du muscle 4, plus petit mais aisément repérable sur le même segment et pertinent pour la quantification morphologique. L'aire musculaire M4 ne diffère pas significativement entre génotypes mais est tout de même utilisée pour la normalisation des résultats suivant comme pour les résultats précédemment (Figure 26, C). Sur le M4, où le nombre absolu de boutons est plus faible, rendant les différences plus difficiles à détecter, nous observons une augmentation nette chez *Fak* KO, significative versus *Amph* KO et double KO, et une tendance positive versus WT qui n'atteint pas le seuil de significativité après correction statistique stricte (Figure 26, D). Le sens de l'effet reste toutefois concordant avec M6&7, ce qui confirme la tendance et renforce l'interaction épistatique déjà mise en évidence sur le nombre de boutons synaptiques.

Les variations observées pour le nombre des boutons synaptiques suggèrent que la perte de *Amph* et/ou *Fak* influence la croissance terminale de la JNM. Cependant, ces altérations locales pourraient également s'inscrire dans une réorganisation plus large de l'arborisation neuronale. En effet, la structure globale de la JNM ne dépend pas uniquement du nombre de boutons, mais aussi de la manière dont ceux-ci se répartissent le long des branches terminales. J'ai donc entrepris une analyse détaillée de l'architecture des ramifications synaptiques, afin de déterminer si la croissance synaptique observée traduit une expansion du réseau terminal ou un remodelage plus diffus de la topologie de la JNM.

Amph accroît la ramification terminale de la JNM avec une amplification en double KO

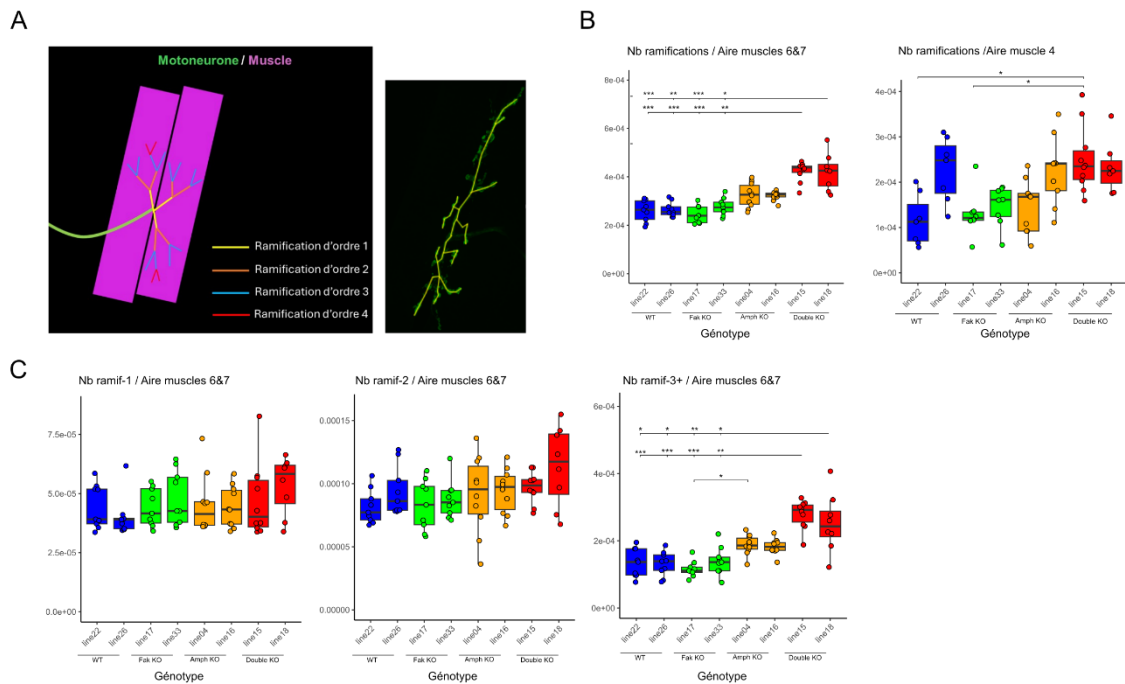


Figure 27. *Amph* et *Fak* interagissent fonctionnellement dans les mécanismes de croissance et développement des ramifications des JNMs 6&7. (A) Schéma et image montrant la quantification des ramifications des JNM. Le point d'arrivée du motoneurone aux muscles sert de point de départ pour caractériser les ramifications de type 1. Après chaque division, l'ordre de la ramification augmente. (B) Quantifications du nombre de ramifications par JNM 6&7 à gauche et JNM 4 à droite normalisé par l'aire des muscles. (C) Quantifications en détail du nombre des ramifications d'ordre 1, d'ordre 2 et d'ordre 3 et +. Les données ont été analysées par un test non paramétrique de Kruskal–Wallis suivi d'un post-hoc de comparaisons multiples de Dunn (correction de Holm ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 1 \times 10^{-4}$, ***** $p < 1 \times 10^{-6}$).

J'ai ensuite analysé l'architecture de l'arborisation synaptique. Les ramifications de la JNM ont été classées selon leur ordre topologique, défini à partir du point d'entrée du motoneurone dans le muscle : le tronc principal correspond à la ramification d'ordre 1 (ramif-1), ses branches directes à l'ordre 2 (ramif-2), et les divisions successives à des ordres supérieurs (\geq ramif-3) (Figure 27, A). Ce type de classification permet d'apprécier si les remaniements concernent la structure primaire du tronc nerveux ou les segments terminaux des arborisations. Le nombre total de ramifications apparaît légèrement augmenté chez les *Amph* KO et nettement accru dans le double KO *Amph-Fak*, indiquant une synergie entre les deux gènes pour ce phénotype (Figure 27, B). J'observe également au, au niveau des JNM des muscles 4 une tendance à l'augmentation du nombre de ramifications chez *Amph* KO et un effet suggérant une synergie dans le double KO (Figure 27, B). Toutefois, les JNMs du M4 étant peu ramifiées par nature, la faible dynamique de branchement et une variabilité intra-génotype relativement élevée limitent la puissance statistique et la portée des conclusions fines sur ce phénotype. En conséquence, je ne détaillerai pas davantage ces effets sur le M4 et conserve les JNMs des

muscles 6&7 comme jeu de données principal pour l'analyse structurale approfondie des ramifications.

Ni les ramif-1 ni les ramif-2 ne diffèrent significativement entre génotypes ; en revanche, l'augmentation est observée à partir des ramifications d'ordre ≥ 3 , suggérant que c'est l'arborisation terminale qui est spécifiquement amplifiée (Figure 27, C).

L'analyse morphologique globale de nos JNM suggère que les boutons synaptiques d'*Amph* KO se développent sur des arborisations plus petites mais plus ramifiées. Ce phénotype pourrait refléter une compensation (les synapses se ramifient davantage pour maintenir une aire synaptique suffisante malgré la réduction de taille) ou bien un défaut développemental précoce, les arborisations étant plus ramifiées d'emblée mais n'atteignant pas la même expansion terminale. Cette tendance est encore amplifiée dans le double KO, soutenant l'idée que *Amph* et *Fak* coopèrent dans la croissance et l'organisation des arborisations terminales, puis dans l'ajout séquentiel des boutons qui les composent.

En résumé, si mes résultats diffèrent partiellement de ceux rapportés précédemment, ils révèlent un nouveau phénotype associé à *Amph* et à la combinaison *Amph-Fak*. Ils indiquent que ces deux gènes agissent de concert pour réguler la morphogenèse des JNM, notamment la croissance des ramifications et l'organisation des boutons synaptiques.

Les résultats précédents ont mis en évidence des phénotypes morphologiques au niveau des boutons et des ramifications, ainsi qu'une interaction entre *Amph* et *Fak* dans le double KO. Par ailleurs, un phénotype d'intégrité postsynaptique est classiquement associé à *Amph* : la délocalisation de la protéine Disc Large (DLG). Il est donc pertinent d'évaluer ce marqueur dans nos différentes lignées afin de déterminer si, au-delà des effets sur les boutons et les ramifications, l'organisation postsynaptique est également altérée par la perte simple ou combinée d'*Amph* et de *Fak*. Nous examinons ainsi la distribution de DLG pour tester si l'interaction observée précédemment se prolonge ou non dans le compartiment postsynaptique.

Délocalisation de Disc Large spécifique à Amph et indépendante de Fak

La protéine Discs-large (Dlg), orthologue des MAGUK/PSD-95 chez la Drosophile, constitue le principal échafaudage post-synaptique de la JNM. Elle s'accumule normalement dans le réticulum sous-synaptique (SSR), immédiatement sous les boutons glutamatergiques, où elle organise récepteurs, canaux et protéines d'ancrage essentielles à la transmission. Il a été montré que la perte d'*Amph* entraîne une délocalisation de Dlg hors du SSR vers des domaines tubulaires plus profonds du sarcolemme, reflétant une altération majeure du réseau de tubules T et du SSR (Zelhof et al 2001). Par ailleurs, *Amph* est principalement localisée au

compartiment post-synaptique et contribue au maintien de l'architecture membranaire et de la signalisation neuromusculaire (Leventis et al 2001). Dans ce contexte, j'ai cherché à déterminer si la co-invalidité d'*Amph* et de *Fak* modifie ce phénotype de délocalisation post-synaptique observé en absence d'*Amph* c'est-à-dire si *Fak* peut atténuer, renforcer ou laisser inchangée la désorganisation de Dlg.

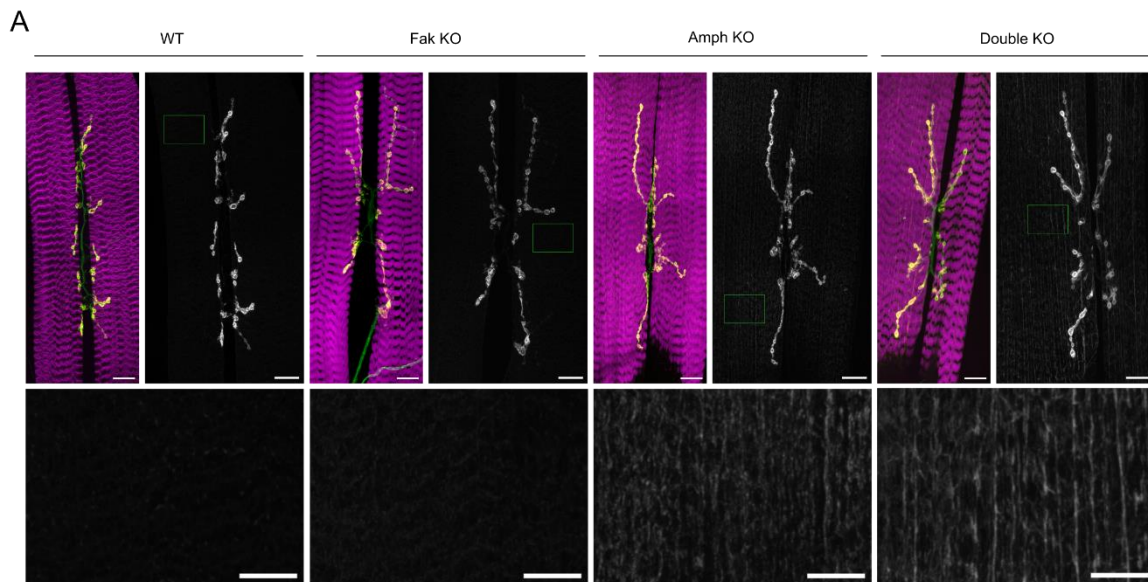


Figure 28. La perte de *Amph* délocalise la protéine post-synaptique *Disc Large* au niveau des tubules T des muscles de la larve de *Drosophile*. (A) Imagerie confocale de JNM larvaires au 3^e stade. Génotypes représentés : WT, *Fak* KO, *Amph* KO et double KO. Marquage en gris de DLG (domaine post-synaptique), actine en magenta (phalloïdine ; fibres musculaires). Les encadrés verts délimitent des régions musculaires extra-synaptiques utilisées pour l'analyse de la délocalisation. Barres d'échelle indiquées. Les panneaux du dessous montrent une vues plus précise du marquage Dlg correspondant aux encadrés révélant l'absence de signal organisé en stries tubulaires chez WT et *Fak* KO et, à l'inverse, l'apparition d'un motif strié compatible avec une accumulation de Dlg sur les tubules-T dans *Amph* KO et double KO. Barres d'échelle indiquées

Mes immunomarquages confirment le phénotype canonique : dans les larves *Amph* KO, DLG n'est plus restreint au SSR mais s'accumule anormalement le long des tubules T/sarcolemme, reproduisant fidèlement la délocalisation décrite par Zelhof et collègues. Fait notable, cette délocalisation de DLG persiste dans le double mutant *Fak*-*Amph*, indiquant que la perte d'*Amph* suffit à entraîner le défaut sans effet de *Fak* sur le phénotype. Dans mes *Fak* KO seuls, la distribution de DLG apparaît globalement conservée avec une absence de délocalisation, ce qui suggère que *Fak* influence surtout la croissance des boutons synaptiques et des ramifications et non ce phénotype post-synaptique (Figure 28).

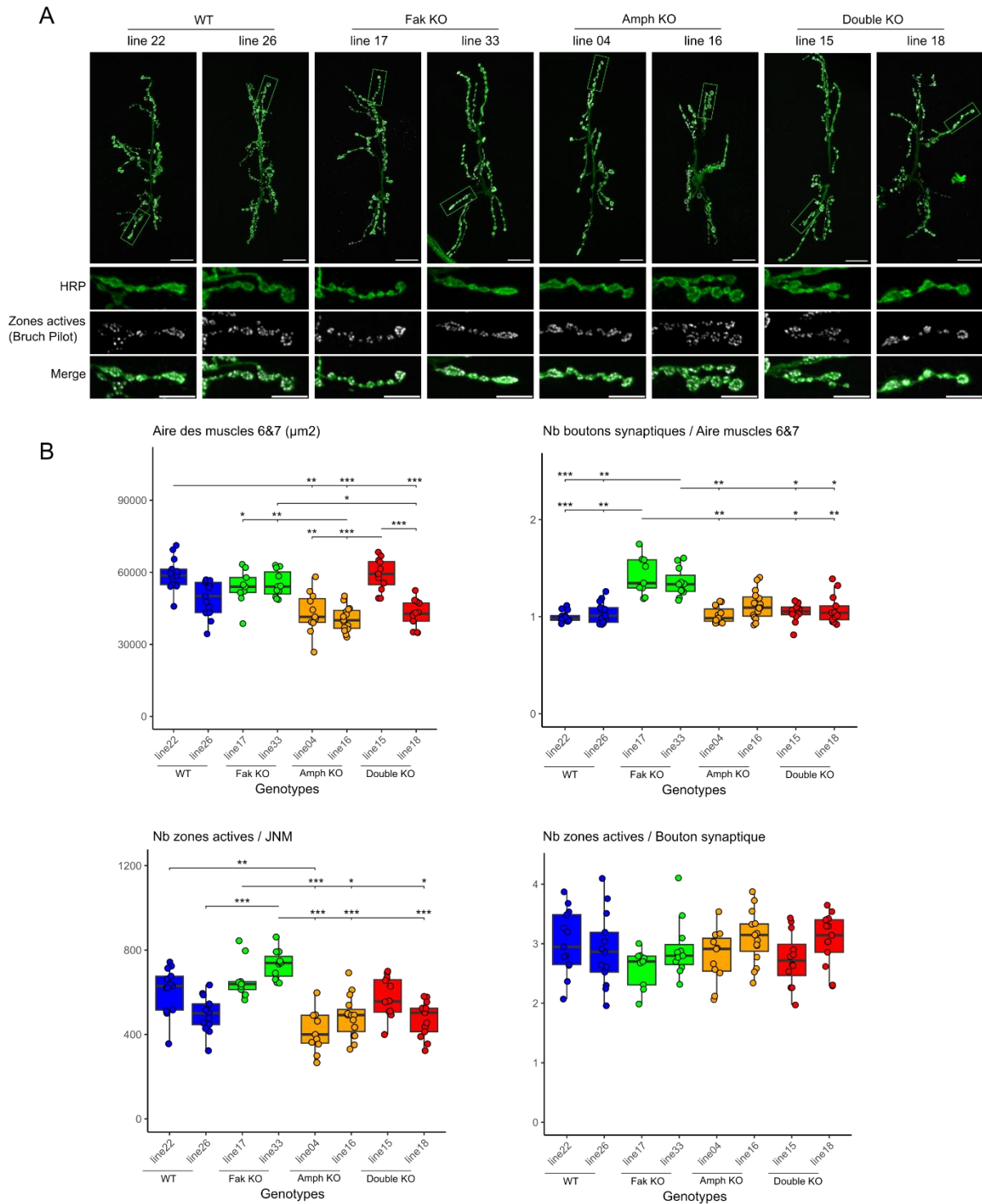
Il était intéressant après l'analyse de ce phénotype post-synaptique de regarder plus en détail un autre paramètre morphologique de la JNM cette fois-ci associé au compartiment pré-

synaptique. En particulier, la zone active, où s'organise la libération des vésicules synaptiques, constitue un indicateur sensible de l'état fonctionnel des terminaux nerveux. J'ai donc entrepris une analyse morphologique de ces structures à l'aide du marqueur Bruchpilot, afin d'évaluer si les remaniements structuraux identifiés, qu'il s'agisse de la croissance des boutons, de la ramification terminale ou de la désorganisation postsynaptique, pouvaient s'accompagner d'altérations de la machinerie présynaptique impliquée dans la transmission.

Nombre total de zones actives augmenté sous Fak KO avec densité par bouton inchangée

Pour rappel, les ZA sont les micro-domaines présynaptiques où s'alignent canaux Ca^{2+} (Cac), machinerie d'exocytose et échafaudage des T-bar pour assurer un couplage à la milliseconde entre l'arrivée du potentiel d'action et la libération vésiculaire. À la JNM de Drosophile, la protéine Bruchpilot (Brp/ELKS) organise la nanostructure de la zone active, recrute les canaux Ca^{2+} et règle la probabilité de libération. La densité et l'organisation de Brp sont donc un proxy robuste de la capacité de relargage par bouton synaptique (Kittel et al 2006, Wagh et al 2006, Fouquet et al 2009, Ehmann et al 2014, Zhai et al 2004).

J'ai mesuré, pour chaque JNM, le nombre de zones actives et leur assignation par bouton au moyen d'un marquage anti-Brp, ce qui renseigne précisément l'organisation du dispositif de libération présynaptique en conditions Amph KO, Fak KO et double KO.



Étant donné que la morphologie de la JNM dépend de la taille musculaire, j'ai d'abord quantifié l'aire du muscle comme précédemment. De légères différences existent entre lignées et seront prises en compte en normalisant toutes les quantifications par l'aire musculaire (Menon et al 2013) (Figure 29, B). J'ai ensuite compté les boutons synaptiques pour vérifier le résultat précédent. Les résultats concordent avec notre analyse morphologique précédente et sont en accord avec Tsai et al. 2008, à savoir une augmentation significative du nombre de boutons chez *Fak* KO, et un retour vers le niveau WT en double KO *Fak-Amph* (épistasie), tandis que *Amph* KO seul n'augmente pas le nombre de boutons (Figure 29, C).

En marquant les ZA par anti-Brp, j'observe davantage de ZA totales chez *Fak* KO, ce qui est attendu compte tenu du surcroît de boutons. En double KO, le nombre total de ZA revient proche du WT, à l'image du nombre de boutons (Figure 29, D). Pour tester si chaque bouton porte plus ou moins de ZA, j'ai calculé le ratio ZA/bouton : aucune différence significative entre génotypes n'a été observée. Ainsi, la densité de ZA par bouton est conservée et les effets génotypiques se lisent surtout comme un changement de la quantité de boutons, pas comme une reprogrammation des ZA par bouton (Figure 29, E).

Ces données suggèrent que lorsque *Fak* modifie le nombre de boutons, les zones actives suivent à l'identique, sans gain ni perte par bouton. Dans ce cadre, on s'attend a priori à une augmentation de la capacité de relargage globale chez *Fak* KO, parce qu'il y a plus de boutons et donc plus de zones actives, sans changement marqué de qualité par bouton. En effet, le phénotype de surcroissance des JNM décrit pour la perte de *Fak* s'accompagne d'amplitude de potentiels évoqués plus élevée, sans modification de l'amplitude ni de la fréquence des potentiels spontanés (Tsai et al 2008). La prochaine étape est donc de confronter ces prédictions aux lectures électrophysiologiques et d'évaluer si l'interaction *Amph-Fak*, mise en évidence morphologiquement, se traduit au niveau de la transmission.

Analyses fonctionnelles électrophysiologiques

Après avoir mis en évidence une interaction fonctionnelle entre *Amph* et *Fak* à travers mes analyses morphologiques de la JNM, j'ai souhaité déterminer si cette interaction s'accompagnait de modulations électrophysiologiques. L'objectif était d'évaluer l'impact des invalidations simples et combinées sur la transmission synaptique et la fonction neuronale, afin de compléter l'approche morphologique par une lecture fonctionnelle directe. Ne disposant pas au laboratoire de l'équipement nécessaire à ce type d'analyse, j'ai entrepris une mobilité internationale d'un mois au sein du laboratoire du Professeur Patrik Verstreken (VIB-KU Leuven, Belgique), dont l'équipe possède une expertise reconnue dans l'étude des maladies

neurodégénératives, du modèle *Drosophila* et des enregistrements électrophysiologiques sur la JNM et la rétine. Cette collaboration m'a permis d'acquérir les bases expérimentales de l'électrophysiologie et d'obtenir, sur une période limitée, un ensemble de données fonctionnelles couvrant à la fois la JNM larvaire et les électrorétinogrammes (ERG) chez l'adulte, pour l'ensemble de nos lignées recombinantes *Amph* et *Fak*. Les résultats obtenus, présentés dans les sections suivantes, apportent des éléments intéressants sur la fonction synaptique de ces gènes. Toutefois, compte tenu du temps restreint consacré à cette étude et de mon apprentissage progressif des techniques, ces données doivent être considérées comme exploratoires et nécessitant des analyses complémentaires pour confirmer pleinement les tendances observées.

Analyse électrophysiologique de la transmission synaptique à la JNM

La JNM larvaire de la *Drosophile* est un modèle de choix non seulement pour l'analyse morphologique, mais aussi pour l'analyse électrophysiologique synaptique *in vivo*. Ces atouts ont été établis par de nombreux travaux fondateurs et synthétisés par des revues et protocoles de référence (Jan et al 1976, Menon et al 2013, Imlach et al 2009). Dans ce manuscrit, nous appelons mEJP les potentiels de jonction miniatures mesurant la libération spontanée et quantale de vésicules, et EJP évoqué (eEJP) la réponse postsynaptique déclenchée par stimulation du nerf.

La littérature décrit des effets distincts, mais potentiellement complémentaires, d'*Amph* et de *Fak* sur la transmission synaptique à la jonction neuromusculaire de *Drosophile*.

Chez les mutants *Amph*, les études fondatrices ont mis en évidence des altérations post-synaptiques. Dans la lignée *Amph26*, une étude rapporte une augmentation significative de l'amplitude des mEJP sans changement notable de leur fréquence, ni de l'EJP. Cette élévation de la réponse miniature traduit une sensibilisation du muscle au glutamate libéré, probablement via une modulation des conductances ou du nombre de récepteurs post-synaptiques, plutôt qu'un défaut de libération présynaptique (Zelhof et al 2001). Dans la lignée *Amph5E3*, une autre étude observe une tendance similaire, quoique non significative statistiquement, et ne rapportent pas non plus de modification robuste de l'EJP (Leventis et al 2001).

À l'inverse, les mutants *Fak* présentent un profil résolument présynaptique. Dans les lignées *Fak^{N30/K24}*, il a été observé que l'amplitude de l'EJP est augmentée, tandis que la fréquence et l'amplitude des mEJP demeurent inchangées (Tsai et al 2008). Cela indique que la quantité totale de neurotransmetteur libérée lors de la stimulation est accrue, sans modification de la réponse élémentaire du muscle. Une explication plausible est une augmentation du nombre

de sites de libération actifs, cohérente avec le phénotype morphologique de Fak marqué par un plus grand nombre de boutons synaptiques.

Cela n'exclut pas que l'une ou l'autre protéine soit également présente dans le compartiment opposé (pré- ou post-synaptique) et, de ce fait, interagisse avec l'autre pour moduler le phénotype associé. Il est également important de noter que les réponses à des stimulations haute fréquence n'avaient pas été systématiquement étudiées dans les travaux antérieurs, laissant ouverte la question d'une modulation de la plasticité à court terme dans ces différents contextes mutants.

Sur cette base, j'ai enregistré les paramètres électrophysiologiques dans mes lignées recombinantes. L'objectif était, comme pour les sections précédentes, de déterminer si la combinaison des invalidations produit des effets additifs, épistatiques ou synergiques.

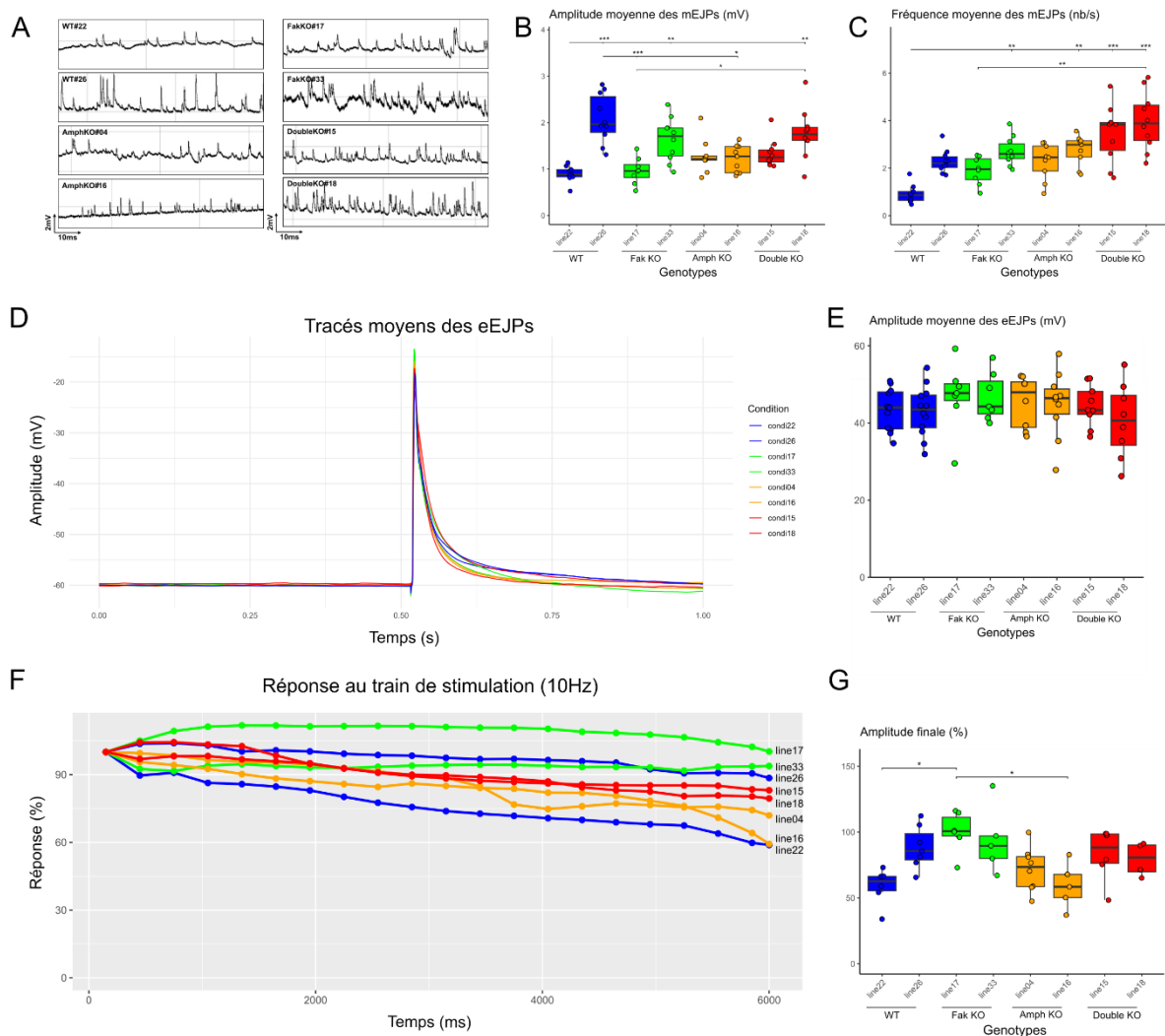


Figure 30. L'interaction fonctionnelle entre *Amph* et *Fak* a une conséquence sur l'activité électrique de la JNM. (A) Tracés moyens des mEJPs. (B) Amplitude moyenne des mEJPs. (C)

Fréquence moyenne des mEJPs. (D) Tracés moyens de EJP évoqués. (E) Amplitude des EJP évoqués. (F) Tracés moyens de la réponse musculaire à un train de stimulation 10Hz. (G) Pourcentage d'évolution de l'amplitude du potentiel post-synaptique après 10min de train de stimulation à 10Hz. Pour ces expériences lignées utilisées : WT (#22 et #26), Fak KO (#17 et #33), Amph KO (#04 et #16), double KO (#15 et #18). Test non paramétrique de Kruskal–Wallis suivi du post-hoc de Dunn (correction de Holm ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 1 \times 10^{-3}$, **** $p < 1 \times 10^{-4}$, ***** $p < 1 \times 10^{-5}$, ***** $p < 1 \times 10^{-6}$).

Les mEJPs montrent une forte variabilité intra-génotype, empêchant de conclure sur l'amplitude probablement à cause d'une forte variabilité expérimentale ou d'un manque d'effectif pour la puissance statistique (Figure 30, A & B). En revanche, la fréquence des mEJP est augmentée dans les simples mutants *Fak* KO et *Amph* KO à une amplitudes comparables, avec une addition apparente dans le double KO, ce qui en fait un phénotype assez intéressant (Figure 30, A & C). L'amplitude des potentiels évoqués ne diffère pas significativement entre génotypes, un résultat qui ne corrèle pas avec l'augmentation décrite ailleurs pour *Fak* et qui, malgré le surcroît de boutons chez *Fak* KO, suggère un maintien de l'amplitude de l'EJP après stimulation (Figure 30, D & E). Lors des trains de stimulation à 10 Hz, la dépression à court terme reste globalement dans la plage des WT, sauf une lignée *Fak* KO qui résiste mieux à la fatigue. De plus, les deux *Fak* KO tendent à conserver une amplitude en fin de stimulation plus élevée que les autres conditions (Figure 30, F & G).

Pour étendre l'analyse fonctionnelle au-delà de la JNM, j'ai profité de ma mobilité dans le laboratoire du Pr Patrik Verstreken pour réaliser des électrorétinogrammes (ERG) chez la Drosophile. Cet enregistrement fournit, dans l'œil, une mesure globale de la réponse des photorécepteurs et de la transmission synaptique vers les neurones postsynaptiques. Avec les mêmes génotypes que pour la JNM, j'ai évalué si les effets observés au niveau neuromusculaire se traduisent *in vivo* par des altérations détectables dans le système visuel.

Analyse électrophysiologique du système visuel par ERG

Historiquement, l'ERG de Drosophile est un paradigme ancien et robuste de neurophysiologie visuelle, largement utilisé pour cribler des mutants et disséquer la phototransduction et la transmission histaminergique de la rétine vers la lamina (Wu et al 2022, Vilinski et al 2012). L'ERG de Drosophile enregistre, à la surface de la cornée, la somme des potentiels générés par les photorécepteurs (R1–R8) et leurs neurones postsynaptiques de la lamina. Une stimulation lumineuse provoque (i) une dépolarisation négative qui reflète la phototransduction dans les photorécepteurs puis (ii) deux transitoires brefs, « ON » au début et « OFF » à l'extinction du flash, qui proviennent de l'activité synaptique aux premières synapses visuelles (photorécepteurs → cellules monopolaires L1/L2 de la lamina) et constituent donc un readout sensible de la transmission synaptique (Figure 31, A). Les études antérieures ont montré que

les transitoires ON/OFF disparaissent lorsque la transmission synaptique est compromise (gènes de la voie histamine/carboxy- β -alanine, transporteurs, récepteurs postsynaptiques), alors que l'amplitude du potentiel récepteur renseigne surtout sur l'intégrité de la phototransduction elle-même (Heisenberg et al 1971, Pantazis et al 2008, Yusein et al 2010).

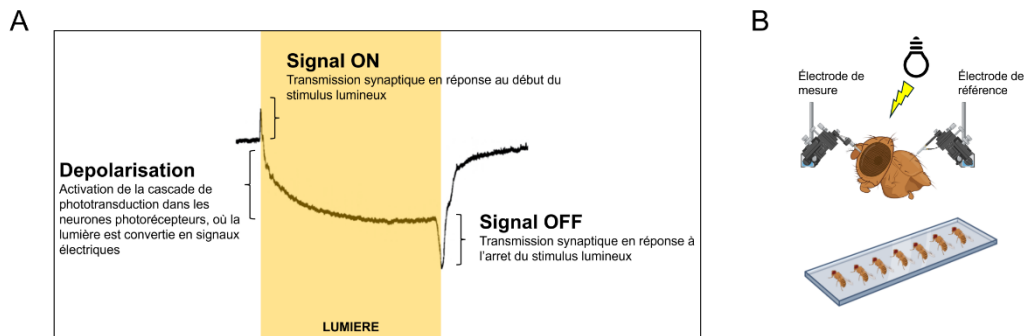


Figure 31. L'électrorétinogramme, un modèle historique robuste pour mesurer l'activité électrique neuronale chez la Drosophile. (A). Schéma d'un tracé classique d'électrorétinogramme. (B). Schéma du protocole de mesure d'ERG de Drosophile adulte.

Parce que les transitoires ON/OFF de l'ERG rapportent directement l'efficacité de la transmission synaptique entre photorécepteurs et interneurons de la lamina, l'ERG est particulièrement adapté pour tester notre hypothèse d'une interaction fonctionnelle *Amph-Fak* au niveau synaptique. Une diminution sélective des transitoires (à potentiel récepteur conservé) pointerait vers un défaut de couplage synaptique, alors qu'un effet parallèle sur le potentiel récepteur impliquerait aussi la phototransduction. J'ai donc utilisé l'ERG comme lecture physiologique complémentaire des phénotypes structuraux (boutons, zones actives) pour relier l'architecture synaptique à la fonction dans le contexte de l'interaction *Fak-Amph*.

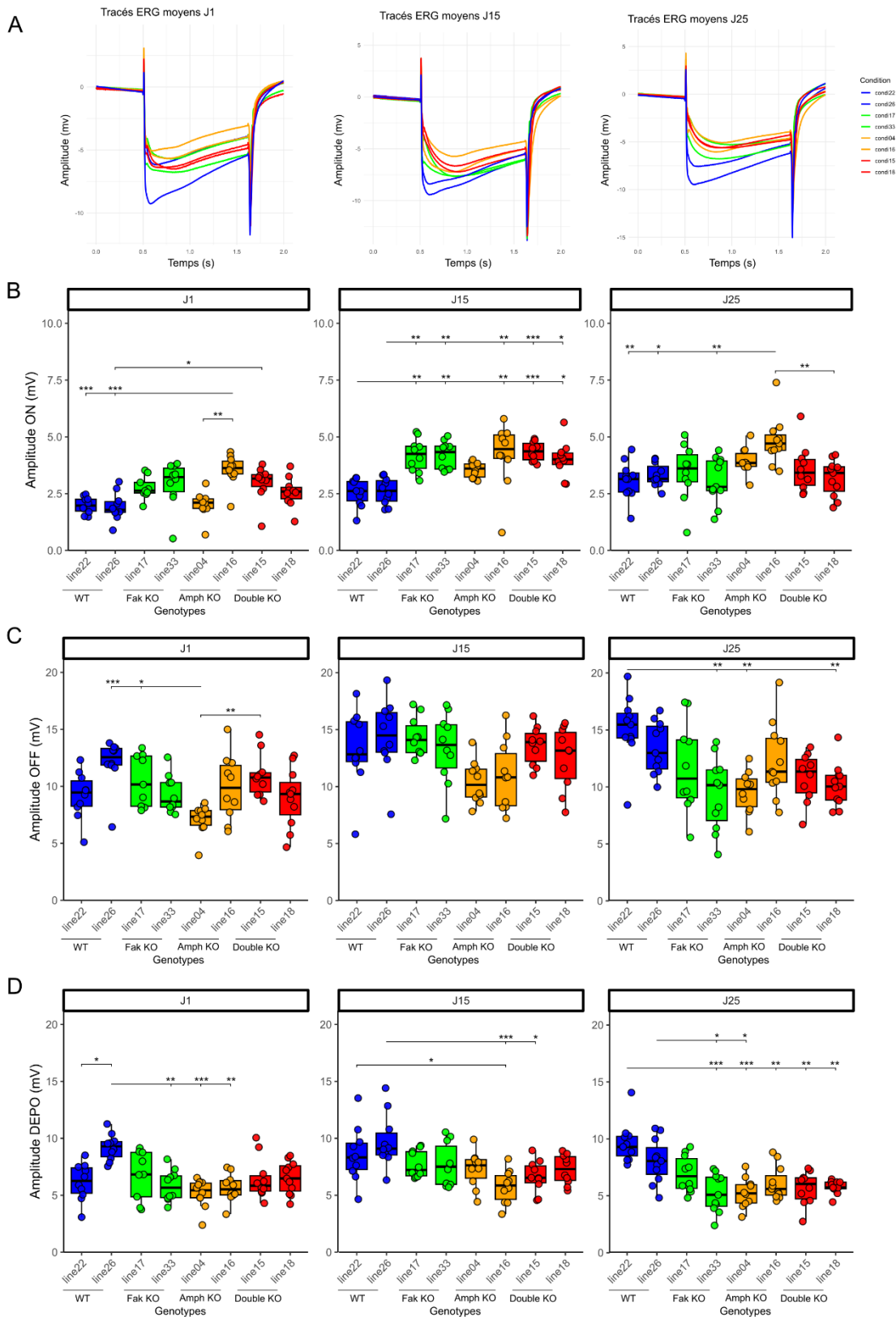


Figure 32. Électrorétinogrammes : transients ON/OFF et dépolarisation soutenue aux âges J1, J15 et J25 des lignées Fak et Amph KO. (A) Tracés moyens des ERG pour chaque génotype à J1, J15 et J25 post-éclosion. Code couleur : WT (lignées #22, #26) bleu ; Fak KO (#17, #33) vert ; Amph KO (#04, #16) orange ; double KO (#15, #18) rouge. Les tracés illustrent la dépolarisation des photorécepteurs et les signaux ON/OFF, marqueurs de la transmission vers les neurones

postsynaptiques. Axes : amplitude (mV) / temps (s). (B) Quantifications par génotype et par âge (deux lignées indépendantes par condition : Amplitude ON (mV) = amplitude du transient à l'alumage du stimulus, amplitude de dépolarisation (DEPO) (mV) = amplitude du plateau photorécepteur et amplitude OFF (mV) = amplitude du transient à l'extinction du stimulus. Analyse statistique : Test non paramétrique de Kruskal–Wallis suivi du post-hoc de Dunn avec correction de Holm (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 1 \times 10^{-3}$; **** $p < 1 \times 10^{-4}$; ***** $p < 1 \times 10^{-5}$; ***** $p < 1 \times 10^{-6}$).

Aux âges J1, J15 et J25, les tracés moyens d'ERG et leurs quantifications montrent des effets différenciés selon la nature du signal observé et selon le génotype. Pour le signal ON, indicateur de la transmission du photorécepteurs aux neurones postsynaptiques, on observe à J1 puis J15 une augmentation d'amplitude chez *Fak* KO et *Amph* KO. Notablement, le double KO n'excède pas ces effets (valeurs similaires aux simples KO), ce qui suggère une absence d'additivité. À J25, cette élévation du ON s'atténue et n'est plus évidente, indiquant une forte dépendance à l'âge du phénotype (Figure 32, B). Du côté de la dépolarisation, reflet du potentiel photorécepteur, pas d'effet marqué à J1 (hormis une lignée WT plus élevée), puis une tendance à la baisse apparaît à J15 et se confirme à J25 pour toutes les lignées KO (simples et double) (Figure 32, D). Enfin, pour le signal OFF, malgré une variabilité intra-génotype importante à J1, on note à J15 une diminution plus nette chez *Amph* KO cependant non significative, tandis qu'à J25, une baisse globale concerne une lignée *Fak* KO, une *Amph* KO et une double KO (Figure 32, C). Ainsi, les altérations les plus précoces touchent surtout les signaux ON, alors que les effets plus tardifs concernent davantage la dépolarisation lors de la cascade de phototransduction et, dans une moindre mesure, le OFF.

Les données recueillies suggèrent, avec prudence, un transitoire ON plus élevé chez les simples mutants *Amph* KO et *Fak* KO sans hausse parallèle de la dépolarisation soutenue (DEPO), ce qui pourrait correspondre à une modulation au niveau de la lamina plutôt qu'à un gain primaire d'excitabilité des photorécepteurs. À J25, le recul du ON accompagné d'une baisse de DEPO dans l'ensemble des KO pourrait indiquer qu'avec l'âge la phototransduction devient plus limitante que le seul réglage synaptique. Le double KO ne dépasse pas les effets des simples (ON comparable et tendances parallèles sur DEPO et OFF), ce qui n'étaye pas, à ce stade, l'existence d'une interaction *Amph-Fak* dans ce tissu. Enfin, la cinétique temporelle souligne que le vieillissement de la Drosophile pèse fortement sur les amplitudes et peut masquer ou remodeler les signatures génotypiques. En somme, *Amph* et *Fak* pourraient moduler la transmission synaptique au niveau visuel mais sans interaction détectable. Cela dit, ces résultats restent difficiles à conclure fermement en raison de la variabilité et des effectifs notamment dûs à la durée relativement courte de ma mobilité. Ainsi, ces résultats restent exploratoires et ils mériteraient d'être répliqués.

Conservation de l'interaction chez les mammifères

Après avoir établi *in vivo*, chez la Drosophile, que *Amph* et *Fak* modulent ensemble la morphologie synaptique et certains phénotypes fonctionnels, l'étape suivante consiste à tester la conservation de cette interaction fonctionnelle dans des neurones de mammifères via leurs orthologues *BIN1* et *PTK2B*. Le passage au modèle mammifère visait à valider la pertinence physiopathologique de nos observations chez la Drosophile, en les confrontant à un système neuronal plus proche de l'humain, tout en permettant d'en disséquer les mécanismes cellulaires sous-jacents. Ce modèle offre en effet la possibilité d'examiner finement le rôle de BIN1 et PTK2B dans l'organisation et la fonction synaptiques, dans un contexte où leurs isoformes et voies de signalisation sont propres aux mammifères. Pour cela, j'ai utilisé des cultures primaires de neurones hippocampiques de rat (PNC), un cadre expérimental qui me permet de moduler l'expression de *BIN1* et de *PTK2B* par transduction lentivirale de shRNA et d'analyser la morphologie dendritique ainsi que la densité synaptique. Le but était d'évaluer une co-localisation entre BIN1 et PTK2B dans ce modèle mammifère et d'étudier la conservation fonctionnelle de leur rôle dans l'architecture neuronale et la densité synaptique. En miroir de la logique expérimentale mise en place *in vivo* chez la Drosophile avec *Amph* et *Fak*, j'ai voulu évaluer l'effet des invalidations de *BIN1* et *PTK2B* et les comparer à la double invalidation. Conformément à cette logique, la première étape a été de valider les outils d'invalidation : plusieurs constructions shBIN1 et shPTK2B ont été criblées, et les Western blots présentés ci-après ont servi à sélectionner les séquences les plus efficaces et spécifiques pour la suite des expériences.

Optimisation de la transduction pour l'invalidation de BIN1

Dans des travaux antérieurs du laboratoire, un shRNA dirigé contre BIN1 a été développé et validé. Ce système d'interférence a d'abord permis de caractériser l'interaction BIN1–Tau par PLA sur neurones primaires, puis de moduler expérimentalement ce signal d'interaction en abaissant l'expression endogène de BIN1 (Sottejeau et al 2015, Sartori et al 2019). J'ai récupéré la construction shBIN1 employée dans ces études et revalidé son efficacité par Western blot dans mes préparations.

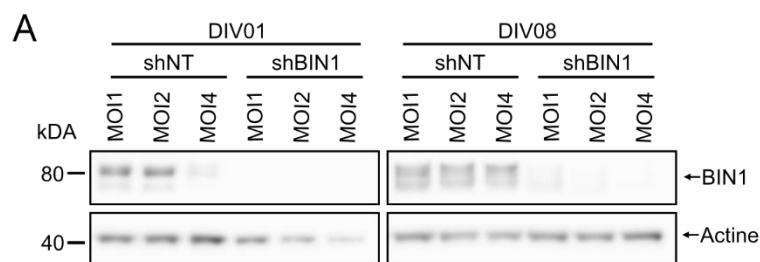


Figure 33. L'inactivation de BIN1 est efficace par transduction lentivirale d'un shRNA à DIV8 à MOI4. Western Blot représentatifs de BIN1 (≈ 80 kDa) et de l'actine (≈ 42 kDa) dans des neurones hippocampiques primaires de rat transduits avec un shRNA dirigé contre BIN1 (shBIN1, séquence validée précédemment pour des expériences de PLA; Sartori et al., 2019) ou un shRNA non ciblant (shNT). Deux fenêtres de transduction ont été comparées (DIV1 vs DIV8) et trois multiplicités d'infection (MOI 1, 2, 4).

Afin d'obtenir une inactivation efficace de BIN1, j'ai optimisé la fenêtre de transduction et la dose virale dans des cultures primaires de neurones hippocampiques de rat. J'ai utilisé un shRNA anti-BIN1 en parallèle d'un shRNA non ciblant (shNT). Les cellules ont été transduites soit précocement (DIV1), soit à maturité intermédiaire (DIV8), avec MOI 1, 2 ou 4. L'expression de BIN1 a été quantifiée. L'actine a servi de contrôle de chargement et d'indicateur indirect d'une éventuelle toxicité du shRNA

Les WB (Figure 33) montrent qu'à DIV1, en plus de la baisse de BIN1 induite par le shRNA, le signal d'actine diminue également. Cette réduction, associée à une mortalité cellulaire importante constatée visuellement au microscope sur les cultures, indique un stress lié à une transduction trop précoce. À l'inverse, à DIV8, la déplétion de BIN1 est franche et dose-dépendante (MOI 1 < MOI 2 < MOI 4) sans altération de l'actine, indiquant une meilleure tolérance du réseau neuronal plus mature. Sur cette base, nous avons retenu DIV8 comme fenêtre de transduction et MOI 4 comme compromis optimal « efficacité/innocuité » pour toutes les expériences suivantes. Cette configuration garantit une baisse robuste de BIN1 tout en préservant la viabilité neuronale, condition essentielle pour interpréter correctement les phénotypes synaptiques.

Optimisation de la transduction pour l'inactivation de PTK2B

Contrairement à BIN1, pour lequel je disposais d'un shRNA déjà éprouvé au laboratoire, la sélection d'un outil d'inactivation pour PTK2B a nécessité un criblage systématique dans mon modèle de neurones hippocampiques primaires de rats. J'ai retenu DIV8 comme point de transduction pour le criblage des shPTK2B, par cohérence avec l'optimisation préalable réalisée pour shBIN1. La transduction à DIV8 garantit une bonne efficacité lentivirale tout en

préservant la viabilité des neurones. J'ai ainsi testé un panel de shPTK2B transduits à DIV8 et à MOI 1, 2 ou 4, avec une lecture Western blot ciblant pPTK2B (site d'autophosphorylation Y402) et PTK2B total, tout en excluant des effets hors-cible via le suivi de FAK, le paralogue de PTK2B et pFAK sa forme phosphorylée avec la tubuline et l'actine comme contrôles de charge et de viabilité.

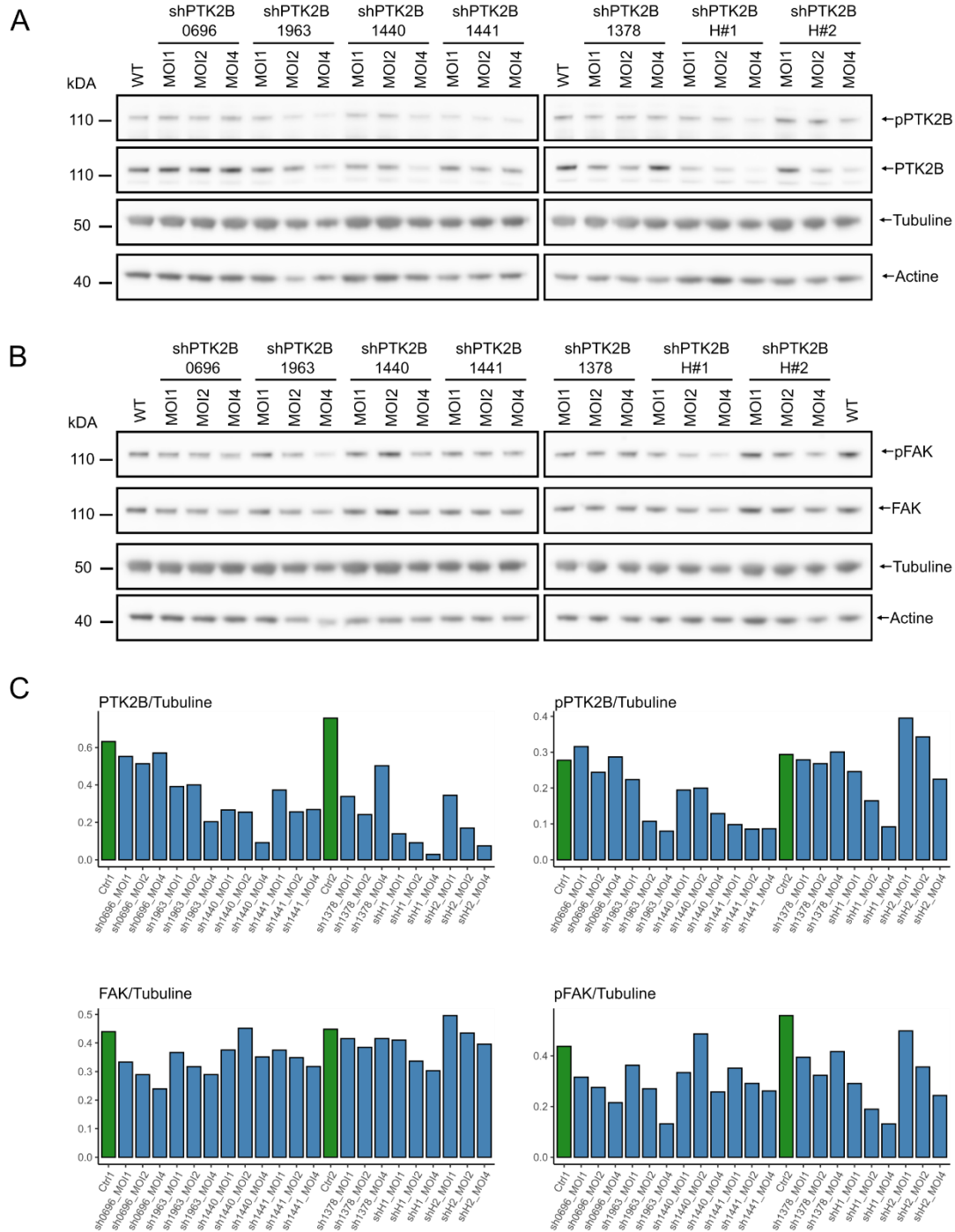


Figure 34. Optimisation de la transduction pour l'inactivation de PTK2B. Western Blot de neurones hippocampiques primaires (DIV8) transduits avec une série de shPTK2B (0696, 1963, 1440, 1441, 1378, H#1, H#2) à MOI 1, 2 ou 4, comparés à un témoin non transduit (WT). (A) WB PTK2B phosphorylé (pPTK2B, ~110 kDa) et PTK2B total avec Tubuline et actine servant de contrôles de charge/viabilité. (B) WB pFAK et FAK avec tubuline et actine servant de contrôles de charge/viabilité. (C) Quantification PTK2B/tubuline, pPTK2B/tubuline, FAK/tubuline et pFAK/tubuline. Ctrl en vert et shPTK2B en bleu.

J'ai criblé un panel de shRNA dirigés contre PTK2B (0696, 1963, 1440, 1441, 1378, H#1, H#2) dans des neurones hippocampiques primaires transduits à DIV8 et lysés après maturation synaptique à DIV21. Chaque construction a été testée aux MOI 1, 2 et 4. L'efficacité et la spécificité ont été évaluées par Western blot sur PTK2B total et pPTK2B en Y402, avec un contrôle d'effets hors-cible sur le paralogue FAK (FAK total et pFAK). Les signaux ont été normalisés aux contrôles de charge tubuline et actine, qui restent stables pour l'ensemble des conditions, indiquant l'absence de toxicité détectable aux MOI testés sauf pour les conditions sh1963 et H#2 (Figure 34).

Globalement, plusieurs constructions montrent une réduction dose-dépendante de PTK2B. Parmi elles, sh1440, shH#1 et shH#2 présentent les profils de diminution d'expression les plus nets dès MOI 1 et 2, sans baisse concomitante de FAK, ce qui plaide pour une bonne spécificité. À l'inverse, d'autres séquences (ex. 0696, 1963, 1378, 1441) sont moins efficaces avec une diminution partielle à MOI 1 et nécessitent des MOI plus élevés pour un niveau équivalent à la baisse observée en MOI 1 avec les shRNA les plus efficaces. De plus, ils n'apportent pas de bénéfice en termes de spécificité. Concernant la forme phosphorylée active, pPTK2B brut diminue en parallèle de PTK2B et présente le même profil de diminution.

Sur la base de ces critères : efficacité avec MOI faible, spécificité vs FAK/pFAK, absence de toxicité et reproductibilité, j'ai retenu le shPTK2B H#1 et fixé MOI 1 comme compromis optimal (diminution robuste de PTK2B et pPTK2B, très peu d'effet sur le niveau de FAK et pFAK). shH#2 et sh1440 se comportent également bien, mais H#1 offre le meilleur rapport efficacité/variabilité sans devoir augmenter le MOI.

Pour assurer la comparabilité avec les expériences shBIN1 à MOI 4 et préparer les co-transductions pour la double inactivation (shBIN1 + shPTK2B), j'ai maintenu un MOI total constant de 4 dans toutes les conditions. Ainsi, la condition shPTK2B seul à MOI 1 a été complétée par un shNT à MOI 3. Chaque culture transduite a donc reçu un MOI cumulé de 4.

Co-localisation BIN1-PTK2B dans des neurones hippocampiques en culture primaire
Pour tester si BIN1 et PTK2B co-localisent au sein de complexes endogènes dans les neurones de mammifère, j'ai utilisé l'in situ Proximity Ligation Assay (PLA). Le principe repose

sur deux anticorps primaires dirigés contre les protéines d'intérêt, révélés par des sondes secondaires couplées à des oligonucléotides complémentaires. Lorsque les deux épitopes sont à moins de ~40 nm, les oligonucléotides s'hybrident. Après ligation, ils sont amplifiés par une polymérase avec des nucléotides fluorescent générant un signal fluorescent ponctiforme visualisable au microscope. La technique de PLA est ainsi un proxy sensible d'une co-localisation compatible avec une interaction directe ou une appartenance à un même complexe à l'échelle du nanomètre, tout en restant réalisable sur cellules fixées et en conservant l'architecture neuronale. Elle est largement validée pour l'étude d'interactions protéiques in situ en neurobiologie.

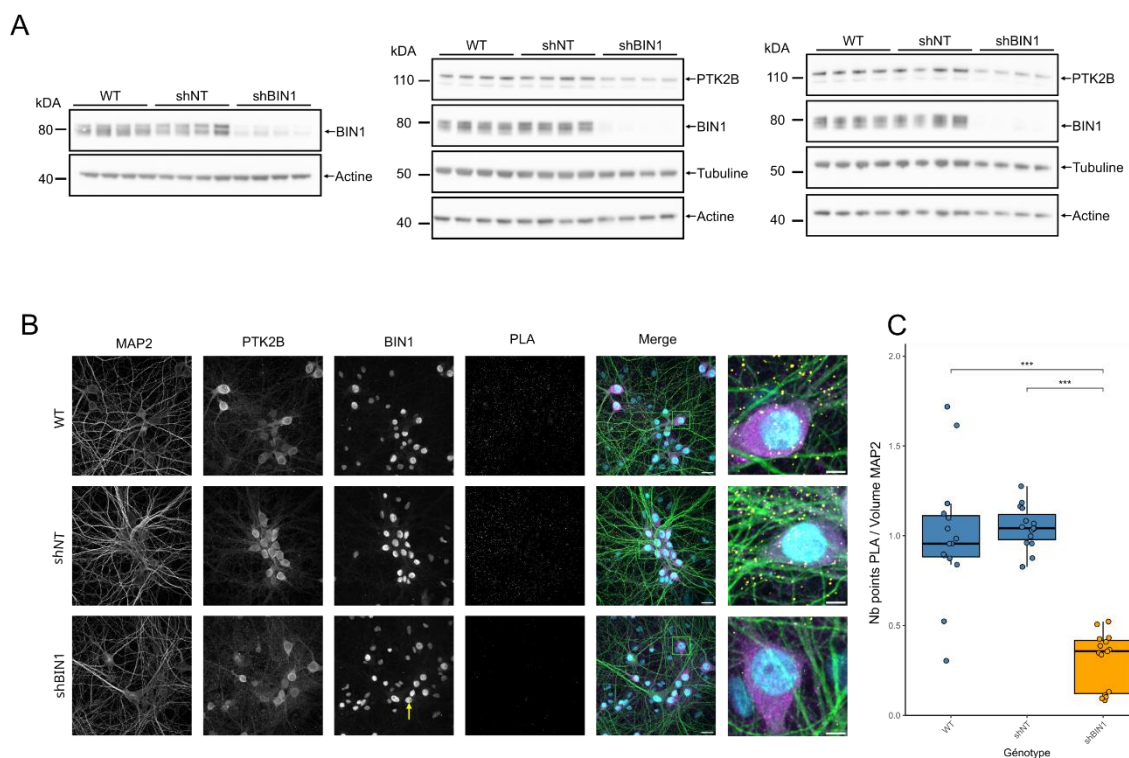


Figure 35. BIN1 et PTK2B co-localisent en neurones primaires hippocampiques de rats. (A). Western Blot ($n=3$) qui atteste de l'efficacité du shBIN1 sur la diminution d'expression de la protéine BIN1. L'Actine et la tubuline ont été utilisés en contrôle de charge et d'intégrité cellulaire. (B) Image IF et PLA des 3 conditions : WT, shNT et shBIN1. Marquage des neurones avec un anti-MAP2 en vert, marquage de PTK2B en magenta, marquage de BIN1 en cyan et points PLA en jaune. La flèche jaune indique un marquage aspécifique de BIN1 dans le noyau. (C). Quantification des points PLA normalisé par le volume du réseau MAP2. Les données ont été analysées par un test non paramétrique de Kruskal–Wallis suivi d'un post-hoc de comparaisons multiples de Dunn (correction de Holm ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 1 \times 10^{-4}$, ***** $p < 1 \times 10^{-6}$).

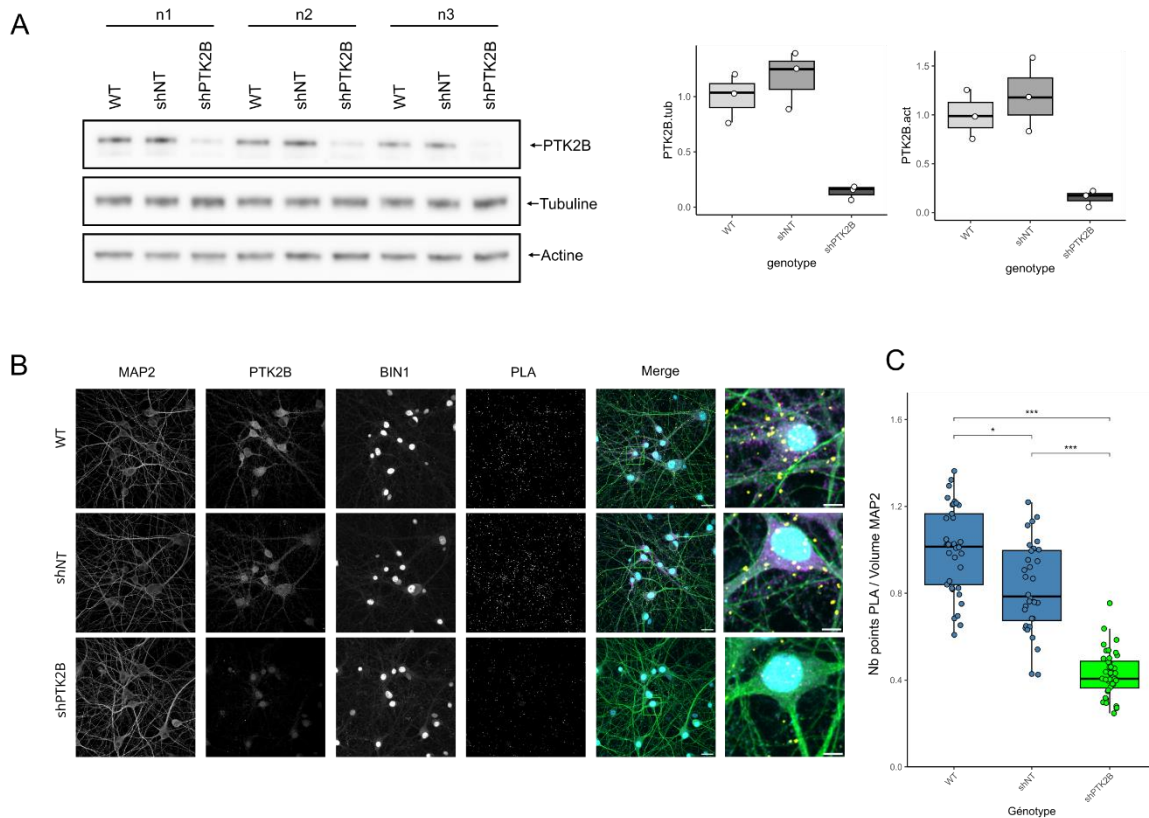


Figure 36. BIN1 et PTK2B co-localisent spécifiquement en neurones primaires hippocampiques de rats. (A). Western Blot avec quantifications associées ($n=3$) qui atteste de l'efficacité du shPTK2B sur la diminution d'expression de la protéine PTK2B. L'actine et la tubuline ont été utilisés en contrôle de charge et d'intégrité cellulaire. (B). Image IF et PLA des 3 conditions : WT, shNT et shPTK2B. Marquage des neurones avec un anti-MAP2 en vert, marquage de PTK2B en magenta, marquage de BIN1 en cyan et points PLA en jaune. (C). Quantification des points PLA normalisé par le volume du réseau MAP2. Les données ont été analysées par un test non paramétrique de Kruskal–Wallis suivi d'un post-hoc de comparaisons multiples de Dunn (correction de Holm ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 1 \times 10^{-4}$, ***** $p < 1 \times 10^{-6}$).

Dans des cultures primaires d'hippocampe de rat, j'ai compté les points PLA BIN1-PTK2B uniquement quand ils se trouvaient à l'intérieur du marquage anti-MAP2 (territoires somato-dendritiques). Cette restriction évite de quantifier des signaux non spécifiques ou situés hors des neurones. Les points PLA sont ensuite normalisés au volume MAP2, ce qui contrôle la densité du réseau analysé. MAP2 est un marqueur canonique des dendrites et du cytosquelette neuronal, ce qui en fait une référence robuste pour ce type de normalisation morphométrique (Cáceres et al 1984, Dotti et al 1988). Le masquage couvre donc majoritairement le compartiment dendritique sans viser à distinguer formellement dendrites et axones, l'objectif premier étant d'assurer que les puncta quantifiés sont intracellulaires

Deux séries de contrôles de spécificité ont été réalisées : (i) l'inactivation de BIN1 (shBIN1) (Figure 35) et (ii) l'inactivation de PTK2B (shPTK2B) (Figure 36). Dans chaque série, des western blots confirment l'efficacité de la réduction d'expression avec une diminution nette de

la bande cible par rapport aux témoins, et l'immunofluorescence montre une réduction concordante du signal BIN1 (ou PTK2B) dans le réseau MAP2. À noter toutefois qu'un signal nucléaire BIN1 persiste en condition d'inactivation. Ce marquage, reproductible avec toutes les combinaisons d'anticorps testées, est très probablement aspécifique et suggère la reconnaissance d'un épitope nucléaire non-BIN1 par les anticorps anti-BIN1 (Figure 35, B). Surtout, dans les deux paradigmes, j'observe une chute marquée du nombre de points PLA BIN1-PTK2B dans la condition d'inactivation par rapport au contrôle WT et shNT. Cette diminution du signal PLA uniquement aux conditions d'inactivation indique bien que les points reflètent la proximité conjointe de BIN1 et de PTK2B et non un bruit de fond non spécifique (Figure 35, B et C)(Figure 36, B et C).

Ensemble, ces résultats montrent que BIN1 et PTK2B co-localisent à l'échelle nanométrique dans des neurones hippocampiques de mammifère dans les compartiments dendritiques. Le signal PLA disparaît spécifiquement lorsqu'on sous-exprime l'un ou l'autre partenaire, ce qui suggère une interaction physique BIN1-PTK2B in situ. Ces résultats étayent l'hypothèse d'une voie commune conservée des Drosophiles aux neurones de mammifère. Cette co-localisation fournit ainsi le socle cellulaire pour analyser, dans les sections suivantes, ses conséquences fonctionnelles sur l'organisation des synapses. D'abord, en miroir de la logique expérimentale mise en place chez la Drosophile, nous avons mis en place une inactivation simple et combinée de *BIN1* et *PTK2B* et vérifié son efficacité.

Réduction d'expression simple et double de *BIN1* et *PTK2B* dans les PNC : validation et quantification

Afin d'assurer la continuité méthodologique entre l'optimisation des shRNA et les analyses cellulaires, j'ai d'abord validé par Western blot l'efficacité et la spécificité des inactivations dans les cinq conditions retenues : WT, shNT, shBIN1, shPTK2B et double inactivation (shBIN1+shPTK2B) toujours en conditions de transduction DIV8. Cette étape, d'inactivations simples puis combinées pour tester une interaction fonctionnelle, fournit le socle de référence pour interpréter les expériences suivantes d'analyse du réseau MAP2, de densité synaptique et de connectivité synaptique.

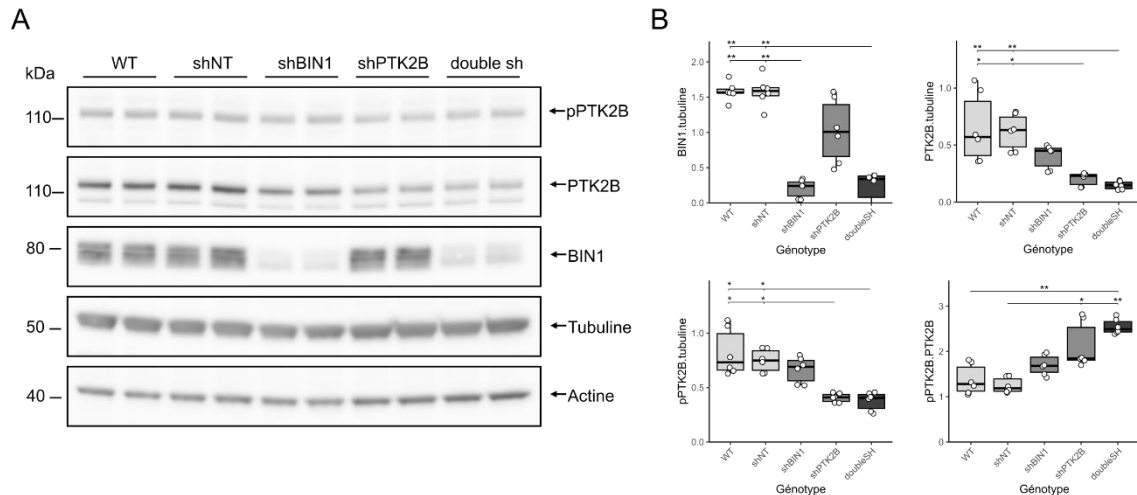


Figure 37. Validation par Western blot de l'inactivation de BIN1 et/ou PTK2B par shRNA. Neurones hippocampiques de rat (DIV8) transduits avec shNT (contrôle non ciblant), shBIN1, shPTK2B ou double inactivation (shBIN1+shPTK2B), comparés à WT (non transduits). (A) WB pour BIN1, PTK2B et pPTK2B, avec la tubuline et l'actine comme contrôles de charge. (B) Quantifications densitométriques normalisées au contrôle de charge tubuline.

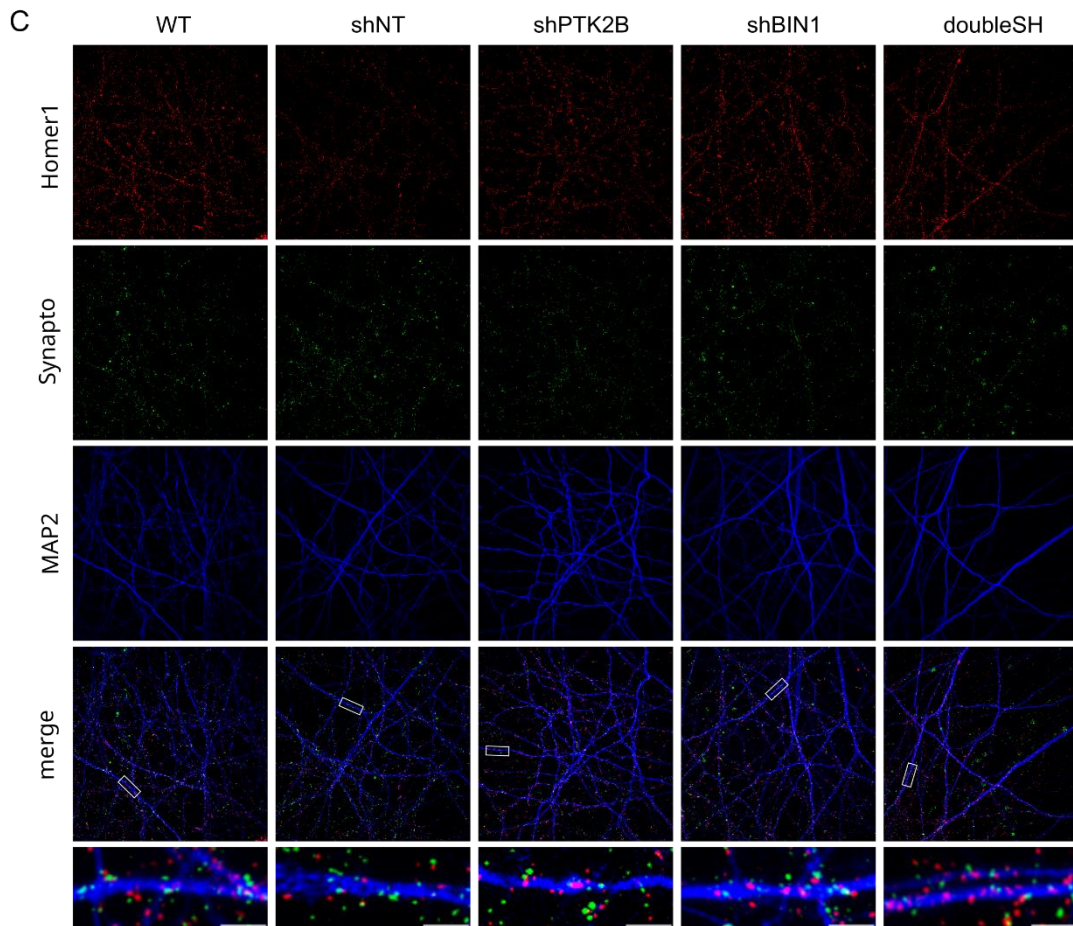
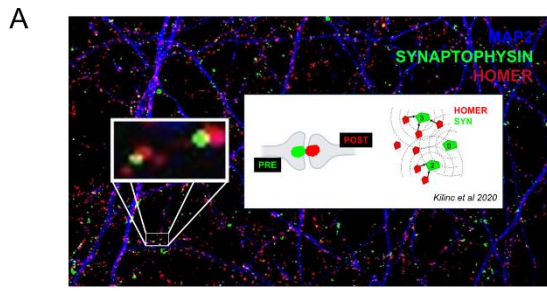
Les Western blots valident l'efficacité et la spécificité de l'inactivation dans les PNC. D'une part, BIN1 chute nettement dans shBIN1 et dans shBIN1+shPTK2B. D'autre part, PTK2B diminue fortement dans shPTK2B et dans shBIN1+shPTK2B, comparativement à WT et shNT. Les densitométries ont été normalisées au contrôle de charge tubuline pour BIN1 et PTK2B. La forme active de PTK2B a été évaluée via sa phosphorylation sur la tyrosine 402 (pPTK2B-Y402), analysé à la fois brut avec le ratio pPTK2B/tubuline et en rapport d'activation pPTK2B/PTK2B total. La stabilité des contrôles de charge, l'absence de bandes additionnelles ou de dégradation, et la constance de l'intensité globale indiquent l'absence de toxicité détectable aux MOI retenus (Figure 37). Au-delà des effets attendus, des variations croisées sont mises en évidence : légère diminution des niveaux de PTK2B en condition d'inactivation de BIN1 et, réciproquement, baisse modérée de BIN1 en condition d'inactivation de PTK2B, suggérant que les deux protéines se stabilisent mutuellement.

Fait notable, l'activation relative de PTK2B (rapport pPTK2B/PTK2B) augmente progressivement de shBIN1 à shPTK2B, puis à la co-inactivation, indiquant une sensibilité de la kinase à ces déséquilibres. Ce profil est en miroir des niveaux de PTK2B et de ce fait, compatible avec un mécanisme compensatoire : à mesure que PTK2B total diminue, la fraction autophosphorylée Y402 augmente, de façon à maintenir un niveau d'activité de PTK2B proche du témoin. Ces observations traduisent donc, d'une part, une modulation réciproque des niveaux protéique entre BIN1 et PTK2B ; et d'autre part, une compensation de la réduction des niveaux de PTK2B par une augmentation de son activation.

Ainsi, la validation de nos invalidations simples et combinés de *BIN1* et *PTK2B* établit un socle expérimental fiable efficace, comparable et non cytotoxique pour interpréter les lectures cellulaires à venir. Dans la continuité du modèle Drosophile, j'ai examiné, dans les neurones de mammifère la densité et la connectivité synaptiques et l'organisation du réseau dendritique. Cette stratégie établit un pont conceptuel entre les phénotypes de la mouche et nos lectures cellulaires. Enfin, en comparant systématiquement les effets des invalidations simples à ceux de la double invalidation, j'ai pu tester l'existence d'une interaction fonctionnelle entre *BIN1* et *PTK2B*.

BIN1 et PTK2B interagissent fonctionnellement pour réguler l'architecture dendritique et la connectivité synaptique des neurones hippocampiques de rat

Pour établir un phénotype quantitatif de la connectivité synaptique en culture, j'ai combiné des marqueurs de référence : synaptophysine pour les vésicules présynaptiques et Homer1 pour la densité postsynaptique. J'ai appliqué un protocole standardisé de marquage et de détection des points pré/post et leur assignation. Couramment employée, la co-localisation synaptophysine-homer1 permet d'estimer la densité synaptique putative. Des fenêtres d'association et des métriques normalisées au volume dendritique en ont récemment standardisé l'analyse (Verstraelen et al 2018, Kilinc et al 2020). L'usage de la Synaptophysine et d'Homer1 s'appuie sur des bases moléculaires solides : Synaptophysine est une protéine de vésicule synaptique découverte dès les années 1980 et devenue un marqueur présynaptique canonique (Leube et al 1987, McMahon et al 1996, Sze et al 1997) tandis qu'Homer1 est une protéine d'échafaudage du compartiment postsynaptique couplant récepteurs métabotropes et effecteurs calciques, clé de l'organisation postsynaptique (Mao et al 2005).



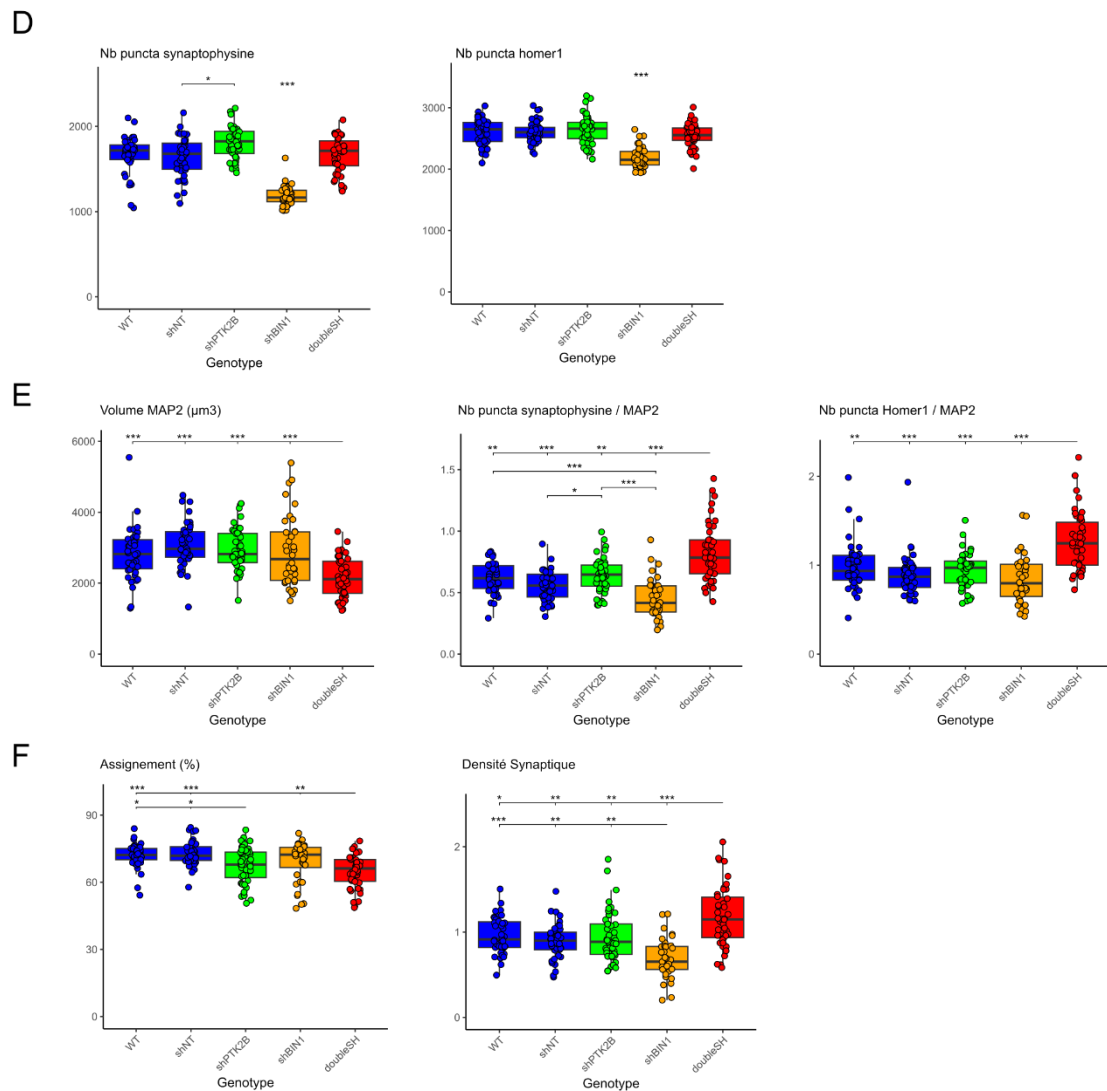


Figure 38. La perte combinée de BIN1 et PTK2B affecte le réseau dendritique et la densité de synapses dans ce réseau. (A) Schéma de quantification. Principe de l'assignation "pré/post" des synapses : co-détection de Synaptophysine (pré-synaptique, vert) et Homer1 (post-synaptique, rouge) le long du réseau dendritique (MAP2, bleu). Un complexe synaptique est compté lorsqu'un spot Synaptophysine est spatialement apparié à un ou plusieurs spot Homer1 selon un algorithme d'assignation (fenêtre de distance) inspiré des approches publiées pour la quantification des synapses en culture primaire dans Kilinc et al 2020. (B) Western blots des niveaux d'expression des marqueurs (Synaptophysine, Homer1, contrôle(s) de charge) dans les cinq conditions expérimentales (WT, shNT, shBIN1, shPTK2B, double sh). (C) Immunofluorescence : Homer1 (rouge), Synaptophysine (vert), MAP2 (bleu). Les puncta et les surfaces sont détectés et quantifiés (Imaris) ; l'assignation pré/post est calculée (script MATLAB). (D) Quantifications. (i) nombre de puncta Synaptophysine, (ii) nombre de puncta Homer1. (E) Quantifications. (i) Volume MAP2 (μm^3), (ii) nombre de puncta Synaptophysine et Homer1 normalisés au volume MAP2. (F) Quantifications. (i) pourcentage d'assignation (co-localisation pré/post), (ii) densité synaptique calculée = (nb total de spots Syn x % d'assignation/100) / volume MAP2. Les données ont été analysées par un test non paramétrique de Kruskal–Wallis suivi d'un post-hoc de comparaisons multiples de Dunn (correction de Holm ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 1 \times 10^{-4}$, ***** $p < 1 \times 10^{-6}$).

Les WB (Figure 38, B) révèlent des modulations différentielles des marqueurs synaptiques selon les conditions d'invalidation. On observe notamment une diminution de MAP2 et d'Homer1 dans les conditions shBIN1 et double sh, ainsi qu'une réduction de Synaptophysine dans la double invalidation, tandis que la tubuline reste stable, attestant d'une charge protéique comparable entre échantillons. Ces profils suggèrent que les invalidations de BIN1 et PTK2B exercent un impact potentiel sur la composition synaptique et la structuration du cytosquelette neuronal. Toutefois, ces données issues de lysats totaux reflètent une quantité globale de protéines, sans distinction entre les fractions véritablement synaptiques et les pools intracellulaires mobilisables. Pour en apprécier la portée dans un contexte morphologique défini, nous nous appuyerons plutôt sur les quantifications des marquages en IF (Figure 38, C).

Le comptage global des puncta Synaptophysine et Homer1 révèle une baisse significative en invalidation de *BIN1*, aucun effet net (une légère augmentation de Synaptophysine) en invalidation de *PTK2B*. La double invalidation montre des valeurs similaires aux contrôles (Figure 38, D). Ni shBIN1 ni shPTK2B ne modifient le volume MAP2 par rapport au contrôle shNT. En revanche, la co-invalidité entraîne une diminution nette du volume MAP2, indiquant une réduction de la masse dendritique (Figure 38, E). Après normalisation des puncta Synaptophysine et Homer1 au volume MAP2, les tendances se précisent. Pour Synaptophysine, on observe une augmentation modérée en shPTK2B, une baisse en shBIN1, et une forte augmentation en double invalidation. Pour Homer1, la normalisation ne montre pas d'effet en shPTK2B, supprime la diminution observée précédemment en shBIN1, et met également en évidence une hausse marquée en double invalidation. Ces profils suggèrent une densification locale des complexes synaptiques lorsque BIN1 et PTK2B sont co-invalidés (Figure 38, E). Le taux d'assignation qui correspond au pourcentage d'appariement pré/post n'est que faiblement diminué en double sh, ce qui indique que l'association pré-post donc la connectivité reste globalement préservée malgré les variations de densité des puncta et du volume MAP2 (Figure 38, F). En conséquence, la densité synaptique calculée est augmentée en double invalidation et légèrement diminuée en shBIN1, montrant davantage de synapses putatives par unité de dendrite lorsque les deux gènes sont invalidés (Figure 38, F).

Pris ensemble, ces résultats suggèrent une interaction fonctionnelle entre *BIN1* et *PTK2B* dans l'organisation du réseau dendritique et la densité des appariements pré/post. Le couplage de la baisse de MAP2 avec une hausse des puncta synaptiques en double invalidation évoque une reconfiguration du maillage synaptique. En effet on observe une compaction du réseau avec moins de volume dendritique mais une surreprésentation de micro-domaines synaptiques détectables avec plus de puncta normalisés et un assignement quasiment préservée.

Discussion

Synthèse et interprétation des résultats

Dans le premier objectif, en utilisant le modèle de la Drosophile, il a été mis en évidence qu'une surexpression de BIN1 isoforme 1 dans les motoneurones induit des altérations marquées de la JNM larvaire. Plus précisément, BIN1 iso1 provoque une croissance synaptique exacerbée caractérisée par une augmentation significative du nombre total de boutons synaptiques, accompagnée d'une réduction de leur taille moyenne, et par l'apparition d'un grand nombre de boutons satellites autour des terminaux nerveux. Ces boutons présentent ainsi une morphologie fragmentée, traduisant une désorganisation structurelle de la synapse. Ce phénotype toxique est spécifique à BIN1 iso1 et n'est pas observé avec d'autres isoformes de *BIN1* testées (telles que les isoformes 8 ou 9), soulignant le rôle particulier de la variante neuronale de BIN1 dans la morphogenèse synaptique. Ces observations suggèrent que BIN1 iso1 possède des fonctionnalités propres qui, dans un contexte présynaptique, peuvent perturber l'intégrité des synapses.

Étant donné que BIN1 participe à la dynamique membranaire (Nicot et al 2007) et que les boutons satellites sont classiquement interprétés comme des excroissances immatures révélatrices de défauts d'endocytose et de recyclage (Dickman et al 2006), j'ai évalué si le phénotype pouvait être corrigé en renforçant le recyclage endosomal dépendant de Rab11. Rab11 est une GTPase clé du compartiment endosomal de recyclage souvent impliquée dans la croissance synaptique. La co-expression de Rab11 avec BIN1 iso1 dans les motoneurones n'a cependant pas permis de restaurer la morphologie normale de la JNM larvaire : l'augmentation du nombre de boutons y compris des boutons satellites persiste malgré la surexpression de Rab11. Autrement dit, Rab11 ne parvient pas à "sauver" le phénotype induit par BIN1 iso1. Fait notable, l'expression de Rab11 seul entraîne un léger accroissement du nombre de boutons, et ses effets se cumulent de façon additive à ceux de BIN1 iso1 lorsqu'ils sont co-exprimés. Ceci indique que Rab11 peut moduler la croissance synaptique normale, mais que le dommage synaptique provoqué par BIN1 iso1 opère via des mécanismes que le simple renforcement de la voie de recyclage Rab11-dépendante ne suffit pas à compenser.

L'échec du sauvetage par Rab11 suggère que la synaptotoxicité induite par BIN1 iso1 ne résulte pas uniquement d'un défaut de recyclage endosomal, mais implique vraisemblablement d'autres mécanismes cellulaires en parallèle. En particulier, ces résultats laissent penser à un blocage situé en amont du recyclage endosomal Rab11-dépendant, ou à la contribution de voies indépendantes du trafic membranaire classique, telles que des

altérations de l'organisation du cytosquelette d'actine ou des interactions protéine-protéine spécifiques à cette isoforme. Cette hypothèse est cohérente avec les propriétés biochimiques de BIN1 : la protéine comporte un domaine N-BAR capable de remodeler les membranes courbées (Peter et al 2004), ainsi qu'un domaine SH3 pouvant recruter des effecteurs de l'actine tels que la dynamine (Meinecke et al 2013) ou le complexe N-WASP/Arp2/3 impliqués dans la plasticité membranaire (Yamada et al 2009, Falcone et al 2014). Ainsi, BIN1 iso1 pourrait déstabiliser la synapse en perturbant localement le cytosquelette ou en séquestrant des partenaires critiques, ce qui expliquerait que le simple fait de stimuler Rab11 ne suffise pas à inverser les dégâts.

Ces observations s'alignent avec des travaux antérieurs montrant que le recyclage médié par Rab11 participe normalement au contrôle de la croissance de la JNM par exemple via le transport des récepteurs de BMP et qu'une suractivation de Rab11 ne compense pas certains défauts d'endocytose existants (Choudhury et al 2022). Dans notre cas, l'incapacité de Rab11 à corriger les malformations synaptiques provoquées par BIN1 iso1 confirme que d'autres cibles en aval de BIN1 iso1 sont affectées, au-delà du seul trafic de membranes. En définitive, ce travail démontre la capacité de BIN1 iso1 à induire des défauts structuraux présynaptiques et met en lumière la spécificité fonctionnelle des isoformes de BIN1 en contexte neuronal. Fait important, les effets synaptiques délétères de BIN1 iso1 semblent conservés chez les mammifères : des études complémentaires *in vitro* ont montré que l'expression de BIN1 iso1 dans le compartiment présynaptique de neurones en culture entraîne également une perte de synapses fonctionnelles, un effet qui n'est pas reproduit par les isoformes non neuronales (iso8 et iso9). Cette spécificité d'isoforme de BIN1, combinée à son impact sur la connectivité synaptique, suggère que BIN1 iso1 pourrait agir comme un modulateur présynaptique critique de l'intégrité synaptique. Il s'ensuit que l'activité aberrante de BIN1 iso1 dans le cerveau pourrait contribuer à la vulnérabilité des synapses observée précocement dans la maladie d'Alzheimer, liant ainsi les altérations synaptiques induites par BIN1 à la pathogénèse de cette démence. Les résultats de ce projet enrichissent donc notre compréhension des mécanismes par lesquels le gène de susceptibilité BIN1 en particulier via son isoforme neuronale peut participer à la dégénérescence synaptique, et ouvrent la voie à des explorations futures sur les partenaires moléculaires et les voies spécifiques impliqués dans cette synaptotoxicité.

Dans le second objectif, j'ai d'abord établi le cadre génétique pour tester l'interaction *Amph-Fak* chez la Drosophile : par recombinaison, j'ai généré des lignées viables combinant les mutations perte de fonction *Fak*^{CG1} et *Amph*²⁶, obtenant ainsi les quatre génotypes d'intérêt (sauvage, *Amph* mutant, *Fak* mutant et double mutant). Ce dispositif m'a permis d'évaluer séparément et conjointement les effets d'*Amph* et de *Fak*.

J'ai d'abord cherché à clarifier l'origine du phénotype épileptique précédemment associé à la mutation perte de fonction *Fak*^{CG1} (Ueda et al 2008). Mes analyses ont finalement montré que ce phénotype n'était pas lié à la mutation elle-même, mais à une lésion génétique indépendante située ailleurs dans le génome.

J'ai ensuite examiné l'autre phénotype macroscopique étudié, à savoir la locomotion. Comme attendu, les lignées perte de fonction d'*Amph* reproduisent le défaut locomoteur décrit dans la littérature pour les *amph* KO (Leventis et al 2001). Fait intéressant, le double mutant *Fak-Amph* présente un déficit locomoteur encore plus sévère, suggérant une interaction fonctionnelle entre les deux gènes.

Afin d'explorer plus en détail cette interaction dans un contexte synaptique, j'ai étudié la JNM. Dans le mutant *Fak*, j'ai observé un phénotype de surcroissance caractérisé par un excès de boutons synaptiques, conformément aux phénotypes connus de perte de fonction de *Fak* (Tsai et al 2008). Dans le double KO, cette surcroissance est complètement restaurée à un niveau normal, indiquant une interaction fonctionnelle de type épistasie entre *Fak* et *Amph*. Ce résultat est robuste pour les JNM des muscles 6/7, et la même tendance est retrouvée au niveau des muscles 4. Ces observations sont cohérentes avec la quantification des aires pré- et post-synaptiques, plus étendues dans les *Fak* KO et restaurées dans les doubles mutants, sans modification notable du ratio pré/post.

Un autre paramètre morphologique s'est révélé particulièrement intéressant : les *Amph* KO présentent un nombre plus élevé de ramifications terminales au niveau de la JNM. Ce phénotype est encore amplifié dans le double mutant, suggérant cette fois une interaction synergique entre *Amph* et *Fak*.

L'analyse des zones actives des boutons synaptiques a montré un nombre total de ZA par JNM plus élevé dans les *Fak* KO, en accord avec l'augmentation du nombre de boutons. En revanche, aucune variation n'a été observée dans les *Amph* KO, et le phénotype est corrigé dans le double KO. Le nombre de ZA par bouton reste constant entre les conditions, indiquant que *Amph* et *Fak* n'interagissent pas directement sur la densité de zones actives par bouton, mais que la surcroissance observée chez les *fak* KO entraîne une augmentation proportionnelle du nombre total de ZA par JNM.

Concernant la localisation post-synaptique, le phénotype de délocalisation de la protéine Disc Large (Dlg) vers les tubules T, déjà décrit dans les *Amph* KO, a été confirmé dans nos lignées *Amph* perte de fonction ainsi que dans les doubles mutants, sans aggravation du phénotype. Aucune délocalisation n'a été observée dans les *Fak* mutants, ce qui confirme un effet spécifique d'*Amph* indépendant de *Fak*.

Sur le plan fonctionnel, j'ai ensuite étudié les propriétés électrophysiologiques de la JNM. Les potentiels spontanés n'ont pas montré d'effet clair sur l'amplitude, mais la fréquence des événements augmente dans les *Fak* KO et *Amph* KO, de manière similaire. Cette tendance est encore renforcée dans le double KO, suggérant ici un effet additif. En revanche, les potentiels évoqués après stimulation ne montrent pas de différence significative entre les conditions. Lors des trains de stimulation, j'ai observé une résistance accrue à la fatigue synaptique dans les *Fak* KO (significative pour une lignée et tendancielle pour l'autre), absente dans les *Amph* KO et restaurée dans le double KO.

Les électrorétinogrammes révèlent quant à eux une augmentation d'amplitude des courants transitoires ON (et dans une moindre mesure OFF) chez les mutants *Amph* et *Fak*, sans interaction évidente dans le double KO. À l'inverse, le courant de dépolarisation présente une tendance à la diminution dans les deux mutants simples, là encore sans interaction claire. Ces résultats, parfois simplement tendanciels et soumis à une forte variabilité, doivent être interprétés avec prudence et nécessitent d'être reproduits, notamment en raison du temps limité imposé par la mobilité.

Dans un second axe expérimental, j'ai étudié les interactions entre les homologues mammifères *BIN1* et *PTK2B* dans des cultures primaires de neurones hippocampiques de rat. Par expériences de PLA, j'ai mis en évidence une co-localisation spécifique de BIN1 et PTK2B au sein du réseau dendritique. Ces signaux diminuent fortement lors de l'invalidation de l'un ou l'autre gène, confirmant la spécificité de cette interaction.

Dans le même modèle, l'analyse quantitative de l'architecture dendritique et de la densité synaptique a révélé une interaction fonctionnelle entre *BIN1* et *PTK2B*. L'invalidation de *BIN1* entraîne une diminution du nombre de marqueurs pré- et post-synaptiques, phénotype qui est restauré dans la double invalidation. Le volume du réseau dendritique (MAP2) diminue uniquement dans la double condition. Lorsque l'on normalise le nombre de marqueurs synaptiques par le volume dendritique, on observe une diminution des marqueurs présynaptiques en shBIN1, une absence d'effet en shPTK2B, et une forte augmentation dans la double invalidation. Pour les marqueurs post-synaptiques, seule la double invalidation montre une augmentation marquée. L'assignement pré-post est légèrement diminué dans cette même condition.

Pris ensemble, ces résultats montrent une diminution de la densité synaptique en shBIN1, aucune modification en shPTK2B, et une forte augmentation dans la double invalidation, suggérant un effet épistatique inversé, voire antagoniste, entre *BIN1* et *PTK2B*. Ces observations renforcent l'idée d'une interaction fonctionnelle entre les deux gènes à la synapse, cohérente avec les résultats obtenus *in vivo* chez la Drosophile.

Hypothèses mécanistiques / Dans quelles voies de signalisation cette interaction BIN1-PTK2B pourrait être impliquée ?

Les phénotypes locomoteurs et synaptiques que j'ai observés au cours de ce projet suggèrent fortement que *Amph* et *Fak* agissent de concert dans la régulation du couplage neuromusculaire. Chez la Drosophile, la perte d'*Amph* conduit à des défauts locomoteurs majeurs, attribués à une désorganisation des tubules T et à une altération de la jonction excitation-contraction (Leventis et al 2001, Razzaq et al 2001). *Fak*, de son côté, est localisé au niveau présynaptique de la JNM où cette protéine régule négativement la croissance des terminaisons via la voie intégrine-MAPK (Tsai et al 2008). Le double mutant *Fak-Amph* présente un phénotype locomoteur aggravé par rapport aux simples pertes de fonction, indiquant une synergie fonctionnelle entre les deux gènes. Cette observation renforce l'idée qu'ils participent à une même voie de signalisation au niveau du muscle dans la stabilisation des tubules T ou en amont dans le compartiment pré synaptique.

Sur le plan morphologique, mes résultats s'accordent en grande partie avec ceux de Tsai et al. 2008 : la perte de *Fak* induit une croissance exacerbée du nombre de boutons synaptiques. Toutefois, contrairement à ce qui a été rapporté précédemment, je n'observe pas d'augmentation parallèle des ramifications terminales. Ce décalage pourrait provenir de différences de fond génétique ou de variabilités expérimentales. Dans nos lignées, la mutation utilisée *Fak*^{CG1} diffère de celle employée par Tsai et al., qui travaillaient sur un hétérozygote composé *Fak*^{K24/N30}. Il est donc possible que ces différences alléliques expliquent certaines divergences phénotypiques : dans notre cas, l'augmentation du nombre de boutons observée chez les mutants *Fak* pourrait traduire une densification locale des terminaisons synaptiques sans nécessairement impliquer une extension supplémentaire de l'arborisation.

Le sauvetage de la surcroissance des boutons dans le double mutant traduit en effet une épistasie d'*Amph* sur *Fak* : en l'absence de *Fak*, la signalisation d'adhésion ne serait plus correctement transduite, et la co-perte d'*Amph* interromprait alors la cascade de remodelage membranaire, rétablissant un équilibre morphologique apparent. Ce scénario serait cohérent avec l'idée que *Fak* agirait en amont comme capteur mécanique, tandis qu'*Amph* traduirait ce signal en remodelage membranaire et cytosquelettique.

Les phénotypes de surcroissance synaptique observés chez les mutants *Fak*, et leur normalisation dans le double mutant *Fak-Amph*, suggèrent une implication directe de la voie intégrines-Fak-ERK, connue pour réguler négativement la croissance de la JNM (Tsai et al 2008, 2012). Dans ce modèle, les intégrines assurent l'ancrage mécanique entre la membrane pré-synaptique et la matrice extracellulaire, activant *Fak* en réponse à la tension membranaire

et à l'adhésion. Fak déclenche alors une cascade ERK-dépendante qui restreint la croissance excessive des terminaisons. La perte de Fak abolit ce frein et conduit à une suractivation d'ERK, responsable d'une prolifération de boutons synaptiques, phénotype réprimé par l'inhibition d'ERK (Tsai et al 2008).

Dans notre modèle, l'abolition du gain de croissance dans le double KO Fak-Amph traduit une épistasie d'*Amph* sur *Fak*, indiquant qu'*Amph* agit en aval ou en parallèle de Fak pour permettre la traduction morphologique du signal ERK en remodelage effectif. Ce lien est cohérent avec le rôle d'*Amph* dans la dynamique membranaire et l'endocytose nécessaires à la stabilisation des complexes d'adhésion intégrine-Fak. En l'absence d'*Amph*, le programme "pro-croissance" déclenché par *Fak* KO ne se traduirait plus en ajout net de boutons, expliquant le rescue morphologique observé.

Ce modèle pourrait être renforcé par le fait qu'en *Drosophile*, Amph colocalise avec les intégrines β PS/ α PS le long des T-tubules et sur des inclusions membranaires lorsque le trafic est perturbé, suggérant une proximité fonctionnelle entre remodelage membranaire et adhésions (Ribeiro et al 2011). Par ailleurs, chez les mammifères, une étude a montré que BIN1 interagit directement avec les domaines cytoplasmiques de plusieurs sous-unités α d'intégrines (notamment α 3A), fournissant un précédent mécanistique solide (Wixler et al 1999). Par analogie, on peut envisager qu'un couplage Amph-intégrines existe également chez la *Drosophile*, même si une liaison directe reste à démontrer.

Inversement, la synergie observée sur le nombre de ramifications traduit un effet de désorganisation plus global, où la perte combinée des deux acteurs abolit les mécanismes de stabilisation terminale. Ce double comportement : épistasie pour les boutons, synergie pour les ramifications illustre bien la complexité de la coordination morphogénique : *Fak* et *Amph* agiraient sur des niveaux fonctionnels complémentaires, l'un contrôlant la signalisation d'adhésion et l'autre la plasticité membranaire locale.

De façon intéressante, cette synergie *Amph-Fak* pourrait aussi s'inscrire dans un réseau plus large où convergent les voies BMP (McCabe et al 2003) et Wnt/Wg (Packard et al 2002), toutes deux essentielles à la morphogenèse synaptique. Le signal BMP joue un rôle clé dans la morphogenèse de la JNM. Le ligand rétrograde Gbb, sécrété par le muscle, active au niveau présynaptique le complexe de récepteurs Wit et Tkv. Cette activation conduit à la phosphorylation du facteur de transcription Mad, dont la translocation nucléaire régule l'expression de gènes impliqués dans la croissance terminale des arborisations et le maintien de la transmission synaptique (Aberle et al 2002, McCabe et al 2003). En parallèle, Fak en modulant ERK, exerce une fonction de frein. Amph, de son côté, pourrait réguler la réinternalisation des récepteurs BMP, limitant la persistance du signal de croissance, et

coopérer avec les partenaires matriciels de la voie Wnt/Wg, tels que Perlecan (Kamimura et al 2013), pour organiser la géométrie des boutons.

Ainsi, *Amph* et *Fak* pourraient être deux composantes complémentaires d'un module mécano-signalétique, situé au carrefour des voies intégrine-ERK, BMP et Wnt, qui ajuste la croissance, la stabilisation et la performance synaptique. Par homologie, l'interaction BIN1-PTK2B mise en évidence dans les neurones de mammifères pourrait représenter l'équivalent fonctionnel de ce module, assurant la coordination entre remodelage membranaire, transduction Ca^{2+} /ERK et contrôle de la connectivité synaptique.

Cette désorganisation structurale ne se traduit toutefois pas par un gain fonctionnel mesurable au niveau de la transmission synaptique. Alors que l'on aurait pu s'attendre à une augmentation de l'amplitude des potentiels évoqués dans les mutants *Fak*, compte tenu du plus grand nombre de boutons et donc de sites de libération potentiels, aucune différence significative n'a été observée. Ce résultat diverge de l'étude de Tsai et al. (2008), qui rapportait une légère augmentation des EJP dans un contexte de surcroissance. Plusieurs interprétations sont possibles. D'une part, la variabilité génétique et expérimentale peuvent contribuer à ces écarts. D'autre part, il est également envisageable que le gain structural soit compensé par une baisse de la probabilité de libération par bouton, conduisant à une efficacité moyenne inchangée. Ce type de dissociation structure/fonction a été décrit dans plusieurs mutants à surcroissance de la JNM, notamment *highwire* (*hiw*) (Wan et al 2000), *nervous wreck* (*nwk*) (Coyle et al 2004) et *spinster* (*spin*) (Sweeney et al 2006), qui présentent un nombre accru de boutons mais une transmission affaiblie ou inchangée. Ces modèles ont conduit à proposer que la surcroissance traduit une réponse homéostatique : le neurone multiplie ses sites de contact pour maintenir un niveau de transmission stable, sans nécessairement augmenter la libération quantale.

Dans cette logique, la légère augmentation de la fréquence des potentiels spontanés observée dans mes mutants *Amph* et *Fak*, amplifiée dans le double, pourrait refléter une adaptation structurelle compensatoire : les altérations morphologiques du nombre de boutons et de ramifications pourraient accroître la probabilité globale d'événements spontanés, sans modifier le contenu quantal ni l'efficacité du couplage stimulus-réponse. Ce comportement, déjà observé dans des contextes de surcroissance (Koh et al 2007, Miller et al 2012), soutient l'idée que *Fak* et *Amph* ou d'autres acteurs interviennent pour stabiliser la transmission malgré des modifications morphologiques locales.

La résistance accrue à la fatigue synaptique observée dans certaines lignées *Fak* KO s'intègre également dans ce schéma. Elle pourrait traduire une amélioration du recyclage vésiculaire ou de la réserve mobilisable, peut-être en lien avec une activation secondaire de voies

endocytaires dépendantes de *Amph*. Le fait que ce phénotype soit corrigé dans le double mutant suggère que la perte d'*Amph* rétablirait un équilibre entre exocytose et endocytose, confirmant que ces deux partenaires participent à une même boucle régulatrice. Ainsi, la coexistence d'une surcroissance morphologique sans gain de transmission, associée à des tendances d'hyperactivité spontanée et de résistance accrue à la stimulation, renforce l'hypothèse que le couple *Fak*-*Amph* contrôle un équilibre entre croissance structurelle et efficacité fonctionnelle.

Enfin, les enregistrements d'électrorétinogrammes apportent une confirmation indépendante du rôle synaptique de ces deux protéines, bien que sans interaction fonctionnelle claire dans ce tissu. Les effets similaires observés dans les mutants *Fak* et *Amph* suggèrent que chacun contribue à la modulation de la transmission photoréceptrice, sans que leurs voies se croisent directement dans ce tissu. Ces données confirment toutefois la cohérence d'un rôle synaptique conservé.

Il convient toutefois de noter que les variabilités observées dans les expériences d'électrophysiologies entre nos lignées contrôles pourraient en partie refléter la présence d'un fond génétique épileptique dans l'une des souches de référence. J'ai délibérément ajouté cette lignée contrôle prédisposée à l'hyperexcitabilité afin de la comparer à une lignée contrôle non épileptique. Or, plusieurs études ont montré qu'une susceptibilité épileptique même modérée peut moduler les propriétés électrophysiologiques basales au niveau de la JNM (Pavlidis et al 1995), notamment la fréquence des potentiels spontanés (Marley et al 2011) et la réponse aux stimulations répétées (Choudhury et al 2016). Dans mes données, j'observe précisément des différences nettes entre les deux contrôles sur ces paramètres en accord avec la littérature sur l'impact d'une susceptibilité épileptique sur la physiologie de la JNM.

Compte tenu de l'enrichissement de *Fak* en présynaptique (Tsai et al 2008) et du fait qu'*Amph*, bien que majoritairement postsynaptique, présente un signal discret en présynaptique (Zelhof et al 2001), je propose que toute interaction physique *Amph*-*Fak* surviendrait de préférence en présynaptique. Cette lecture est cohérente avec nos phénotypes morphologiques et avec l'absence d'interaction fonctionnelle sur le marqueur postsynaptique (délocalisation de *Dlg*) dans le double KO. Des sauvetages par réexpression ciblée pré- vs postsynaptique seront toutefois nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Pris ensemble, ces éléments dressent le portrait d'un module présynaptique *Fak*-*Amph* qui assurerait la coordination entre croissance structurelle, stabilité synaptique et homéostasie fonctionnelle. La perte de *Fak* dérégulerait le signal d'adhésion et favorise la surcroissance ; la perte d'*Amph* empêche le relais membranaire de cette suractivation ; et leur perte combinée restaure un équilibre structurel mais perturbe la ramification et la coordination motrice.

Les résultats obtenus sur les neurones de mammifères prolongent de manière cohérente les observations réalisées chez la Drosophile et apportent un argument fort en faveur d'une conservation fonctionnelle de l'interaction *Amph-Fak* sous la forme du couple BIN1-Pyk2. Alors que la Drosophile m'avait permis de démontrer une interaction génétique et morphofonctionnelle entre *Amph* et *Fak* aux synapses, les modèles neuronaux de rat révèlent ici une interaction potentiellement physique entre BIN1 et Pyk2. L'un des points clés de ces travaux est la mise en évidence, par expériences de PLA d'une co-localisation spécifique de BIN1 et Pyk2 dans le réseau dendritique. Les signaux PLA apparaissent principalement le long des dendrites. Ce signal diminue fortement lorsque l'un ou l'autre des gènes est invalidé, ce qui atteste de la spécificité de l'interaction et suggère une dépendance réciproque entre les deux protéines pour leur recrutement ou leur stabilisation locale.

Ces observations s'intègrent parfaitement avec les résultats de la thèse de Lucy Martin de l'équipe d'Isabelle Landrieu (Université de Lille, 2025), qui a démontré, par approches biochimiques et biophysiques, que le domaine SH3 de BIN1 interagit directement avec deux motifs riches en proline situés dans le linker central (LK2) de Pyk2 situé entre le domaine kinase et FAT. Des expériences de GST pull-down utilisant BIN1 isoforme 1 et le GST-linker de Pyk2 ont confirmé la robustesse de cette interaction sur des protéines recombinantes de pleine longueur. Les mesures quantitatives de l'affinité par RMN, ITC et SPR réalisées dans ce travail ont montré que la constante de dissociation (Kd) de l'interaction BIN1-Pyk2 est du même ordre de grandeur que celle du complexe BIN1-Tau (Thèse Lucy Martin), estimée dans des études précédentes (Sottejeau et al 2015, Lasorsa et al 2018). Cette donnée est essentielle : elle signifie que l'interaction BIN1-Pyk2 n'est pas seulement détectable, mais biologiquement pertinente, suffisamment forte pour être compétitive dans le contexte intracellulaire et potentiellement régulée par l'état de phosphorylation ou la conformation locale des protéines. En parallèle, mes données de co-localisation en neurones primaires établissent que cette interaction a lieu dans des structures neuronales dendritiques et qu'elle dépend du maintien des deux partenaires. Ainsi, la co-localisation BIN1-Pyk2 observée par PLA n'est pas une simple corrélation spatiale : elle reflète une potentielle interaction directe *in situ*, cohérente en force et en nature avec celle démontrée *in vitro* par Lucy Martin. Ce parallèle entre les deux approches structurale et cellulaire renforce considérablement la validité du modèle et montre que la coopération BIN1-Pyk2 est une interaction conservée, à la fois physique et fonctionnelle. Ces résultats, qui mettent en évidence à la fois une interaction directe *in vitro* et une interaction fonctionnelle *in vivo* entre BIN1 et PTK2B, constituent la base d'un manuscrit en préparation, en collaboration avec Lucy Martin pour la partie biophysique.

L'impact fonctionnel de cette interaction se manifeste au niveau de l'architecture dendritique et de la densité synaptique. Dans les cultures de neurones de rat, l'invalidation de *BIN1*

entraîne une diminution du nombre de marqueurs présynaptiques (Synaptophysine) et postsynaptiques (Homer1), ainsi qu'une réduction du ratio de densité de marqueurs synaptiques rapporté au volume dendritique (MAP2). Ces observations suggèrent une altération globale de la distribution synaptique, cohérente avec un rôle structurant de BIN1 dans la stabilisation des zones de contact synaptique et cohérente avec les observations de notre étude sur BIN1 iso 1 (Lambert et al 2025, Annexe 1). Inversement, la double invalidation restaure ou même augmente certains de ces paramètres, indiquant une interaction fonctionnelle entre les deux gènes. L'augmentation conjointe du nombre de marqueurs postsynaptiques et du ratio de densité synaptique observée dans cette condition évoque un phénomène d'épistasie inversée : la perte simultanée de *BIN1* et de *PTK2B* compense certains effets de l'invalidation simple de *BIN1*. Cette observation rejoint la logique déjà mise en évidence à la JNM de Drosophile : lorsque les deux protéines d'un même module sont altérées, le système peut revenir à un équilibre morphologique apparent, suggérant un contrôle partagé de la croissance et de la stabilisation synaptique.

De plus, les western blots montrent une tendance à la baisse de BIN1 (ou de Pyk2) en l'absence de l'autre, ce qui pourrait être compatible avec une stabilisation/ancrage mutuel au sein du complexe. Ce comportement renforce l'idée que BIN1 et Pyk2 ne sont pas de simples partenaires de passage, mais qu'ils forment un complexe structurant, agissant sur la connectivité neuronale et la densité synaptique. Ces observations soutiennent donc une conservation évolutive du rôle structural et organisateur de l'axe Amph-Fak / BIN1-Pyk2 : dans les deux modèles, la perte d'un partenaire perturbe la morphologie et la densité synaptique, tandis que la perte conjointe conduit à un rééquilibrage, reflet d'une régulation conjointe au sein d'une même voie. Il s'agit là d'un argument fort pour l'existence d'un module synaptique conservé.

Ainsi, je propose que le couple BIN1-Pyk2 s'inscrirait dans un module d'adhésion sensible au Ca^{2+} : une élévation locale de Ca^{2+} active Pyk2, déclenchant le recrutement/amorçage de Src et l'engagement des voies kinases (Lev et al 1995), de sorte que le signal calcique soit converti en remaniements membranaires et cytosquelettiques localisés, en phase avec les fonctions de BIN1. Concrètement, BIN1 fournirait la plateforme spatiale : via son domaine BAR, il façonne la membrane (Peter et al 2004) et organise la machinerie d'actine avec N-WASP/Arp2/3 (Falcone et al 2014) et la dynamine (Grabs et al 1997) par exemple, positionnant au bon endroit les sites d'adhésion et d'endocytose (Prokic et al 2014). En parallèle, Pyk2 s'active en réponse au Ca^{2+} et propulse une cascade Src-dépendante qui phosphoryle des cibles structurales clés, assurant le couplage entre signalisation calcique et remodelage local (Lev et al 1995, Bartos et al 2010). Parmi celles-ci, les effecteurs RhoA et JNK orchestrent le remodelage du cytosquelette d'actine et la croissance des épines : RhoA contrôle la

contraction et la stabilisation des structures matures, tandis que JNK régule la plasticité et la consolidation des synapses (Lee et al 2019).

L'interaction directe entre BIN1 et Pyk2 pourrait donc faire le lien entre la mécanique membranaire et la signalisation calcique, coordonnant l'activité de ces deux bras de la voie pour maintenir l'équilibre entre développement et stabilisation des structures synaptiques. En conditions physiologiques, cette coopération assurerait une adaptation fine de la connectivité en fonction de l'activité neuronale. À l'inverse, une dérégulation du complexe avec la perte de l'échafaudage BIN1, l'hyperactivation de Pyk2 et déséquilibre des cascades RhoA/JNK pourrait désorganiser cet équilibre, favorisant des remaniements synaptiques aberrants observés dans la MA.

Également, le BDNF (ligand de TrkB) convertit l'activité en plasticité synaptique en augmentant la traduction/recrutement locaux de Pyk2 et l'incorporation GluN2B (Afonso et al 2019). Je fais également l'hypothèse que BIN1 pourrait fournir l'échafaudage qui positionne Pyk2 et module l'endocytose des récepteurs glutamatergiques, de sorte que le duo BIN1-Pyk2 canalise le signal BDNF-NMDA-Ca²⁺ vers une reconfiguration contrôlée des GTPases Rho et de l'architecture dendritique.

Un prolongement logique de l'axe BIN1-Pyk2 est son insertion dans des complexes multiprotéiques incluant Tau. D'un côté, BIN1 interagit directement avec Tau via son domaine SH3 reconnaissant les motifs PXXP du domaine riche en proline de Tau, une liaison dont la force dépend de l'état de phosphorylation de Tau (Sottejeau et al 2015, Lasorsa et al 2018). De l'autre, Pyk2 se lie à Tau et peut en phosphoryler des résidus tyrosine (par exemple Y18), modulant ainsi sa maturation post-traductionnelle et sa dynamique synaptique (Li et al 2018, Brody et al 2022). Pris ensemble, ces éléments suggèrent qu'une compétition/coordination peut s'exercer au niveau du site SH3 de BIN1 auquel Pyk2 et Tau peuvent tous deux se lier, tout en offrant un levier supplémentaire via l'activité kinase de Pyk2 sur Tau. De plus, les données de Lucy Martin indiquent que l'affinité BIN1-Pyk2 est du même ordre que celle de BIN1-Tau (Thèse Lucy Martin), ouvrant la possibilité que ces trois protéines puissent coexister dans un complexe à trois composantes, potentiellement modulé par le contexte cellulaire ou l'état de phosphorylation de Pyk2 et Tau. Un modèle cohérent est celui d'un dimère de BIN1, formé via son domaine BAR, qui présente deux domaines SH3 fonctionnels capables de recruter simultanément Pyk2 et Tau. Dans cette configuration, BIN1 agirait comme échafaudage bivalent : il stabiliserait l'association locale de Pyk2 et de Tau, favoriserait la phosphorylation tyrosine de Tau par Pyk2, et ajusterait la maturation post-traductionnelle de Tau en fonction du contexte calcique et synaptique. Ce jeu compétition/stabilisation constitue vraisemblablement un mécanisme central de la plasticité synaptique : en condition

physiologique, l'équilibre BIN1-PTK2B-Tau préserverait l'architecture et la connectivité. En contexte pathologique, sa rupture par hyperphosphorylation de Tau, hyperactivité/délocalisation de Pyk2 ou altérations liées à BIN1 pourrait favoriser la désorganisation synaptique et la vulnérabilité neuronale caractéristiques de la MA. Sur cette base, je propose ci-après plusieurs hypothèses quant à la place de l'interaction BIN1-PTK2B dans les différentes voies pathologiques de la MA.

Hypothèse sur le rôle de l'interaction BIN1-PTK2B dans le contexte pathologique

Les travaux de cette thèse ont révélé que *BIN1* et *PTK2B* interagissent fonctionnellement au sein des synapses, modulant ensemble la morphogenèse et la stabilité synaptique chez la Drosophile et le rat. Fort de cette interaction conservée, on peut envisager plusieurs mécanismes intégratifs expliquant comment cet axe pourrait contribuer aux lésions pathogéniques Tau et A β de la MA. Chaque hypothèse évoquée ci-dessous s'appuie sur des fonctions connues de BIN1 et de PTK2B présentées en introduction. Pour chacune, ces données sont mobilisées afin de soutenir des scénarios mécanistiques potentiellement plausibles liant l'interaction BIN1-PTK2B aux dysfonctionnements synaptiques et à la pathologie Tau/A β .

Activation aberrante de l'axe intégrine-PTK2B/Src et phosphorylation pathologique de Tau

Une première hypothèse postule que l'interaction BIN1-PTK2B pourrait participer à une cascade de signalisation dysfonctionnelle impliquant les intégrines, PTK2B et Src, menant à la phosphorylation anormale de Tau dans les neurones. Dans ce modèle, les oligomères d'A β joueraient un rôle déclencheur : il est établi que les oligomères d'A β peuvent se lier à certains récepteurs synaptiques comme prion PrP et intégrines par exemple et ainsi activer la kinase PTK2B (Hass et al 2016, Han et al 2013). Cette activation de Pyk2 s'accompagne du recrutement et de l'activation des kinases Src, en particulier Fyn, au sein du complexe synaptique (Salazar et al 2019). Or, Tau recrute Fyn aux dendrites, où Fyn module le complexe NMDAR-PSD95 et contribue à la synaptotoxicité induite par A β (Ittner et al 2010). De fait, Pyk2 en interaction avec Fyn apparaît comme un médiateur clé de la toxicité A β , reliant les effets d'A β à une hyperphosphorylation de Tau. Il a été démontré que la liaison des A β oligomères à PrP et aux récepteurs métabotropes mGluR5 provoque l'activation aberrante de Fyn/Pyk2, lesquels phosphorylent Tau et favorisent ainsi sa pathologie (Um et al 2013). Par ailleurs, l'activation excessive de Pyk2 par A β induit des voies en aval délétères, notamment RhoA–JNK, contribuant à la perte d'épines dendritiques et à l'apoptose neuronale (Lee et al 2019).

JNK est une kinase pro-inflammatoire capable de phosphoryler Tau sur plusieurs résidus (Noble et al 2013), suggérant qu'une boucle PTK2B-RhoA-JNK pourrait amplifier la tauopathie en situation de stress amyloïde.

Dans ce contexte, BIN1 pourrait moduler ce complexe à plusieurs niveaux. D'une part, BIN1 possède un domaine SH3 capable d'interagir avec des motifs proline-riches de partenaires synaptiques. Il a notamment été montré que BIN1 se lie à la protéine Tau via le domaine riche, interaction qui est abolie par la phosphorylation de Tau sur Thr231 (Sottejeau et al 2015). Ainsi, en condition pathologique, Tau se dissocie de BIN1, ce qui peut favoriser son agrégation et son accumulation anarchique dans les neurites (Sottejeau et al 2015). La perte d'interaction BIN1-Tau pourrait donc libérer Tau pour des interactions aberrantes avec Fyn/Sr, exacerbant la toxicité. D'autre part, BIN1 pourrait agir sur la signalisation Src via ses autres partenaires : un travail récent a identifié p140Cap, un inhibiteur endogène de Src, comme un nouvel interacteur de BIN1 (Blazier et al 2025). On peut émettre l'hypothèse qu'en se liant à p140Cap, BIN1 contribuerait à séquestrer cet inhibiteur de Src à des endroits spécifiques de la synapse, modulant ainsi finement l'activité de Src et de Fyn. Une diminution de BIN1 libérerait p140Cap ou perturberait sa localisation, ce qui pourrait *in fine* déréguler l'activité de Src/Fyn. Il en résulterait une suractivation de la voie Pyk2-Src, propice à la phosphorylation excessive de Tau et à la dysfonction synaptique. Cette idée est soutenue par des observations en culture neuronale : la déficience de BIN1 dans les neurones entraîne une accumulation de Tau phosphorylée au niveau des synapses, accompagnée d'une altération de la structure des épines et d'une augmentation de la neurotoxicité Tau-dépendante (Glennon et al 2020). De plus, BIN1 étant enrichi aux terminaisons présynaptiques excitatrices (de Rossi et al 2020), son absence pourrait affecter l'organisation des complexes d'adhésion focale et potentialiser les signaux de retrait synaptique initiés par Pyk2. En somme, la convergence de BIN1 et Pyk2 sur l'axe intégrine-Src pourrait constituer un nœud pathologique : en conditions normales, BIN1 contribuerait à limiter les dérapages de signalisation en interagissant avec Tau, Pyk2 et des régulateurs de Src, alors qu'en condition pathologique, la cascade aboutirait à la déstabilisation des synapses et à la propagation de la dysfonction tau aux circuits connectés, un mécanisme cohérent avec la progression synaptique observée des lésions tau dans la MA (de Calignon et al 2012).

Perturbation du trafic endosomal par BIN1-PTK2B

Une deuxième hypothèse, complémentaire, met l'accent sur le trafic membranaire endosomal au sein de la synapse, et comment l'axe *BIN1-PTK2B* pourrait en dérégler les composantes pour amplifier à la fois la production d'A β et la diffusion intercellulaire de Tau pathologique. Comme expliqué précédemment, BIN1 est un acteur clé de la dynamique endosomale via son

domaine BAR (Peter et al 2004). Plusieurs études suggèrent un rôle direct de BIN1 dans le métabolisme de l'APP et de la sécrétase β (BACE1). En particulier, BIN1 peut lier BACE1 et influencer son itinéraire intracellulaire : l'inactivation de BIN1 provoque une accumulation de BACE1 dans les endosomes et réduit sa dégradation lysosomale, ce qui aboutit à une surproduction d'A β dans les neurones (Miyagawa et al 2016). Ainsi, un défaut de BIN1 oriente le clivage de l'APP vers la voie amyloïdogène. Par ailleurs, BIN1 est exprimé dans la microglie où il pourrait aussi moduler la clairance d'A β , bien que ce volet immunitaire dépasse le cadre synaptique.

Le rôle de Pyk2 dans le trafic endosomal commence également à être exploré. En conditions basales, Pyk2 est souvent associé aux complexes d'adhésion via la protéine paxilline, mais des données suggèrent qu'il peut interagir avec l'appareil endocytaire. Notamment, Pyk2 a été impliqué dans la régulation de l'endocytose de l'APP : il a été reporté que Pyk2 peut servir de plate-forme d'arrimage pour APP, BACE1 et le récepteur LRP, facilitant ainsi leur internalisation conjointe (de Pins et al 2021). L'inhibition de *PTK2B* ou la perturbation de son interaction avec paxilline ralentirait l'endocytose d'APP, réduisant la production d'A β 42 (de Pins et al 2021). Cela suggère qu'une activité excessive de Pyk2 pourrait accélérer l'endocytose d'APP et amplifier la génération de peptides A β . En accord avec cette idée, on observe dans un modèle murin APP/PS1 que Pyk2 est anormalement activé avec l'âge (Kaufman et al 2015) et qu'éliminer Pyk2 chez ces souris transgéniques atténue significativement la charge amyloïde, les pertes synaptiques et les troubles mnésiques (Salazar et al 2019). Pyk2 pourrait donc contribuer à une boucle pathogène où A β induit Pyk2, qui en retour favorise la production de nouvel A β , bouclant un cercle vicieux amyloïde.

L'interaction fonctionnelle entre *BIN1* et *PTK2B* prendrait alors tout son sens dans ce contexte endosomal. Leurs effets combinés pourraient se renforcer mutuellement voir même se réguler à travers leur interaction (activation, régulation post traductionnelle, réarrangement au niveau spatial). A la synapse, BIN1 intervient dans le recyclage des vésicules synaptiques et des récepteurs, ce qui pourrait inclure le recyclage des récepteurs d'adhésion ou de neurotransmetteurs affectés par A β . Par exemple, une endocytose synaptique exacerbée sous l'influence conjointe de Pyk2 et d'une altération de BIN1 pourrait à la fois affaiblir la transmission synaptique normale et augmenter l'agrégation d'A β dans les compartiments endosomaux.

Un autre aspect majeur du trafic membranaire en lien avec la pathologie est la propagation inter-neuronale de Tau agrégée. Les données récentes indiquent que Tau pathologique peut se propager de neurone en neurone via des vésicules ou exosomes, selon un mécanisme prion-like (Asai et al 2015). BIN1, par son rôle dans l'endocytose, est directement impliqué

dans ce phénomène (Zhang X et al 2024). Une étude a montré que BIN1 est clivé par la protéase lysosomale legumain dans les neurones de la MA, générant un fragment N-terminal (BIN1 1-277) détecté dans les cerveaux de patients et de souris Tau P301S. Ce fragment, dépourvu du domaine SH3, qui interagit avec Tau et accélère son agrégation, tout en stimulant fortement l'endocytose clathrine (Zhang X et al 2024). Ces résultats positionnent BIN1 comme un facilitateur de la propagation trans-synaptique de Tau, via son effet sur l'endocytose. Or, Pyk2 pourrait aussi moduler la susceptibilité d'une cellule à internaliser des agrégats de Tau. On sait que l'activation de Pyk2 entraîne celle de RhoA et des réorganisations du cytosquelette d'actine (Lee et al 2019), ces changements de morphologie membranaire pourraient influencer l'efficacité de capture des oligomères de Tau extracellulaires par endocytose. De plus, Pyk2 peut phosphoryler diverses protéines adaptatrices ou clathrines, bien que cela reste à documenter précisément dans le contexte de Tau. Il est également envisageable que PTK2B, en perturbant l'équilibre de certaines GTPases affecte le trafic endolysosomal global et l'élimination des protéines agrégées.

En somme, cette hypothèse propose que BIN1 et PTK2B convergent sur la voie endosomale pour exacerber les processus amyloïdogènes et tauopathiques. BIN1 déficient rend le neurone plus apte à produire et libérer de l'A β , et moins capable de dégrader Tau, tandis que Pyk2 hyperactif renforce l'endocytose pathologique d'APP et la recapture de Tau agrégé.

Dérégulation calcique et plasticité synaptique altérée via BIN1–PTK2B

Une troisième hypothèse intègre la signalisation calcique et la plasticité synaptique dans le rôle pathogénique du duo BIN1-PTK2B. Les deux sont exprimés dans les neurones glutamatergiques excitateurs et contribuent au maintien d'une activité synaptique normale (de Rossi et al 2020, Salazar et al 2019). Un déséquilibre de leur fonction et de leur interaction pourrait conduire à une hyperexcitabilité neuronale délétère, situation fréquemment observée aux stades précliniques de la MA (Bakker et al 2012).

BIN1 régule l'homéostasie calcique neuronale en interagissant avec les canaux calciques. Des travaux récents sur des neurones humains dérivés de cellules souches ont démontré que l'absence de BIN1 provoque une augmentation de l'expression de la sous-unité Cav1.2 (canal L), un défaut d'internalisation de ce canal après l'activité électrique, et *in fine* une élévation de l'influx de Ca $^{2+}$ dans les neurones (Saha et al 2024). Il en résulte une activité électrique exacerbée et des altérations d'expression génique liées à la plasticité synaptique (Saha et al 2024). Fait intéressant, les profils d'expression génique perturbés par *BIN1* KO dans ces neurones se retrouvent de façon concordante dans les neurones pyramidaux du cortex de patients MA à un stade avancé. Cela suggère qu'une baisse de BIN1 dans le cerveau

Alzheimer pourrait contribuer aux dysfonctions de réseau via un excès de signalisation calcique. Sur le plan de la pathologie Tau, l'excès de calcium intracellulaire peut entraîner une phosphorylation anormale de Tau en perturbant des kinases et accélérer sa diffusion (Pooler et al 2013, Wu et al 2016).

Parallèlement, nous savons que Pyk2 est un acteur central de la plasticité synaptique dépendante du Ca²⁺. Pyk2 est activée par les élévations de calcium dans les neurones (de Pins et al 2021). Lors de la stimulation des récepteurs NMDA par Ca²⁺ ou suite à l'action du BDNF sur son récepteur TrkB, Pyk2 est rapidement synthétisé localement et activé, ce qui a pour effet de promouvoir l'incorporation de récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B dans les synapses. Ainsi, Pyk2 renforce certains courants synaptiques et participe à l'induction de la LTP (Alfonso et al 2019). Dans la MA, l'hyperactivité synaptique induite par A β peut entraîner une suractivation de Pyk2, dérégulant la plasticité. Comme expliqué précédemment, les oligomères d'A β perturbent la signalisation glutamatergique en modifiant l'action de PTK2B qui reste anormalement active via l'action de Fyn (Hass et al 2016, Salazar et al 2019). Une telle perturbation contribue à un renversement de la plasticité synaptique avec un passage d'un mode LTP à un mode dépressif ou d'excitotoxicité.

Dès lors, on peut imaginer que BIN1, via son contrôle des canaux calciques et possiblement de la distribution des récepteurs, définit un seuil d'excitabilité au-delà duquel la signalisation Pyk2 bascule vers des effets délétères. Si BIN1 est insuffisant, la synapse subit des flux calciques excessifs qui provoquent une activation soutenue de Pyk2. Celle-ci va recruter Fyn et phosphoryler des substrats critiques, induisant un remodelage pathologique de la synapse. Les conséquences combinées incluent : un renforcement aberrant de certaines synapses hyperactives mais dysfonctionnelles, un épuisement d'autres synapses par dépression ou perte structurelle et une facilitation de la libération de facteurs neurotoxiques. En effet, une activité synaptique intense stimule la libération d'A β au niveau des terminaisons synaptiques en augmentant le clivage de l'APP (Kamenetz et al 2033). L'axe *BIN1-PTK2B* dérégulé pourrait donc créer un terrain favorable à un cercle vicieux d'hyperexcitabilité : l'activité excessive augmente A β , qui en retour accentue l'activation de Pyk2 et Fyn alimentant encore la boucle. Des études génétiques soutiennent aussi un lien entre calcium et MA via *BIN1* et *PTK2B* : par exemple, un variant de *PTK2B* associé à un risque accru de MA augmente l'expression de Pyk2 dans les monocytes, ce qui pourrait refléter une suractivation chronique de cette voie de signalisation (Harwood et al 2021). De même, la diminution de BIN1 observée dans les cerveaux de patients pourrait potentiellement contribuer aux anomalies de rythmes neuronaux décrites dans la MA précoce.

En conclusion, ces hypothèses mécanistiques bien que distinctes par les voies mises en jeu ne s'excluent pas mais dressent un tableau cohérent de l'impact de l'interaction *BIN1-PTK2B* en contexte pathologique. Elles convergent vers l'idée que la synapse est un point centrale où les dysfonctions des facteurs de risque génétique de la MA peuvent se combiner pour déclencher ou aggraver les cascades Tau et A β . Qu'il s'agisse de phosphorylation aberrante de Tau, de surcharge amyloïde par endocytose ou de perturbation calcique synaptique, l'axe *BIN1-PTK2B* pourrait être un modulateur central de la vulnérabilité neuronale.

Perspectives

Les résultats obtenus au cours de ce projet ouvrent plusieurs pistes expérimentales pour consolider et approfondir nos conclusions. En premier lieu, le modèle de Drosophile reste un terrain puissant pour tester de manière causale les voies identifiées. Les phénotypes de boutons synaptiques, ramifications, de locomotion, ainsi que les altérations électrophysiologiques, pourraient être affinés par des approches de sauvetage génétique. En effet il serait possible de surexprimer Amph ou Fak dans nos lignées KO simples et doubles spécifiquement en pré-synaptique avec un promoteur NSyb ou Elav par exemple ou bien en post-synaptique avec un promoteur Mhc. Cela permettrait ainsi d'accéder à d'éventuel effet de sauvetage et d'évaluer la spécificité de notre interaction sur les phénotypes observés ainsi que la localisation de l'interaction au niveau des compartiments synaptiques. Il serait également possible de réexprimer les versions tronquées des protéines Amph ou Fak. Une évaluation de sauvetage de nos phénotypes en comparant la surexpression des formes WT de Amph et Fak avec une construction Amph Δ SH3 et Fak mutées aux sites riche en proline permettrait de confirmer l'implication des domaines clé identifié *in vitro* et dans la littérature dans un contexte fonctionnel *in vivo*.

De plus, cibler en amont ou en aval les voies candidates mises en évidence dans la discussion par exemple la cascade intégrine-Fak-ERK, la signalisation BMP rétrograde ou encore la voie Wnt/Wg permettrait de valider leur contribution aux phénotypes observés. L'utilisation d'outils génétiques chez la Drosophile comme les RNAi dirigés, les mutants hypomorphes de récepteurs BMP, la manipulation des intégrines ou de taline/kindlin offrirait un moyen direct de tester si ces cascades expliquent l'épistasie ou la synergie Amph-Fak mise en évidence dans nos résultats. Enfin, l'imagerie super-résolution ou la technique PLA appliquée aux jonctions neuromusculaires pourrait permettre de visualiser *in vivo* la co-localisation ou la ségrégation spatiale des complexes Amph-Fak avec les marqueurs de voies spécifiques.

Dans les cultures de neurones de rat, plusieurs approches pourraient prolonger nos observations. La mise en place de la technique de PLA BIN1-PTK2B, couplée à un co-marquage des acteurs synaptiques évoqués dans la discussion, permettrait de tester leur implication dans les voies pressenties et de déterminer si le complexe BIN1-PTK2B co-localise avec ces partenaires au sein des compartiments synaptiques. Des manipulations, telles que l'activation pharmacologique des récepteurs NMDA ou l'inhibition de la voie Src/FAK, permettraient de tester directement le lien entre BIN1-PTK2B et la signalisation Ca^{2+} -dépendante. Les modèles cellulaires pourraient également bénéficier des stratégies de sauvetage utilisant les formes sauvages ou mutées de BIN1 et PTK2B, mises en œuvre sur puce microfluidique afin d'évaluer la localisation synaptique précise de l'interaction. L'électrophysiologie en micro-électrodes multipôles (MEA) permettraient de mesurer l'activité de réseau (décharges, rafales, synchronie) et d'estimer la balance excitation/inhibition à l'échelle populationnelle. De plus, la plateforme peut être couplée à un dispositif microfluidique pour discriminer les effets des compartiments synaptiques.

Dans une perspective visant à se rapprocher davantage du modèle humain, les modèles dérivés d'iPSC humaines constituent un prolongement naturel. Des lignées BIN1 KO et PTK2B KO, déjà développées et utilisées au laboratoire, pourraient être utilisées pour valider les mécanismes identifiés chez la Drosophile et le rat dans un contexte humain. L'édition CRISPR/Cas9 offrirait la possibilité d'introduire les variants communs non codants à effet régulateur identifiés par GWAS pour BIN1 et PTK2B, et ainsi de comparer directement leurs conséquences fonctionnelles avec celles des KO complets. Ces modèles seraient particulièrement adaptés à l'application de technologies omiques telles que le single-cell RNAseq ou la protéomique, afin d'établir des signatures moléculaires précises des altérations induites. L'ajout d'astrocytes dans les co-cultures, ou l'utilisation d'organoïdes cérébraux, permettrait par ailleurs de mieux reproduire la complexité du microenvironnement synaptique.

Afin d'éprouver mes hypothèses sur le rôle de l'interaction BIN1-PTK2B dans des contextes pathologiques, je propose de répliquer nos lectures morpho-fonctionnelles en présence d'A β ou de Tau. Le modèle Drosophile s'y prête particulièrement bien. En effet, l'expression neuronale de Tau humain dans la JNM induit des défauts présynaptiques et altère la libération vésiculaire (Zhou et al 2017), tandis que la co-expression APP+BACE ou A β 40/42 réduisent la connectivité et la performance locomotrice (Mhatre et al 2014). Introduire ces contextes dans nos fonds génétiques simples et doubles permettrait d'évaluer si l'axe BIN1-PTK2B protège la JNM ou, au contraire, en amplifie la vulnérabilité. En parallèle, des cultures neuronales en microfluidique compartimentés permettraient l'exposition chronique des compartiments pré ou post à des oligomères d'A β ou de Tau et ainsi quantifier la densité

synaptique (Syn/Homer) ou d'autres phénotypes intéressants en combinant invalidations et réexpressions ciblées de BIN1 et de PTK2B. Dans ces systèmes, il serait possible de quantifier la phosphorylation de Tau sur des épitopes liés à la pathologie (AT8, PHF1, Thr231, etc.), l'état d'activation des kinases impliquées dans ces modifications (par ex. GSK3 β , CDK5, ERK/Src, p38), et les niveaux d'A β dans les surnageants par ELISA par exemple. L'ensemble de ces approches pourrait fournir un test décisif de l'hypothèse selon laquelle BIN1-PTK2B constitue un nœud synaptique capable soit d'amortir, soit de relayer la synaptotoxicité amyloïde et tauopathiques.

Au-delà de la recherche fondamentale, l'étude de l'axe BIN1-PTK2B ouvre également des perspectives translationnelles. L'identification de cette interaction comme point nodal reliant remodelage membranaire, signalisation Ca²⁺ et plasticité synaptique suggère qu'elle pourrait constituer une cible thérapeutique. D'un côté, des approches pharmacologiques visant à moduler l'activité de PTK2B ou ses partenaires en aval par exemple via des inhibiteurs de Src/FAK ou des régulateurs des GTPases Rho pourraient restaurer une plasticité synaptique altérée. De l'autre, la compréhension fine du rôle isoforme-dépendant de BIN1 pourrait orienter le développement de stratégies visant à corriger sélectivement les variations d'expression et la toxicité de l'isoforme 1 de BIN1 tout en préservant ses fonctions physiologiques. Par ailleurs, les altérations transcriptionnelles ou protéomiques détectées dans des modèles iPSC ou murins pourraient être exploitées comme biomarqueurs précoces de la vulnérabilité synaptique, détectables dans des échantillons biologiques du LCR ou du plasma. Enfin, les données de ce travail soutiennent l'idée que la MA découle d'une convergence de voies synaptiques. Dans cette optique, cibler simultanément des nœuds moléculaires tels que BIN1 et Pyk2 pourrait s'avérer plus pertinent que des approches mono-cible, en particulier lorsque l'objectif dépasse les modèles de MA monogénique pour viser la forme multifactorielle.

En somme, la poursuite de ce travail devrait combiner l'approche génétique fine offerte par la Drosophile, la résolution cellulaire et fonctionnelle des cultures neuronales, et la pertinence physiopathologique des modèles iPSC et murins. L'intégration de ces niveaux d'analyse constitue la stratégie la plus prometteuse pour établir de manière causale le rôle de l'interaction BIN1-PTK2B dans la vulnérabilité synaptique qui caractérise la maladie d'Alzheimer.

Conclusion

Ce travail de thèse apporte un éclairage nouveau sur les rôles synaptiques de BIN1 et PTK2B, en combinant les forces de deux modèles expérimentaux complémentaires. J'ai mis en

évidence que BIN1 et PTK2B entretiennent une interaction fonctionnelle conservée dans l'évolution, cruciale pour le bon fonctionnement des synapses. D'un point de vue fondamental, mes résultats montrent que ces deux protéines agissent en synergie pour maintenir l'architecture des synapses (de la JNM des Drosophiles aux neurones de rats) et pour assurer le renouvellement efficace des composantes synaptiques nécessaires à la transmission et à la plasticité.

Sur le plan appliqué et pathologique, ces travaux renforcent l'idée que la synapse est un lieu de convergence de différentes lésions dans la MA, et que BIN1 et PTK2B y jouent un rôle central. Le concept de vulnérabilité synaptique de la MA s'enrichit ici : un défaut subtil de trafic membranaire et un déséquilibre de la signalisation tyrosine-kinase pourraient ensemble rendre les synapses moins aptes à résister à l'accumulation du peptide A β , de la protéine Tau et aux stress excitateurs. Mes résultats suggèrent que la diminution d'expression de *BIN1* et *PTK2B* associées à la MA agirait en perturbant ces fonctions synaptiques, ce qui, sur le long terme, contribuerait à la perte densité/connectivité synaptique caractéristique de la maladie. En ce sens, BIN1 et PTK2B émergent comme des cibles d'intérêt pour renforcer la résilience synaptique : moduler leur activité pourrait atténuer les défauts de plasticité et de trafic synaptique précoces dans la MA, retardant ainsi l'apparition du déclin cognitif.

Enfin, ce travail illustre l'intérêt des approches combinées inter-espèces en neuroscience. La complémentarité entre la génétique de la Drosophile et les modèles de neurones de mammifères renforce la robustesse des observations et suggère des convergences fonctionnelles, compatibles avec une conservation au moins partielle au cours de l'évolution. Elle nous a également donné l'opportunité d'en explorer les multiples facettes morphologiques, électrophysiologiques et biochimiques et de formuler des hypothèses mécanistiques directement testables. À l'avenir, l'utilisation d'autres modèles comme des cultures neuronales ou même des organoïdes cérébraux dérivés de patients en parallèle de ces approches pourraient encore approfondir la compréhension des rôles de *BIN1* et *PTK2B* dans un cerveau vieillissant. En conclusion, ce travail apporte une pierre significative à l'édifice de la neurobiologie synaptique en identifiant un duo moléculaire BIN1-PTK2B comme pivot de la stabilité synaptique, et en posant les bases pour de nouvelles stratégies visant à protéger les synapses, ces structures essentielles mais fragiles, dans les maladies neurodégénératives.

Bibliographie

Aberle H, Haghighi AP, Fetter RD, McCabe BD, Magalhães TR, Goodman CS. wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron*. 2002 Feb 14;33(4):545-58. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00589-5. PMID: 11856529.

Afonso P, De Luca P, Carvalho RS, Cortes L, Pinheiro P, Oliveiros B, Almeida RD, Mele M, Duarte CB. BDNF increases synaptic NMDA receptor abundance by enhancing the local translation of Pyk2 in cultured hippocampal neurons. *Sci Signal*. 2019 Jun 18;12(586):eaav3577. doi: 10.1126/scisignal.aav3577. PMID: 31213568.

Ajenikoko MK, Ajagbe AO, Onigbinde OA, Okesina AA, Tijani AA. Review of Alzheimer's disease drugs and their relationship with neuron-glia interaction. *IBRO Neurosci Rep*. 2022 Nov 19;14:64-76. doi: 10.1016/j.ibneur.2022.11.005. PMID: 36593897; PMCID: PMC9803919.

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G, Wyss-Coray T. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000 May-Jun;21(3):383-421. doi: 10.1016/s0197-4580(00)00124-x. PMID: 10858586; PMCID: PMC3887148.

Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*. 1995;8(6):429-31. doi: 10.1002/ca.980080612. PMID: 8713166.

Andrew RJ, De Rossi P, Nguyen P, Kowalski HR, Recupero AJ, Guerbet T, Krause SV, Rice RC, Laury-Kleintop L, Wagner SL, Thinakaran G. Reduction of the expression of the late-onset Alzheimer's disease (AD) risk-factor *BIN1* does not affect amyloid pathology in an AD mouse model. *J Biol Chem*. 2019 Mar 22;294(12):4477-4487. doi: 10.1074/jbc.RA118.006379. Epub 2019 Jan 28. PMID: 30692199; PMCID: PMC6433054.

Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2023.

Alzheimer's Society UK (<https://www.alzheimers.org.uk/about-dementia/types-dementia/alzheimers-disease>).

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*. 1992 Mar;42(3 Pt 1):631-9. doi: 10.1212/wnl.42.3.631. PMID: 1549228.

Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, Wolozin B, Butovsky O, Kügler S, Ikezu T. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci*. 2015 Nov;18(11):1584-93. doi: 10.1038/nn.4132. Epub 2015 Oct 5. PMID: 26436904; PMCID: PMC4694577.

Bai Y, Suzuki T. Activity-Dependent Synaptic Plasticity in *Drosophila melanogaster*. *Front Physiol*. 2020 Feb 25;11:161. doi: 10.3389/fphys.2020.00161. PMID: 32158405; PMCID: PMC7052306.

Bakker A, Krauss GL, Albert MS, Speck CL, Jones LR, Stark CE, Yassa MA, Bassett SS, Shelton AL, Gallagher M. Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment. *Neuron*. 2012 May 10;74(3):467-74. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.023. PMID: 22578498; PMCID: PMC3351697.

Barata MA, Perdigão C, Ramalho J, Gomes ER, Guimas Almeida C. Alzheimer's genetic risk factor Bin1 controls synapse vesicle exo-endocytosis in inhibitory synapses. *Cell Rep.* 2025 Aug 26;44(8):116005. doi: 10.1016/j.celrep.2025.116005. Epub 2025 Jul 15. PMID: 40674214; PMCID: PMC12381520.

Bartos JA, Ulrich JD, Li H, Beazely MA, Chen Y, Macdonald JF, Hell JW. Postsynaptic clustering and activation of Pyk2 by PSD-95. *J Neurosci.* 2010 Jan 13;30(2):449-63. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4992-08.2010. PMID: 20071509; PMCID: PMC2822408.

Basheer N, Buee L, Brion JP, Smolek T, Mohammadi MK, Hritz J, Hromadka T, Dewachter I, Wegmann S, Landrieu I, Novak P, Mudher A, Zilka N. Shaping the future of preclinical development of successful disease-modifying drugs against Alzheimer's disease: a systematic review of tau propagation models. *Acta Neuropathol Commun.* 2024 Apr 4;12(1):52. doi: 10.1186/s40478-024-01748-5. PMID: 38576010; PMCID: PMC10993623.

Beam CR, Kaneshiro C, Jang JY, Reynolds CA, Pedersen NL, Gatz M. Differences Between Women and Men in Incidence Rates of Dementia and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 2018;64(4):1077-1083. doi: 10.3233/JAD-180141. PMID: 30010124; PMCID: PMC6226313.

Behl C. In 2024, the *amyloid-cascade-hypothesis* still remains a working hypothesis, no less but certainly no more. *Front Aging Neurosci.* 2024 Sep 4;16:1459224. doi: 10.3389/fnagi.2024.1459224. PMID: 39295642; PMCID: PMC11408168.

Bellen HJ, Tong C, Tsuda H. 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. *Nat Rev Neurosci.* 2010 Jul;11(7):514-22. doi: 10.1038/nrn2839. PMID: 20383202; PMCID: PMC4022039.

Bellenguez C, Küçükali F, Jansen IE, Kleindam L, Moreno-Grau S, Amin N, Naj AC, Campos-Martin R, Grenier-Boley B, Andrade V, Holmans PA, Boland A, Damotte V, van der Lee SJ, Costa MR, Kuulasmaa T, Yang Q, de Rojas I, Bis JC, Yaqub A, Prokic I, Chapuis J, Ahmad S, Giedraitis V, Aarsland D, Garcia-Gonzalez P, Abdelnour C, Alarcón-Martín E, Alcolea D, Alegret M, Alvarez I, Álvarez V, Armstrong NJ, Tsolaki A, Antúnez C, Appollonio I, Arcaro M, Archetti S, Pastor AA, Arosio B, Athanasiu L, Bailly H, Banaj N, Baquero M, Barral S, Beiser A, Pastor AB, Below JE, Benček P, Benussi L, Berr C, Besse C, Bessi V, Binetti G, Bizarro A, Blesa R, Boada M, Boerwinkle E, Borroni B, Boschi S, Bossù P, Bråthen G, Bressler J, Bresner C, Brodaty H, Brookes KJ, Brusco LI, Buiza-Rueda D, Bürger K, Burholt V, Bush WS, Calero M, Cantwell LB, Chene G, Chung J, Cuccaro ML, Carracedo Á, Cecchetti R, Cervera-Carles L, Charbonnier C, Chen HH, Chillotti C, Ciccone S, Claassen JAHR, Clark C, Conti E, Corma-Gómez A, Costantini E, Custodero C, Daian D, Dalmaso MC, Daniele A, Dardiotis E, Dartigues JF, de Deyn PP, de Paiva Lopes K, de Witte LD, Debette S, Deckert J, Del Ser T, Denning N, DeStefano A, Dichgans M, Diehl-Schmid J, Diez-Fairen M, Rossi PD, Djurovic S, Duron E, Düzel E, Dufouil C, Eiriksdottir G, Engelborghs S, Escott-Price V, Espinosa A, Ewers M, Faber KM, Fabrizio T, Nielsen SF, Fardo DW, Farotti L, Fenoglio C, Fernández-Fuertes M, Ferrari R, Ferreira CB, Ferri E, Fin B, Fischer P, Fladby T, Fließbach K, Fongang B, Fornage M, Fortea J, Foroud TM, Fostinelli S, Fox NC, Franco-Macías E, Bullido MJ, Frank-García A, Froelich L, Fulton-Howard B, Galimberti D, García-Alberca JM, García-González P, Garcia-Madrone S, Garcia-Ribas G, Ghidoni R, Giegling I, Giorgio G, Goate AM, Goldhardt O, Gomez-Fonseca D, González-Pérez A, Graff C, Grande G, Green E, Grimmer T, Grünblatt E, Grunin M, Gudnason V, Guetta-Baranes T, Haapasalo A, Hadjigeorgiou G, Haines JL, Hamilton-Nelson KL, Hampel H, Hanon O, Hardy J, Hartmann AM, Hausner L, Harwood J, Heilmann-Heimbach S, Helisalmi S, Heneka MT, Hernández I, Herrmann MJ, Hoffmann P, Holmes C, Holstege H, Vilas RH, Hulsman M, Humphrey J, Biessels GJ, Jian X, Johansson C, Jun GR, Kastumata Y, Kauwe J, Kehoe PG, Kilander L, Ståhlbom AK, Kivipelto M, Koivisto A, Kornhuber

J, Kosmidis MH, Kukull WA, Kuksa PP, Kunkle BW, Kuzma AB, Lage C, Laukka EJ, Launer L, Lauria A, Lee CY, Lehtisalo J, Lerch O, Lleó A, Longstreth W Jr, Lopez O, de Munain AL, Love S, Löwemark M, Luckcuck L, Lunetta KL, Ma Y, Macías J, MacLeod CA, Maier W, Mangialasche F, Spallazzi M, Marquié M, Marshall R, Martin ER, Montes AM, Rodríguez CM, Masullo C, Mayeux R, Mead S, Mecocci P, Medina M, Meggy A, Mehrabian S, Mendoza S, Menéndez-González M, Mir P, Moebus S, Mol M, Molina-Porcel L, Montreal L, Morelli L, Moreno F, Morgan K, Mosley T, Nöthen MM, Muchnik C, Mukherjee S, Nacmias B, Ngandu T, Nicolas G, Nordestgaard BG, Olaso R, Orellana A, Orsini M, Ortega G, Padovani A, Paolo C, Papenberg G, Parnetti L, Pasquier F, Pastor P, Peloso G, Pérez-Cordón A, Pérez-Tur J, Pericard P, Peters O, Pijnenburg YAL, Pineda JA, Piñol-Ripoll G, Pisanu C, Polak T, Popp J, Posthuma D, Priller J, Puerta R, Quenez O, Quintela I, Thomassen JQ, Rábano A, Rainero I, Rajabli F, Ramakers I, Real LM, Reinders MJT, Reitz C, Reyes-Dumeyer D, Ridge P, Riedel-Heller S, Riederer P, Roberto N, Rodriguez-Rodriguez E, Rongve A, Allende IR, Rosende-Roca M, Royo JL, Rubino E, Rujescu D, Sáez ME, Sakka P, Saltvedt I, Sanabria Á, Sánchez-Arjona MB, Sanchez-Garcia F, Juan PS, Sánchez-Valle R, Sando SB, Sarnowski C, Satizabal CL, Scamosci M, Scarmeas N, Scarpini E, Scheltens P, Scherbaum N, Scherer M, Schmid M, Schneider A, Schott JM, Selbæk G, Seripa D, Serrano M, Sha J, Shadrin AA, Skrobot O, Slifer S, Snijders GJL, Soininen H, Solfrizzi V, Solomon A, Song Y, Sorbi S, Sotolongo-Grau O, Spalletta G, Spottke A, Squassina A, Stordal E, Tartan JP, Tárraga L, Tesí N, Thalamuthu A, Thomas T, Tosto G, Traykov L, Tremolizzo L, Tybjærg-Hansen A, Uitterlinden A, Ullgren A, Ulstein I, Valero S, Valladares O, Broeckhoven CV, Vance J, Vardarajan BN, van der Lugt A, Dongen JV, van Rooij J, van Swieten J, Vandenberghe R, Verhey F, Vidal JS, Vogelgsang J, Vyhnalek M, Wagner M, Wallon D, Wang LS, Wang R, Weinhold L, Wiltfang J, Windle G, Woods B, Yannakouli M, Zare H, Zhao Y, Zhang X, Zhu C, Zulaica M; EADB; GR@ACE; DEGESCO; EADI; GERAD; Demgene; FinnGen; ADGC; CHARGE; Farrer LA, Psaty BM, Ghanbari M, Raj T, Sachdev P, Mather K, Jessen F, Ikram MA, de Mendonça A, Hort J, Tsolaki M, Pericak-Vance MA, Amouyel P, Williams J, Frikke-Schmidt R, Clarimon J, Deleuze JF, Rossi G, Seshadri S, Andreassen OA, Ingelsson M, Hiltunen M, Sleegers K, Schellenberg GD, van Duijn CM, Sims R, van der Flier WM, Ruiz A, Ramirez A, Lambert JC. New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nat Genet.* 2022 Apr;54(4):412-436. doi: 10.1038/s41588-022-01024-z. Epub 2022 Apr 4. PMID: 35379992; PMCID: PMC9005347.

Benzer S. BEHAVIORAL MUTANTS OF *Drosophila* ISOLATED BY COUNTERCURRENT DISTRIBUTION. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1967 Sep;58(3):1112-9. doi: 10.1073/pnas.58.3.1112. PMID: 16578662; PMCID: PMC335755.

Blaukat A, Ivankovic-Dikic I, Grönroos E, Dolfi F, Tokiwa G, Vuori K, Dikic I. Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem.* 1999 May 21;274(21):14893-901. doi: 10.1074/jbc.274.21.14893. PMID: 10329689.

Blazier DM, Lewandowski EM, Ram N, Zhang X, Wang S, Patel O, Collier L, Defilippi P, Chen Y, Thinakaran G. A biophysical and molecular characterization of the interaction between the Alzheimer risk factor BIN1 and the neuronal scaffold protein p140Cap. *J Biol Chem.* 2025 Aug 31;301(10):110665. doi: 10.1016/j.jbc.2025.110665. Epub ahead of print. PMID: 40889683; PMCID: PMC12510028.

Blessed G, Tomlinson BE, Roth M. The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry.* 1968 Jul;114(512):797-811. doi: 10.1192/bjp.114.512.797. PMID: 5662937.

Böhm J, Vasli N, Maurer M, Cowling BS, Shelton GD, Kress W, Toussaint A, Prokic I, Schara U, Anderson TJ, Weis J, Tired L, Laporte J. Altered splicing of the BIN1 muscle-specific exon in humans and dogs with highly progressive centronuclear myopathy. *PLoS Genet.* 2013 Jun;9(6):e1003430. doi: 10.1371/journal.pgen.1003430. Epub 2013 Jun 6. Erratum in: *PLoS Genet.* 2013 Jun;9(6). doi:10.1371/annotation/22ca13f1-1ce9-4bb5-9c9e-98670f7c4240. Cowling, Belinda [corrected to Cowling, Belinda S]. PMID: 23754947; PMCID: PMC3675003.

Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991;82(4):239-59. doi: 10.1007/BF00308809. PMID: 1759558.

Brand AH, Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 1993 Jun;118(2):401-15. doi: 10.1242/dev.118.2.401. PMID: 8223268.

Brent JR, Werner KM, McCabe BD. *Drosophila* larval NMJ dissection. *J Vis Exp.* 2009 Feb 4;(24):1107. doi: 10.3791/1107. PMID: 19229190; PMCID: PMC2762896.

Birks JS, Harvey RJ. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018 Jun 18;6(6):CD001190. doi: 10.1002/14651858.CD001190.pub3. PMID: 29923184; PMCID: PMC6513124.

Brion JP, Flament-Durand J, Dustin P. Alzheimer's disease and tau proteins. *Lancet.* 1986 Nov 8;2(8515):1098. doi: 10.1016/s0140-6736(86)90495-2. PMID: 2877247.

Brodsky H. Realistic expectations for the management of Alzheimer's disease. *Eur Neuropsychopharmacol.* 1999 Apr;9 Suppl 2:S43-52. doi: 10.1016/s0924-977x(98)00044-3. PMID: 10332934.

Brunet Avalos C, Maier GL, Bruggmann R, Sprecher SG. Single cell transcriptome atlas of the *Drosophila* larval brain. *Elife.* 2019 Nov 20;8:e50354. doi: 10.7554/eLife.50354. PMID: 31746739; PMCID: PMC6894929.

Buchholz S, Zempel H. The six brain-specific TAU isoforms and their role in Alzheimer's disease and related neurodegenerative dementia syndromes. *Alzheimers Dement.* 2024 May;20(5):3606-3628. doi: 10.1002/alz.13784. Epub 2024 Mar 31. PMID: 38556838; PMCID: PMC11095451.

Burnet, B., Burnet, L., Connolly, K. *et al.* A genetic analysis of locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **61**, 111–119 (1988). <https://doi.org/10.1038/hdy.1988.96>

Butler MH, David C, Ochoa GC, Freyberg Z, Daniell L, Grabs D, Cremona O, De Camilli P. Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 1997 Jun 16;137(6):1355-67. doi: 10.1083/jcb.137.6.1355. PMID: 9182667; PMCID: PMC2132527.

Caamaño-Isorna F, Corral M, Montes-Martínez A, Takkouche B. Education and dementia: a meta-analytic study. *Neuroepidemiology.* 2006;26(4):226-32. doi: 10.1159/000093378. Epub 2006 May 16. PMID: 16707907.

Caceres A, Banker G, Steward O, Binder L, Payne M. MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture. *Brain Res.* 1984 Apr;315(2):314-8. doi: 10.1016/0165-3806(84)90167-6. PMID: 6722593.

Calafate S, Flavin W, Verstreken P, Moechars D. Loss of Bin1 Promotes the Propagation of Tau Pathology. *Cell Rep.* 2016 Oct 18;17(4):931-940. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.063. PMID: 27760323.

de Calignon A, Polydoro M, Suárez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, Spires-Jones TL, Hyman BT. Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron.* 2012 Feb 23;73(4):685-97. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.033. Erratum in: *Neuron.* 2012 Oct 18;76(2):461. PMID: 22365544; PMCID: PMC3292759.

Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, Fagan AM, Morris JC, Mawuenyega KG, Cruchaga C, Goate AM, Bales KR, Paul SM, Bateman RJ, Holtzman DM. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med.* 2011 Jun 29;3(89):89ra57. doi: 10.1126/scitranslmed.3002156. PMID: 21715678; PMCID: PMC3192364.

Cestra G, Castagnoli L, Dente L, Minenkova O, Petrelli A, Migone N, Hoffmüller U, Schneider-Mergener J, Cesareni G. The SH3 domains of endophilin and amphiphysin bind to the proline-rich region of synaptojanin 1 at distinct sites that display an unconventional binding specificity. *J Biol Chem.* 1999 Nov 5;274(45):32001-7. doi: 10.1074/jbc.274.45.32001. PMID: 10542231.

Chapman NM, Yoder AN, Barbón KM, Bilal MY, Connolly SF, Houtman JC. Proline-rich tyrosine kinase 2 controls PI3-kinase activation downstream of the T cell antigen receptor in human T cells. *J Leukoc Biol.* 2015 Feb;97(2):285-96. doi: 10.1189/jlb.2A1013-568RRR. Epub 2014 Nov 11. PMID: 25387834; PMCID: PMC4304419.

Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J, Mullan M. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nature.* 1991;353(6347):844-846. doi:10.1038/353844a0. PMID: 1944558.

Cheng J, Grassart A, Drubin DG. Myosin 1E coordinates actin assembly and cargo trafficking during clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell.* 2012 Aug;23(15):2891-904. doi: 10.1091/mbc.E11-04-0383. Epub 2012 Jun 6. PMID: 22675027; PMCID: PMC3408416.

Choudhury SD, Mushtaq Z, Reddy-Alla S, Balakrishnan SS, Thakur RS, Krishnan KS, Raghu P, Ramaswami M, Kumar V. σ 2-Adaptin Facilitates Basal Synaptic Transmission and Is Required for Regenerating Endo-Exo Cycling Pool Under High-Frequency Nerve Stimulation in *Drosophila*. *Genetics.* 2016 May;203(1):369-85. doi: 10.1534/genetics.115.183863. Epub 2016 Feb 26. PMID: 26920756; PMCID: PMC4858786.

Choudhury SD, Dwivedi MK, Pippadpally S, Patnaik A, Mishra S, Padinjat R, Kumar V. AP2 Regulates Thickveins Trafficking to Attenuate NMJ Growth Signaling in *Drosophila*. *eNeuro.* 2022 Oct 12;9(5):ENEURO.0044-22.2022. doi: 10.1523/ENEURO.0044-22.2022. PMID: 36180220; PMCID: PMC9581581.

Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M, Tolnay M. Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol.* 2009 Jul;11(7):909-13. doi: 10.1038/ncb1901. Epub 2009 Jun 7. PMID: 19503072; PMCID: PMC2726961.

Collins CA, DiAntonio A. Synaptic development: insights from *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol.* 2007 Feb;17(1):35-42. doi: 10.1016/j.conb.2007.01.001. Epub 2007 Jan 16. PMID: 17229568.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of

Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993 Aug 13;261(5123):921-3. doi: 10.1126/science.8346443. PMID: 8346443.

Coulom H, Birman S. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci*. 2004 Dec 1;24(48):10993-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2993-04.2004. PMID: 15574749; PMCID: PMC6730201.

Cowling BS, Prokic I, Tasfaout H, Rabai A, Humbert F, Rinaldi B, Nicot AS, Kretz C, Friant S, Roux A, Laporte J. Amphiphysin (BIN1) negatively regulates dynamin 2 for normal muscle maturation. *J Clin Invest*. 2017 Dec 1;127(12):4477-4487. doi: 10.1172/JCI90542. Epub 2017 Nov 13. PMID: 29130937; PMCID: PMC5707152.

Coyle IP, Koh YH, Lee WC, Slind J, Fergestad T, Littleton JT, Ganetzky B. Nervous wreck, an SH3 adaptor protein that interacts with Wsp, regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron*. 2004 Feb 19;41(4):521-34. doi: 10.1016/s0896-6273(04)00016-9. PMID: 14980202.

Crotti A, Sait HR, McAvoy KM, Estrada K, Ergun A, Szak S, Marsh G, Jandreski L, Peterson M, Reynolds TL, Dalkilic-Liddle I, Cameron A, Cahir-McFarland E, Ransohoff RM. BIN1 favors the spreading of Tau via extracellular vesicles. *Sci Rep*. 2019 Jul 1;9(1):9477. doi: 10.1038/s41598-019-45676-0. PMID: 31263146; PMCID: PMC6603165.

Crutch SJ, Lehmann M, Schott JM, Rabinovici GD, Rossor MN, Fox NC. Posterior cortical atrophy. *Lancet Neurol*. 2012 Feb;11(2):170-8. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70289-7. PMID: 22265212; PMCID: PMC3740271.

Cummings J, Apostolova L, Rabinovici GD, Atri A, Aisen P, Greenberg S, Hendrix S, Selkoe D, Weiner M, Petersen RC, Salloway S. Lecanemab: Appropriate Use Recommendations. *J Prev Alzheimers Dis*. 2023;10(3):362-377. doi: 10.14283/jpad.2023.30. PMID: 37357276; PMCID: PMC10313141. Davie K, Janssens J, Koldere D, De Waegeneer M, Pech U, Kreft Ł, Aibar S, Makhzami S, Christiaens V, Bravo González-Blas C, Poovathingal S, Hulselmans G, Spanier KI, Moerman T, Vanspauwen B, Geurs S, Voet T, Lammertyn J, Thienpont B, Liu S, Konstantinides N, Fiers M, Verstreken P, Aerts S. A Single-Cell Transcriptome Atlas of the Aging *Drosophila* Brain. *Cell*. 2018 Aug 9;174(4):982-998.e20. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.057. Epub 2018 Jun 18. PMID: 29909982; PMCID: PMC6086935.

Cummings JL, Zhou Y, Lee G, Zhong K, Fonseca J, Leisgang-Osse AM, Cheng F. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2025. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2025 Jun 3;11(2):e70098. doi: 10.1002/trc2.70098. PMID: 40463637; PMCID: PMC12131090.

Davies P, Maloney AJ. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*. 1976 Dec 25;2(8000):1403. doi: 10.1016/s0140-6736(76)91936-x. PMID: 63862.

Davis RL. Learning and memory using *Drosophila melanogaster*: a focus on advances made in the fifth decade of research. *Genetics*. 2023 Aug 9;224(4):iyad085. doi: 10.1093/genetics/iyad085. PMID: 37212449; PMCID: PMC10411608.

De Rossi P, Buggia-Prévot V, Clayton BL, Vasquez JB, van Sanford C, Andrew RJ, Lesnick R, Botté A, Deyts C, Salem S, Rao E, Rice RC, Parent A, Kar S, Popko B, Pytel P, Estus S, Thinakaran G. Predominant expression of Alzheimer's disease-associated BIN1 in mature oligodendrocytes and localization to white matter tracts. *Mol Neurodegener*. 2016 Aug 3;11(1):59. doi: 10.1186/s13024-016-0124-1. Erratum in: *Mol Neurodegener*. 2023 Oct 2;18(1):72. doi: 10.1186/s13024-023-00662-z. PMID: 27488240; PMCID: PMC4973113.

De Rossi P, Nomura T, Andrew RJ, Masse NY, Sampathkumar V, Musial TF, Sudwarts A, Recupero AJ, Le Metayer T, Hansen MT, Shim HN, Krause SV, Freedman DJ, Bindokas VP,

Kasthuri N, Nicholson DA, Contractor A, Thinakaran G. Neuronal BIN1 Regulates Presynaptic Neurotransmitter Release and Memory Consolidation. *Cell Rep.* 2020 Mar 10;30(10):3520-3535.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.026. PMID: 32160554; PMCID: PMC7146643.

Dickman DK, Lu Z, Meinertzhagen IA, Schwarz TL. Altered synaptic development and active zone spacing in endocytosis mutants. *Curr Biol.* 2006 Mar 21;16(6):591-8. doi: 10.1016/j.cub.2006.02.058. Erratum in: *Curr Biol.* 2006 Oct 10;16(19):1975. PMID: 16546084.

Dickson DW. Pick's disease: a modern approach. *Brain Pathol.* 1998 Apr;8(2):339-54. doi: 10.1111/j.1750-3639.1998.tb00158.x. PMID: 9546291; PMCID: PMC8098155.

Dickson DW, Kouri N, Murray ME, Josephs KA. Neuropathology of frontotemporal lobar degeneration-tau (FTLD-tau). *J Mol Neurosci.* 2011 Nov;45(3):384-9. doi: 10.1007/s12031-011-9589-0. Epub 2011 Jul 1. PMID: 21720721; PMCID: PMC3208128.

Dikic I, Tokiwa G, Lev S, Courtneidge SA, Schlessinger J. A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature.* 1996 Oct 10;383(6600):547-50. doi: 10.1038/383547a0. PMID: 8849729.

Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 1988 Apr;8(4):1454-68. doi: 10.1523/JNEUROSCI.08-04-01454.1988. PMID: 3282038; PMCID: PMC6569279.

Dourlen P, Bertin B, Chatelain G, Robin M, Napoletano F, Roux MJ, Mollereau B. Drosophila fatty acid transport protein regulates rhodopsin-1 metabolism and is required for photoreceptor neuron survival. *PLoS Genet.* 2012;8(7):e1002833. doi: 10.1371/journal.pgen.1002833. Epub 2012 Jul 26. PMID: 22844251; PMCID: PMC3405995.

Dourlen P, Fernandez-Gomez FJ, Dupont C, Grenier-Boley B, Bellenguez C, Obriot H, Caillierez R, Sottejeau Y, Chapuis J, Bretteville A, Abdelfettah F, Delay C, Malmanche N, Soinenen H, Hiltunen M, Galas MC, Amouyel P, Sergeant N, Buée L, Lambert JC, Dermaut B. Functional screening of Alzheimer risk loci identifies PTK2B as an in vivo modulator and early marker of Tau pathology. *Mol Psychiatry.* 2017 Jun;22(6):874-883. doi: 10.1038/mp.2016.59. Epub 2016 Apr 26. PMID: 27113998; PMCID: PMC5444024.

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.* 2019 Aug;138(2):221-236. doi: 10.1007/s00401-019-02004-0. Epub 2019 Apr 13. PMID: 30982098; PMCID: PMC6660578.

Dourlen P, Kilinc D, Landrieu I, Chapuis J, Lambert JC. BIN1 and Alzheimer's disease: the tau connection. *Trends Neurosci.* 2025 May;48(5):349-361. doi: 10.1016/j.tins.2025.03.004. Epub 2025 Apr 22. PMID: 40268578.

Dräger NM, Nachman E, Winterhoff M, Brühmann S, Shah P, Katsinelos T, Boulant S, Teleman AA, Faix J, Jahn TR. Bin1 directly remodels actin dynamics through its BAR domain. *EMBO Rep.* 2017 Nov;18(11):2051-2066. doi: 10.15252/embr.201744137. Epub 2017 Sep 11. PMID: 28893863; PMCID: PMC5666605.

Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* 2007 Aug;6(8):734-746. doi:10.1016/S1474-4422(07)70178-3. PMID: 17616482.

Dudu V, Bittig T, Entchev E, Kicheva A, Jülicher F, González-Gaitán M. Postsynaptic mad signaling at the Drosophila neuromuscular junction. *Curr Biol.* 2006 Apr 4;16(7):625-35. doi: 10.1016/j.cub.2006.02.061. Erratum in: *Curr Biol.* 2006 Jun 20;16(12):1256. PMID: 16581507.

van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, Kanekiyo M, Li D, Reyderman L, Cohen S, Froelich L, Katayama S, Sabbagh M, Vellas B, Watson D, Dhadda S, Irizarry M, Kramer LD, Iwatsubo T. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N Engl J Med*. 2023 Jan 5;388(1):9-21. doi: 10.1056/NEJMoa2212948. Epub 2022 Nov 29. PMID: 36449413.

Ehmann N, van de Linde S, Alon A, Ljaschenko D, Keung XZ, Holm T, Rings A, DiAntonio A, Hallermann S, Ashery U, Heckmann M, Sauer M, Kittel RJ. Quantitative super-resolution imaging of Bruchpilot distinguishes active zone states. *Nat Commun*. 2014 Aug 18;5:4650. doi: 10.1038/ncomms5650. PMID: 25130366; PMCID: PMC4143948.

Elliott K, Sakamuro D, Basu A, Du W, Wunner W, Staller P, Gaubatz S, Zhang H, Prochownik E, Eilers M, Prendergast GC. Bin1 functionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms. *Oncogene*. 1999 Jun 17;18(24):3564-73. doi: 10.1038/sj.onc.1202670. PMID: 10380878.

Evergren E, Marcucci M, Tomilin N, Löw P, Slepnev V, Andersson F, Gad H, Brodin L, De Camilli P, Shupliakov O. Amphiphysin is a component of clathrin coats formed during synaptic vesicle recycling at the lamprey giant synapse. *Traffic*. 2004 Jul;5(7):514-28. doi: 10.1111/j.1398-9219.2004.00198.x. PMID: 15180828.

Falcone S, Roman W, Hnia K, Gache V, Didier N, Lainé J, Auradé F, Marty I, Nishino I, Charlet-Berguerand N, Romero NB, Marazzi G, Sassoon D, Laporte J, Gomes ER. N-WASP is required for Amphiphysin-2/BIN1-dependent nuclear positioning and triad organization in skeletal muscle and is involved in the pathophysiology of centronuclear myopathy. *EMBO Mol Med*. 2014 Nov;6(11):1455-75. doi: 10.15252/emmm.201404436. PMID: 25262827; PMCID: PMC4237471.

Fitz NF, Nam KN, Wolfe CM, Letronne F, Playso BE, Iordanova BE, Kozai TDY, Biedrzycki RJ, Kagan VE, Tyurina YY, Han X, Lefterov I, Koldamova R. Phospholipids of APOE lipoproteins activate microglia in an isoform-specific manner in preclinical models of Alzheimer's disease. *Nat Commun*. 2021 Jun 7;12(1):3416. doi: 10.1038/s41467-021-23762-0. PMID: 34099706; PMCID: PMC8184801.

Fondation Médéric Alzheimer (<https://www.fondation-mederic-alzheimer.org/alzheimer-en-chiffres/>).

Fouquet W, Oswald D, Wichmann C, Mertel S, Depner H, Dyba M, Hallermann S, Kittel RJ, Eimer S, Sigrist SJ. Maturation of active zone assembly by *Drosophila* Bruchpilot. *J Cell Biol*. 2009 Jul 13;186(1):129-45. doi: 10.1083/jcb.200812150. PMID: 19596851; PMCID: PMC2712991.

Fox GL, Rebay I, Hynes RO. Expression of DFak56, a *Drosophila* homolog of vertebrate focal adhesion kinase, supports a role in cell migration in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 21;96(26):14978-83. doi: 10.1073/pnas.96.26.14978. PMID: 10611323; PMCID: PMC24758.

Franzmeier N, Rubinski A, Neitzel J, Ewers M; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). The BIN1 rs744373 SNP is associated with increased tau-PET levels and impaired memory. *Nat Commun*. 2019 Apr 16;10(1):1766. doi: 10.1038/s41467-019-09564-5. PMID: 30992433; PMCID: PMC6467911.

Frost GR, Li YM. The role of astrocytes in amyloid production and Alzheimer's disease. *Open Biol*. 2017 Dec;7(12):170228. doi: 10.1098/rsob.170228. PMID: 29237809; PMCID: PMC5746550.

Fujimoto J, Sawamoto K, Okabe M, Takagi Y, Tezuka T, Yoshikawa S, Ryo H, Okano H, Yamamoto T. Cloning and characterization of Dfak56, a homolog of focal adhesion kinase, in *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*. 1999 Oct 8;274(41):29196-201. doi: 10.1074/jbc.274.41.29196. PMID: 10506176.

Gaeta AM, Quijada-López M, Barbé F, Vaca R, Pujol M, Minguez O, Sánchez-de-la-Torre M, Muñoz-Barrutia A, Piñol-Ripoll G. Predicting Alzheimer's disease CSF core biomarkers: a multimodal Machine Learning approach. *Front Aging Neurosci*. 2024 Jun 26;16:1369545. doi: 10.3389/fnagi.2024.1369545. PMID: 38988328; PMCID: PMC11233742.

Gao C, Shen X, Tan Y, Chen S. Pathogenesis, therapeutic strategies and biomarker development based on "omics" analysis related to microglia in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2022 Sep 4;19(1):215. doi: 10.1186/s12974-022-02580-1. PMID: 36058959; PMCID: PMC9441025.

Garcia-Agudo LF, Shi Z, Smith IF, Kramár EA, Tran K, Kawauchi S, Wang S, Collins S, Walker A, Shi KX, Neumann J, Liang HY, Da Cunha C, Milinkeviciute G, Morabito S, Miyoshi E, Rezaie N, Gomez-Arboledas A, Arvilla AM, Ghaemi DI, Tenner AJ, LaFerla FM, Wood MA, Mortazavi A, Swarup V, MacGregor GR, Green KN. BIN1^{K358R} suppresses glial response to plaques in mouse model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2024 Apr;20(4):2922-2942. doi: 10.1002/alz.13767. Epub 2024 Mar 9. PMID: 38460121; PMCID: PMC11032570.

Gardner RC, Bahorik A, Kornblith ES, Allen IE, Plassman BL, Yaffe K. Systematic Review, Meta-Analysis, and Population Attributable Risk of Dementia Associated with Traumatic Brain Injury in Civilians and Veterans. *J Neurotrauma*. 2023 Apr;40(7-8):620-634. doi: 10.1089/neu.2022.0041. Epub 2022 Dec 8. PMID: 36305374; PMCID: PMC10325813.

Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Feb;63(2):168-74. doi: 10.1001/archpsyc.63.2.168. PMID: 16461860.

Ge Y. Vascular Contributions to Healthy Aging and Dementia. *Aging Dis*. 2024 Aug 1;15(4):1432-1437. doi: 10.14336/AD.2023.1719. PMID: 39059424; PMCID: PMC11272195.

Gertz HJ, Xuereb JH, Huppert FA, Brayne C, Krüger H, McGee MA, Paykel ES, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB, O'Connor DW, Wischik CM. The relationship between clinical dementia and neuropathological staging (Braak) in a very elderly community sample. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1996;246(3):132-6. doi: 10.1007/BF02189114. PMID: 8739398.

Giralt A, Coura R, Girault JA. Pyk2 is essential for astrocytes mobility following brain lesion. *Glia*. 2016 Apr;64(4):620-34. doi: 10.1002/glia.22952. Epub 2015 Dec 11. PMID: 26663135.

Giralt A, Brito V, Chevy Q, Simonnet C, Otsu Y, Cifuentes-Díaz C, de Pins B, Coura R, Alberch J, Ginés S, Poncer JC, Girault JA. Pyk2 modulates hippocampal excitatory synapses and contributes to cognitive deficits in a Huntington's disease model. *Nat Commun*. 2017 May 30;8:15592. doi: 10.1038/ncomms15592. PMID: 28555636; PMCID: PMC5459995.

Giralt A, de Pins B, Cifuentes-Díaz C, López-Molina L, Farah AT, Tibile M, Deramecourt V, Arold ST, Ginés S, Hugon J, Girault JA. PTK2B/Pyk2 overexpression improves a mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*. 2018 Sep;307:62-73. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.05.020. Epub 2018 May 24. PMID: 29803828.

Giraud Q, Laporte J. Amphiphysin-2 (BIN1) functions and defects in cardiac and skeletal muscle. *Trends Mol Med*. 2024 Jun;30(6):579-591. doi: 10.1016/j.molmed.2024.02.005. Epub 2024 Mar 20. PMID: 38514365.

Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 May 16;120(3):885-90. doi: 10.1016/s0006-291x(84)80190-4. PMID: 6375662.

Glennon EB, Lau DH, Gabriele RMC, Taylor MF, Troakes C, Opie-Martin S, Elliott C, Killick R, Hanger DP, Perez-Nievas BG, Noble W. Bridging Integrator-1 protein loss in Alzheimer's disease promotes synaptic tau accumulation and disrupts tau release. *Brain Commun*. 2020;2(1):fcaa011. doi: 10.1093/braincomms/fcaa011. Epub 2020 Feb 14. PMID: 32500121; PMCID: PMC7272218.

Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991 Feb 21;349(6311):704-6. doi: 10.1038/349704a0. PMID: 1671712.

Goedert M, Clavaguera F, Tolnay M. The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*. 2010 Jul;33(7):317-25. doi: 10.1016/j.tins.2010.04.003. Epub 2010 May 20. PMID: 20493564.

Goedert M, Eisenberg DS, Crowther RA. Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*. 2017 Jul 25;40:189-210. doi: 10.1146/annurev-neuro-072116-031153. PMID: 28772101.

Gorno-Tempini ML, Hillis AE, Weintraub S, Kertesz A, Mendez M, Cappa SF, Ogar JM, Rohrer JD, Black S, Boeve BF, Manes F, Dronkers NF, Vandenberghe R, Rascovsky K, Patterson K, Miller BL, Knopman DS, Hodges JR, Mesulam MM, Grossman M. Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*. 2011 Mar 15;76(11):1006-14. doi: 10.1212/WNL.0b013e31821103e6. Epub 2011 Feb 16. PMID: 21325651; PMCID: PMC3059138.

Grabbe C, Zervas CG, Hunter T, Brown NH, Palmer RH. Focal adhesion kinase is not required for integrin function or viability in *Drosophila*. *Development*. 2004 Dec;131(23):5795-805. doi: 10.1242/dev.01462. Epub 2004 Nov 3. PMID: 15525665.

Grabs D, Slepnev VI, Songyang Z, David C, Lynch M, Cantley LC, De Camilli P. The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J Biol Chem*. 1997 May 16;272(20):13419-25. doi: 10.1074/jbc.272.20.13419. PMID: 9148966.

Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*. 1986 May 5;261(13):6084-9. PMID: 3084478. [26] Braak H, Braak E. (1991). *Acta Neuropathol*, 82(4), 239–259.

Gudala K, Bansal D, Schifano F, Bhansali A. Diabetes mellitus and risk of dementia: A meta-analysis of prospective observational studies. *J Diabetes Investig*. 2013 Nov 27;4(6):640-50. doi: 10.1111/jdi.12087. Epub 2013 Apr 26. PMID: 24843720; PMCID: PMC4020261.

Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E, Cruchaga C, Sassi C, Kauwe JS, Younkin S, Hazrati L, Collinge J, Pocock J, Lashley T, Williams J, Lambert JC, Amouyel P, Goate A, Rademakers R, Morgan K, Powell J, St George-Hyslop P, Singleton A, Hardy J; Alzheimer Genetic Analysis Group. TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2013 Jan 10;368(2):117-27. doi: 10.1056/NEJMoa1211851. Epub 2012 Nov 14. PMID: 23150934; PMCID: PMC3631573.

Guo Y, Sun CK, Tang L, Tan MS. Microglia *PTK2B/Pyk2* in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2023;20(10):692-704. doi: 10.2174/0115672050299004240129051655. PMID: 38321895.

Haas LT, Salazar SV, Kostylev MA, Um JW, Kaufman AC, Strittmatter SM. Metabotropic glutamate receptor 5 couples cellular prion protein to intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Brain.* 2016 Feb;139(Pt 2):526-46. doi: 10.1093/brain/awv356. Epub 2015 Dec 14. PMID: 26667279; PMCID: PMC4840505.

Han HY, Zhang JP, Ji SQ, Liang QM, Kang HC, Tang RH, Zhu SQ, Xue Z. α and β 1 Integrins mediate A β -induced neurotoxicity in hippocampal neurons via the FAK signaling pathway. *PLoS One.* 2013 Jun 3;8(6):e64839. doi: 10.1371/journal.pone.0064839. PMID: 23755149; PMCID: PMC3670848.

Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992 Apr 10;256(5054):184-5. doi: 10.1126/science.1566067. PMID: 1566067.

Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskva V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, Heun R, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JS, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel KH, Klopp N, Wichmann HE, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA, O'Donovan M, Owen MJ, Williams J. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009 Oct;41(10):1088-93. doi: 10.1038/ng.440. Epub 2009 Sep 6. Erratum in: *Nat Genet.* 2009 Oct;41(10):1156. Erratum in: *Nat Genet.* 2013 Jun;45(6):712. Haun, Reinhard [added]. PMID: 19734902; PMCID: PMC2845877.

Heisenberg M. Separation of receptor and lamina potentials in the electroretinogram of normal and mutant *Drosophila*. *J Exp Biol.* 1971 Aug;55(1):85-100. doi: 10.1242/jeb.55.1.85. PMID: 5001616.

Heisenberg M. Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci.* 2003 Apr;4(4):266-75. doi: 10.1038/nrn1074. PMID: 12671643.

Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, Merry KM, Shi Q, Rosenthal A, Barres BA, Lemere CA, Selkoe DJ, Stevens B. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science.* 2016 May 6;352(6286):712-716. doi: 10.1126/science.aad8373. Epub 2016 Mar 31. PMID: 27033548; PMCID: PMC5094372.

Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, Pitstick R, Carlson GA, Lanier LM, Yuan LL, Ashe KH, Liao D. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron.* 2010 Dec 22;68(6):1067-81. doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.030. PMID: 21172610; PMCID: PMC3026458.

Hsin H, Kim MJ, Wang CF, Sheng M. Proline-rich tyrosine kinase 2 regulates hippocampal long-term depression. *J Neurosci.* 2010 Sep 8;30(36):11983-93. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1029-10.2010. PMID: 20826662; PMCID: PMC4122232.

Huang S, Wang YJ, Guo J. Biofluid Biomarkers of Alzheimer's Disease: Progress, Problems, and Perspectives. *Neurosci Bull.* 2022 Jun;38(6):677-691. doi: 10.1007/s12264-022-00836-7. Epub 2022 Mar 19. PMID: 35306613; PMCID: PMC9206048.

Huang YY, Gan YH, Yang L, Cheng W, Yu JT. Depression in Alzheimer's Disease: Epidemiology, Mechanisms, and Treatment. *Biol Psychiatry.* 2024 Jun 1;95(11):992-1005. doi: 10.1016/j.biopsych.2023.10.008. Epub 2023 Oct 20. PMID: 37866486.

Huser S, Suri G, Crottet P, Spiess M. Interaction of amphiphysins with AP-1 clathrin adaptors at the membrane. *Biochem J.* 2013 Feb 15;450(1):73-83. doi: 10.1042/BJ20121373. PMID: 23190214.

Iijima K, Liu HP, Chiang AS, Hearn SA, Konsolaki M, Zhong Y. Dissecting the pathological effects of human Abeta40 and Abeta42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Apr 27;101(17):6623-8. doi: 10.1073/pnas.0400895101. Epub 2004 Apr 6. PMID: 15069204; PMCID: PMC404095.

Imlach W, McCabe BD. Electrophysiological methods for recording synaptic potentials from the NMJ of *Drosophila* larvae. *J Vis Exp.* 2009 Feb 6;(24):1109. doi: 10.3791/1109. PMID: 19229189; PMCID: PMC2762897.

Insel PS, Hansson O, Mattsson-Carlsson N. Association Between Apolipoprotein E ϵ 2 vs ϵ 4, Age, and β -Amyloid in Adults Without Cognitive Impairment. *JAMA Neurol.* 2021 Feb 1;78(2):229-235. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.3780. PMID: 33044487; PMCID: PMC7551211.

Inserm. Maladie d'Alzheimer. 2020. (<https://www.inserm.fr/dossier/alzheimer-maladie/>)

Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D. Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol.* 1989 Oct;24(3):173-82. doi: 10.1016/0165-5728(89)90115-x. PMID: 2808689.

Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufienbiel M, Hardeman E, Götz J. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell.* 2010 Aug 6;142(3):387-97. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.036. Epub 2010 Jul 22. PMID: 20655099.

Jack CR Jr, Andrews JS, Beach TG, Buracchio T, Dunn B, Graf A, Hansson O, Ho C, Jagust W, McDade E, Molinuevo JL, Okonkwo OC, Pani L, Rafii MS, Scheltens P, Siemers E, Snyder HM, Sperling R, Teunissen CE, Carrillo MC. Revised criteria for diagnosis and staging of Alzheimer's disease: Alzheimer's Association Workgroup. *Alzheimers Dement.* 2024 Aug;20(8):5143-5169. doi: 10.1002/alz.13859. Epub 2024 Jun 27. PMID: 38934362; PMCID: PMC11350039.

Jan LY, Jan YN. Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *J Physiol.* 1976 Oct;262(1):189-214. doi: 10.1113/jphysiol.1976.sp011592. PMID: 11339; PMCID: PMC1307637.

Jan LY, Jan YN. Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Apr;79(8):2700-4. doi: 10.1073/pnas.79.8.2700. PMID: 6806816; PMCID: PMC346269.

Jansen WJ, Ossenkoppele R, Knol DL, Tijms BM, Scheltens P, Verhey FR, Visser PJ; Amyloid Biomarker Study Group; Aalten P, Aarsland D, Alcolea D, Alexander M, Almdahl IS, Arnold SE, Baldeiras I, Barthel H, van Berckel BN, Bibeau K, Blennow K, Brooks DJ, van Buchem MA, Camus V, Cavedo E, Chen K, Chetelat G, Cohen AD, Drzezga A, Engelborghs S, Fagan AM,

Fladby T, Fleisher AS, van der Flier WM, Ford L, Förster S, Fortea J, Foskett N, Frederiksen KS, Freund-Levi Y, Frisoni GB, Froelich L, Gabryelewicz T, Gill KD, Gkatzima O, Gómez-Tortosa E, Gordon MF, Grimmer T, Hampel H, Hausner L, Hellwig S, Herukka SK, Hildebrandt H, Ishihara L, Ivanoiu A, Jagust WJ, Johannsen P, Kandimalla R, Kapaki E, Klimkiewicz-Mrowiec A, Klunk WE, Köhler S, Koglin N, Kornhuber J, Kramberger MG, Van Laere K, Landau SM, Lee DY, de Leon M, Lisetti V, Lleó A, Madsen K, Maier W, Marcusson J, Mattsson N, de Mendonça A, Meulenbroek O, Meyer PT, Mintun MA, Mok V, Molinuevo JL, Møllergård HM, Morris JC, Mroczko B, Van der Mussele S, Na DL, Newberg A, Nordberg A, Nordlund A, Novak GP, Paraskevas GP, Parnetti L, Perera G, Peters O, Popp J, Prabhakar S, Rabinovici GD, Ramakers IH, Rami L, Resende de Oliveira C, Rinne JO, Rodrigue KM, Rodríguez-Rodríguez E, Roe CM, Rot U, Rowe CC, Rütther E, Sabri O, Sanchez-Juan P, Santana I, Sarazin M, Schröder J, Schütte C, Seo SW, Soetewey F, Soininen H, Spuru L, Struyfs H, Teunissen CE, Tsolaki M, Vandenberghe R, Verbeek MM, Villemagne VL, Vos SJ, van Waalwijk van Doorn LJ, Waldemar G, Wallin A, Wallin ÅK, Wilfang J, Wolk DA, Zboch M, Zetterberg H. Prevalence of cerebral amyloid pathology in persons without dementia: a meta-analysis. *JAMA*. 2015 May 19;313(19):1924-38. doi: 10.1001/jama.2015.4668. PMID: 25988462; PMCID: PMC4486209.

Kadlec L, Pendergast AM. The amphiphysin-like protein 1 (ALP1) interacts functionally with the cABL tyrosine kinase and may play a role in cytoskeletal regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 11;94(23):12390-5. doi: 10.1073/pnas.94.23.12390. PMID: 9356459; PMCID: PMC24959.

Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, Sisodia S, Malinow R. APP processing and synaptic function. *Neuron*. 2003 Mar 27;37(6):925-37. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00124-7. PMID: 12670422.

Kami K, Takeya R, Sumimoto H, Kohda D. Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67(phox), Grb2 and Pex13p. *EMBO J*. 2002 Aug 15;21(16):4268-76. doi: 10.1093/emboj/cdf428. PMID: 12169629; PMCID: PMC126167.

Kamimura K, Ueno K, Nakagawa J, Hamada R, Saitoe M, Maeda N. Perlecan regulates bidirectional Wnt signaling at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Cell Biol*. 2013 Jan 21;200(2):219-33. doi: 10.1083/jcb.201207036. Epub 2013 Jan 14. PMID: 23319599; PMCID: PMC3549968.

Kanekiyo T, Xu H, Bu G. ApoE and A β in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners? *Neuron*. 2014 Feb 19;81(4):740-54. doi: 10.1016/j.neuron.2014.01.045. PMID: 24559670; PMCID: PMC3983361.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987 Feb 19-25;325(6106):733-6. doi: 10.1038/325733a0. PMID: 2881207.

Karch CM, Hernández D, Wang JC, Marsh J, Hewitt AW, Hsu S, Norton J, Levitch D, Donahue T, Sigurdson W, Ghetti B, Farlow M, Chhatwal J, Berman S, Cruchaga C, Morris JC, Bateman RJ; Dominantly Inherited Alzheimer Network (DIAN); Pébay A, Goate AM. Human fibroblast and stem cell resource from the Dominantly Inherited Alzheimer Network. *Alzheimers Res Ther*. 2018 Jul 25;10(1):69. doi: 10.1186/s13195-018-0400-0. PMID: 30045758; PMCID: PMC6060509.

Kaufman AC, Salazar SV, Haas LT, Yang J, Kostylev MA, Jeng AT, Robinson SA, Gunther EC, van Dyck CH, Nygaard HB, Strittmatter SM. Fyn inhibition rescues established memory

and synapse loss in Alzheimer mice. *Ann Neurol.* 2015 Jun;77(6):953-71. doi: 10.1002/ana.24394. Epub 2015 Mar 21. PMID: 25707991; PMCID: PMC4447598.

Kazim SF, Iqbal K. Neurotrophic factor small-molecule mimetics mediated neuroregeneration and synaptic repair: emerging therapeutic modality for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2016 Jul 11;11(1):50. doi: 10.1186/s13024-016-0119-y. PMID: 27400746; PMCID: PMC4940708.

Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, David E, Baruch K, Lara-Astaiso D, Toth B, Itzkovitz S, Colonna M, Schwartz M, Amit I. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell.* 2017 Jun 15;169(7):1276-1290.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.018. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28602351.

Keshishian H, Broadie K, Chiba A, Bate M. The drosophila neuromuscular junction: a model system for studying synaptic development and function. *Annu Rev Neurosci.* 1996;19:545-75. doi: 10.1146/annurev.ne.19.030196.002553. PMID: 8833454.

Kester MI, Teunissen CE, Crimmins DL, Herries EM, Ladenson JH, Scheltens P, van der Flier WM, Morris JC, Holtzman DM, Fagan AM. Neurogranin as a Cerebrospinal Fluid Biomarker for Synaptic Loss in Symptomatic Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 2015 Nov;72(11):1275-80. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.1867. PMID: 26366630; PMCID: PMC4694558.

Kim AY, Al Jerdi S, MacDonald R, Triggler CR. Alzheimer's disease and its treatment-yesterday, today, and tomorrow. *Front Pharmacol.* 2024 May 24;15:1399121. doi: 10.3389/fphar.2024.1399121. PMID: 38868666; PMCID: PMC11167451.

Kim YJ, Bao H, Bonanno L, Zhang B, Serpe M. Drosophila Neto is essential for clustering glutamate receptors at the neuromuscular junction. *Genes Dev.* 2012 May 1;26(9):974-87. doi: 10.1101/gad.185165.111. Epub 2012 Apr 12. PMID: 22499592; PMCID: PMC3347794.

Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, Schmid A, Wagh DA, Pawlu C, Kellner RR, Willig KI, Hell SW, Buchner E, Heckmann M, Sigrist SJ. Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. *Science.* 2006 May 19;312(5776):1051-4. doi: 10.1126/science.1126308. Epub 2006 Apr 13. PMID: 16614170.

Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hänninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population-based study. *BMJ.* 2001 Jun 16;322(7300):1447-51. doi: 10.1136/bmj.322.7300.1447. PMID: 11408299; PMCID: PMC32306.

Klingbeil CK, Hauck CR, Hsia DA, Jones KC, Reider SR, Schlaepfer DD. Targeting Pyk2 to beta 1-integrin-containing focal contacts rescues fibronectin-stimulated signaling and haptotactic motility defects of focal adhesion kinase-null cells. *J Cell Biol.* 2001 Jan 8;152(1):97-110. doi: 10.1083/jcb.152.1.97. PMID: 11149924; PMCID: PMC2193658.

Kilinc D, Vreulx AC, Mendes T, Flaig A, Marques-Coelho D, Verschoore M, Demiautte F, Amouyel P; Neuro-CEB Brain Bank; Eysert F, Dourlen P, Chapuis J, Costa MR, Malmanche N, Checler F, Lambert JC. Pyk2 overexpression in postsynaptic neurons blocks amyloid β_{1-42} -induced synaptotoxicity in microfluidic co-cultures. *Brain Commun.* 2020 Aug 28;2(2):fcaa139. doi: 10.1093/braincomms/fcaa139. PMID: 33718872; PMCID: PMC7941669.

Kittel RJ, Wichmann C, Rasse TM, Fouquet W, Schmidt M, Schmid A, Wagh DA, Pawlu C, Kellner RR, Willig KI, Hell SW, Buchner E, Heckmann M, Sigrist SJ. Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. *Science.* 2006 May 19;312(5776):1051-4. doi: 10.1126/science.1126308. Epub 2006 Apr 13. PMID: 16614170.

Kloske CM, Wilcock DM. The Important Interface Between Apolipoprotein E and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Front Immunol.* 2020 Apr 30;11:754. doi: 10.3389/fimmu.2020.00754. PMID: 32425941; PMCID: PMC7203730.

Koh TW, Korolchuk VI, Wairkar YP, Jiao W, Evergren E, Pan H, Zhou Y, Venken KJ, Shupliakov O, Robinson IM, O'Kane CJ, Bellen HJ. Eps15 and Dap160 control synaptic vesicle membrane retrieval and synapse development. *J Cell Biol.* 2007 Jul 16;178(2):309-22. doi: 10.1083/jcb.200701030. Epub 2007 Jul 9. PMID: 17620409; PMCID: PMC2064449.

Kong L, Yang X, Xu J. Comparison of safety of lecanemab and aducanumab: a real-world disproportionality analysis using the FDA adverse event reporting system. *Front Pharmacol.* 2025 May 30;16:1593989. doi: 10.3389/fphar.2025.1593989. PMID: 40520157; PMCID: PMC12162493.

Kouri N, Whitwell JL, Josephs KA, Rademakers R, Dickson DW. Corticobasal degeneration: a pathologically distinct 4R tauopathy. *Nat Rev Neurol.* 2011 May;7(5):263-72. doi: 10.1038/nrneurol.2011.43. Epub 2011 Apr 12. PMID: 21487420; PMCID: PMC10006729.

Kovacs GG, Lukic MJ, Irwin DJ, Arzberger T, Respondek G, Lee EB, Coughlin D, Giese A, Grossman M, Kurz C, McMillan CT, Gelpi E, Compta Y, van Swieten JC, Laat LD, Troakes C, Al-Sarraj S, Robinson JL, Roeber S, Xie SX, Lee VM, Trojanowski JQ, Höglinger GU. Distribution patterns of tau pathology in progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol.* 2020 Aug;140(2):99-119. doi: 10.1007/s00401-020-02158-2. Epub 2020 May 7. PMID: 32383020; PMCID: PMC7360645.

Kraepelin E. (1910). *Psychiatrie.* 8e éd.

Kuchibhotla KV, Lattarulo CR, Hyman BT, Bacskai BJ. Synchronous hyperactivity and intercellular calcium waves in astrocytes in Alzheimer mice. *Science.* 2009 Feb 27;323(5918):1211-5. doi: 10.1126/science.1169096. PMID: 19251629; PMCID: PMC2884172.

Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC, Boland A, Vronskaya M, van der Lee SJ, Amlie-Wolf A, Bellenguez C, Frizatti A, Chouraki V, Martin ER, Sleegers K, Badarinarayan N, Jakobsdottir J, Hamilton-Nelson KL, Moreno-Grau S, O'Laso R, Raybould R, Chen Y, Kuzma AB, Hiltunen M, Morgan T, Ahmad S, Vardarajan BN, Epelbaum J, Hoffmann P, Boada M, Beecham GW, Garnier JG, Harold D, Fitzpatrick AL, Valladares O, Moutet ML, Gerrish A, Smith AV, Qu L, Bacq D, Denning N, Jian X, Zhao Y, Del Zompo M, Fox NC, Choi SH, Mateo I, Hughes JT, Adams HH, Malamon J, Sanchez-Garcia F, Patel Y, Brody JA, Dombroski BA, Naranjo MCD, Daniilidou M, Eiriksdottir G, Mukherjee S, Wallon D, Uphill J, Aspelund T, Cantwell LB, Garzia F, Galimberti D, Hofer E, Butkiewicz M, Fin B, Scarpini E, Sarnowski C, Bush WS, Meslage S, Kornhuber J, White CC, Song Y, Barber RC, Engelborghs S, Sordon S, Voijnovic D, Adams PM, Vandenberghe R, Mayhaus M, Cupples LA, Albert MS, De Deyn PP, Gu W, Himali JJ, Beekly D, Squassina A, Hartmann AM, Orellana A, Blacker D, Rodriguez-Rodriguez E, Lovestone S, Garcia ME, Doody RS, Munoz-Fernandez C, Sussams R, Lin H, Fairchild TJ, Benito YA, Holmes C, Karamujic-Comić H, Frosch MP, Thonberg H, Maier W, Roshchupkin G, Ghetti B, Giedraitis V, Kawalia A, Li S, Huebinger RM, Kilander L, Moebus S, Hernández I, Kamboh MI, Brundin R, Turton J, Yang Q, Katz MJ, Concari L, Lord J, Beiser AS, Keene CD, Helisalmi S, Kloszewska I, Kukull WA, Koivisto AM, Lynch A, Tarraga L, Larson EB, Haapasalo A, Lawlor B, Mosley TH, Lipton RB, Solfrizzi V, Gill M, Longstreth WT Jr, Montine TJ, Frisardi V, Diez-Fairen M, Rivadeneira F, Petersen RC, Deramecourt V, Alvarez I, Salani F, Ciaramella A, Boerwinkle E, Reiman EM, Fievet N, Rotter JI, Reisch JS, Hanon O, Cupidi C, Andre Uitterlinden AG, Royall DR, Dufouil C, Maletta RG, de Rojas I, Sano M, Brice A, Cecchetti R, George-Hyslop PS, Ritchie K, Tsolaki M, Tsuang DW, Dubois B, Craig D, Wu

CK, Soininen H, Avramidou D, Albin RL, Fratiglioni L, Germanou A, Apostolova LG, Keller L, Koutroumani M, Arnold SE, Panza F, Gkatzima O, Asthana S, Hannequin D, Whitehead P, Atwood CS, Caffarra P, Hampel H, Quintela I, Carracedo Á, Lannfelt L, Rubinsztein DC, Barnes LL, Pasquier F, Frölich L, Barral S, McGuinness B, Beach TG, Johnston JA, Becker JT, Passmore P, Bigio EH, Schott JM, Bird TD, Warren JD, Boeve BF, Lupton MK, Bowen JD, Proitsi P, Boxer A, Powell JF, Burke JR, Kauwe JSK, Burns JM, Mancuso M, Buxbaum JD, Bonuccelli U, Cairns NJ, McQuillin A, Cao C, Livingston G, Carlson CS, Bass NJ, Carlsson CM, Hardy J, Carney RM, Bras J, Carrasquillo MM, Guerreiro R, Allen M, Chui HC, Fisher E, Masullo C, Crocco EA, DeCarli C, Bisceglia G, Dick M, Ma L, Duara R, Graff-Radford NR, Evans DA, Hodges A, Faber KM, Scherer M, Fallon KB, Riemenschneider M, Fardo DW, Heun R, Farlow MR, Kölsch H, Ferris S, Leber M, Foroud TM, Heuser I, Galasko DR, Giegling I, Gearing M, Hüll M, Geschwind DH, Gilbert JR, Morris J, Green RC, Mayo K, Growdon JH, Feulner T, Hamilton RL, Harrell LE, Drichel D, Honig LS, Cushion TD, Huentelman MJ, Hollingworth P, Hulette CM, Hyman BT, Marshall R, Jarvik GP, Meggy A, Abner E, Menzies GE, Jin LW, Leonenko G, Real LM, Jun GR, Baldwin CT, Grozeva D, Karydas A, Russo G, Kaye JA, Kim R, Jessen F, Kowall NW, Vellas B, Kramer JH, Vardy E, LaFerla FM, Jöckel KH, Lah JJ, Dichgans M, Leverenz JB, Mann D, Levey AI, Pickering-Brown S, Lieberman AP, Klopp N, Lunetta KL, Wichmann HE, Lyketsos CG, Morgan K, Marson DC, Brown K, Martiniuk F, Medway C, Mash DC, Nöthen MM, Masliah E, Hooper NM, McCormick WC, Daniele A, McCurry SM, Bayer A, McDavid AN, Gallacher J, McKee AC, van den Bussche H, Mesulam M, Brayne C, Miller BL, Riedel-Heller S, Miller CA, Miller JW, Al-Chalabi A, Morris JC, Shaw CE, Myers AJ, Wiltfang J, O'Bryant S, Olichney JM, Alvarez V, Parisi JE, Singleton AB, Paulson HL, Collinge J, Perry WR, Mead S, Peskind E, Cribbs DH, Rossor M, Pierce A, Ryan NS, Poon WW, Nacmias B, Potter H, Sorbi S, Quinn JF, Sacchinelli E, Raj A, Spalletta G, Raskind M, Caltagirone C, Bossù P, Orfei MD, Reisberg B, Clarke R, Reitz C, Smith AD, Ringman JM, Warden D, Roberson ED, Wilcock G, Rogava E, Bruni AC, Rosen HJ, Gallo M, Rosenberg RN, Ben-Shlomo Y, Sager MA, Mecocci P, Saykin AJ, Pastor P, Cuccaro ML, Vance JM, Schneider JA, Schneider LS, Slifer S, Seeley WW, Smith AG, Sonnen JA, Spina S, Stern RA, Swerdlow RH, Tang M, Tanzi RE, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Van Deerlin VM, Van Eldik LJ, Vinters HV, Vonsattel JP, Weintraub S, Welsh-Bohmer KA, Wilhelmsen KC, Williamson J, Wingo TS, Woltjer RL, Wright CB, Yu CE, Yu L, Saba Y, Pilotto A, Bullido MJ, Peters O, Crane PK, Bennett D, Bosco P, Coto E, Boccardi V, De Jager PL, Lleo A, Warner N, Lopez OL, Ingelsson M, Deloukas P, Cruchaga C, Graff C, Gwilliam R, Fornage M, Goate AM, Sanchez-Juan P, Kehoe PG, Amin N, Ertekin-Taner N, Berr C, Debette S, Love S, Launer LJ, Younkin SG, Dartigues JF, Corcoran C, Ikram MA, Dickson DW, Nicolas G, Champion D, Tschanz J, Schmidt H, Hakonarson H, Clarimon J, Munger R, Schmidt R, Farrer LA, Van Broeckhoven C, C O'Donovan M, DeStefano AL, Jones L, Haines JL, Deleuze JF, Owen MJ, Gudnason V, Mayeux R, Escott-Price V, Psaty BM, Ramirez A, Wang LS, Ruiz A, van Duijn CM, Holmans PA, Seshadri S, Williams J, Amouyel P, Schellenberg GD, Lambert JC, Pericak-Vance MA; Alzheimer Disease Genetics Consortium (ADGC); European Alzheimer's Disease Initiative (EADI); Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology Consortium (CHARGE); Genetic and Environmental Risk in AD/Defining Genetic, Polygenic and Environmental Risk for Alzheimer's Disease Consortium (GERAD/PERADES). Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet.* 2019 Mar;51(3):414-430. doi: 10.1038/s41588-019-0358-2. Epub 2019 Feb 28. Erratum in: *Nat Genet.* 2019 Sep;51(9):1423-1424. doi: 10.1038/s41588-019-0495-7. PMID: 30820047; PMCID: PMC6463297.

Kurdyak P, Atwood HL, Stewart BA, Wu CF. Differential physiology and morphology of motor axons to ventral longitudinal muscles in larval *Drosophila*. *J Comp Neurol.* 1994 Dec 15;350(3):463-72. doi: 10.1002/cne.903500310. PMID: 7884051.

Lambert E, Saha O, Soares Landeira B, Melo de Farias AR, Hermant X, Carrier A, Pelletier A, Gadaut J, Davoine L, Dupont C, Amouyel P, Bonnefond A, Lafont F, Abdelfettah F, Verstreken P, Chapuis J, Barois N, Delahaye F, Dermaut B, Lambert JC, Costa MR, Dourlen P. The Alzheimer susceptibility gene BIN1 induces isoform-dependent neurotoxicity through early endosome defects. *Acta Neuropathol Commun.* 2022 Jan 8;10(1):4. doi: 10.1186/s40478-021-01285-5. PMID: 34998435; PMCID: PMC8742943.

Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 30;96(7):3922-7. doi: 10.1073/pnas.96.7.3922. PMID: 10097139; PMCID: PMC22396.

Lahey T, Gorczyca M, Jia XX, Budnik V. The *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg* is required for normal synaptic bouton structure. *Neuron.* 1994 Oct;13(4):823-35. doi: 10.1016/0896-6273(94)90249-6. PMID: 7946331; PMCID: PMC4661177.

Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, Letenneur L, Bettens K, Berr C, Pasquier F, Fiévet N, Barberger-Gateau P, Engelborghs S, De Deyn P, Mateo I, Franck A, Helisalmi S, Porcellini E, Hanon O; European Alzheimer's Disease Initiative Investigators; de Pancorbo MM, Lendon C, Dufouil C, Jaillard C, Leveillard T, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossù P, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Hannequin D, Licastro F, Soininen H, Ritchie K, Blanché H, Dartigues JF, Tzourio C, Gut I, Van Broeckhoven C, Alperovitch A, Lathrop M, Amouyel P. Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009 Oct;41(10):1094-9. doi: 10.1038/ng.439. Epub 2009 Sep 6. PMID: 19734903.

Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, DeStafano AL, Bis JC, Beecham GW, Grenier-Boley B, Russo G, Thorton-Wells TA, Jones N, Smith AV, Chouraki V, Thomas C, Ikram MA, Zelenika D, Vardarajan BN, Kamatani Y, Lin CF, Gerrish A, Schmidt H, Kunkle B, Dunstan ML, Ruiz A, Bihoreau MT, Choi SH, Reitz C, Pasquier F, Cruchaga C, Craig D, Amin N, Berr C, Lopez OL, De Jager PL, Deramecourt V, Johnston JA, Evans D, Lovestone S, Letenneur L, Morón FJ, Rubinsztein DC, Eiriksdottir G, Sleegers K, Goate AM, Fiévet N, Huentelman MW, Gill M, Brown K, Kamboh MI, Keller L, Barberger-Gateau P, McGuinness B, Larson EB, Green R, Myers AJ, Dufouil C, Todd S, Wallon D, Love S, Rogaeva E, Gallacher J, St George-Hyslop P, Clarimon J, Lleo A, Bayer A, Tsuang DW, Yu L, Tsolaki M, Bossù P, Spalletta G, Proitsi P, Collinge J, Sorbi S, Sanchez-Garcia F, Fox NC, Hardy J, Deniz Naranjo MC, Bosco P, Clarke R, Brayne C, Galimberti D, Mancuso M, Matthews F; European Alzheimer's Disease Initiative (EADI); Genetic and Environmental Risk in Alzheimer's Disease; Alzheimer's Disease Genetic Consortium; Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology; Moebus S, Mecocci P, Del Zompo M, Maier W, Hampel H, Pilotto A, Bullido M, Panza F, Caffarra P, Nacmias B, Gilbert JR, Mayhaus M, Lannefelt L, Hakonarson H, Pichler S, Carrasquillo MM, Ingelsson M, Beekly D, Alvarez V, Zou F, Valladares O, Younkin SG, Coto E, Hamilton-Nelson KL, Gu W, Razquin C, Pastor P, Mateo I, Owen MJ, Faber KM, Jonsson PV, Combarros O, O'Donovan MC, Cantwell LB, Soininen H, Blacker D, Mead S, Mosley TH Jr, Bennett DA, Harris TB, Fratiglioni L, Holmes C, de Bruijn RF, Passmore P, Montine TJ, Bettens K, Rotter JI, Brice A, Morgan K, Foroud TM, Kukull WA, Hannequin D, Powell JF, Nalls MA, Ritchie K, Lunetta KL, Kauwe JS, Boerwinkle E, Riemenschneider M, Boada M, Hiltunen M, Martin ER, Schmidt R, Rujescu D, Wang LS, Dartigues JF, Mayeux R, Tzourio C, Hofman A, Nöthen MM, Graff C, Psaty BM, Jones L, Haines JL, Holmans PA, Lathrop M, Pericak-Vance MA, Launer LJ, Farrer LA, van Duijn CM, Van Broeckhoven C, Moskvina V, Seshadri S, Williams J, Schellenberg GD, Amouyel P. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat*

Genet. 2013 Dec;45(12):1452-8. doi: 10.1038/ng.2802. Epub 2013 Oct 27. PMID: 24162737; PMCID: PMC3896259.

Lasorsa A, Malki I, Cantrelle FX, Merzougui H, Boll E, Lambert JC, Landrieu I. Structural Basis of Tau Interaction With BIN1 and Regulation by Tau Phosphorylation. *Front Mol Neurosci*. 2018 Nov 14;11:421. doi: 10.3389/fnmol.2018.00421. PMID: 30487734; PMCID: PMC6246682.

Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, Ochoa GC, Farsad K, Wenk MR, De Camilli P. Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science*. 2002 Aug 16;297(5584):1193-6. doi: 10.1126/science.1071362. PMID: 12183633.

Lee S, Salazar SV, Cox TO, Strittmatter SM. Pyk2 Signaling through Graf1 and RhoA GTPase Is Required for Amyloid- β Oligomer-Triggered Synapse Loss. *J Neurosci*. 2019 Mar 6;39(10):1910-1929. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2983-18.2018. Epub 2019 Jan 9. PMID: 30626696; PMCID: PMC6407289.

Leterrier C. The Axon Initial Segment: An Updated Viewpoint. *J Neurosci*. 2018 Feb 28;38(9):2135-2145. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1922-17.2018. Epub 2018 Jan 29. PMID: 29378864; PMCID: PMC6596274.

Leube RE, Kaiser P, Seiter A, Zimbelmann R, Franke WW, Rehm H, Knaus P, Prior P, Betz H, Reinke H, et al. Synaptophysin: molecular organization and mRNA expression as determined from cloned cDNA. *EMBO J*. 1987 Nov;6(11):3261-8. doi: 10.1002/j.1460-2075.1987.tb02644.x. PMID: 3123215; PMCID: PMC553778.

Lev S, Moreno H, Martinez R, Canoll P, Peles E, Musacchio JM, Plowman GD, Rudy B, Schlessinger J. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature*. 1995 Aug 31;376(6543):737-45. doi: 10.1038/376737a0. PMID: 7544443.

Leventis PA, Chow BM, Stewart BA, Iyengar B, Campos AR, Boulianne GL. Drosophila Amphiphysin is a post-synaptic protein required for normal locomotion but not endocytosis. *Traffic*. 2001 Nov;2(11):839-50. doi: 10.1034/j.1600-0854.2001.21113.x. PMID: 11733051.

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmidt SD, Wang K, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science*. 1995 Aug 18;269(5226):973-7. doi: 10.1126/science.7638622. PMID: 7638622.

Li C, Götz J. Pyk2 is a Novel Tau Tyrosine Kinase that is Regulated by the Tyrosine Kinase Fyn. *J Alzheimers Dis*. 2018;64(1):205-221. doi: 10.3233/JAD-180054. PMID: 29782321; PMCID: PMC6004899.

Li Z, Shue F, Zhao N, Shinohara M, Bu G. APOE2: protective mechanism and therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2020 Nov 4;15(1):63. doi: 10.1186/s13024-020-00413-4. PMID: 33148290; PMCID: PMC7640652.

Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, Bennett ML, Münch AE, Chung WS, Peterson TC, Wilton DK, Frouin A, Napier BA, Panicker N, Kumar M, Buckwalter MS, Rowitch DH, Dawson VL, Dawson TM, Stevens B, Barres BA. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*. 2017 Jan 26;541(7638):481-487. doi: 10.1038/nature21029. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28099414; PMCID: PMC5404890.

Livingston G, Huntley J, Liu KY, Costafreda SG, Selbæk G, Alladi S, Ames D, Banerjee S, Burns A, Brayne C, Fox NC, Ferri CP, Gitlin LN, Howard R, Kales HC, Kivimäki M, Larson EB, Nakasujja N, Rockwood K, Samus Q, Shirai K, Singh-Manoux A, Schneider LS, Walsh S, Yao

Y, Sommerlad A, Mukadam N. Dementia prevention, intervention, and care: 2024 report of the Lancet standing Commission. *Lancet*. 2024 Aug 10;404(10452):572-628. doi: 10.1016/S0140-6736(24)01296-0. Epub 2024 Jul 31. PMID: 39096926.

Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*. 2013 Feb;9(2):106-18. doi: 10.1038/nrneurol.2012.263. Epub 2013 Jan 8. Erratum in: *Nat Rev Neurol*. 2013. doi: 10.1038/nrneurol.2013.32. Liu, Chia-Chan [corrected to Liu, Chia-Chen]. PMID: 23296339; PMCID: PMC3726719.

López-Molina L, Sancho-Balsells A, Al-Massadi O, Montalban E, Alberch J, Arranz B, Girault JA, Giral A. Hippocampal Pyk2 regulates specific social skills: Implications for schizophrenia. *Neurobiol Dis*. 2024 May;194:106487. doi: 10.1016/j.nbd.2024.106487. Epub 2024 Mar 27. PMID: 38552722.

Loving HS, Underbakke ES. Conformational Dynamics of FERM-Mediated Autoinhibition in Pyk2 Tyrosine Kinase. *Biochemistry*. 2019 Sep 10;58(36):3767-3776. doi: 10.1021/acs.biochem.9b00541. Epub 2019 Aug 22. PMID: 31403288.

Lucy Martin. Interaction of Pyk2 and Bin1 Proteins, Both Associated with Genetic Risk Factors for Alzheimer's Disease. *Molecular biology*. Université de Lille, 2025. English. (NNT : 2025ULILS011). (tel-05261952)

Lumsden AL, Mulugeta A, Zhou A, Hyppönen E. Apolipoprotein E (APOE) genotype-associated disease risks: a phenome-wide, registry-based, case-control study utilising the UK Biobank. *EBioMedicine*. 2020 Sep;59:102954. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102954. Epub 2020 Aug 17. PMID: 32818802; PMCID: PMC7452404.

Mao L, Yang L, Tang Q, Samdani S, Zhang G, Wang JQ. The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. *J Neurosci*. 2005 Mar 9;25(10):2741-52. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4360-04.2005. PMID: 15758184; PMCID: PMC6725183.

Marley R, Baines RA. Increased persistent Na⁺ current contributes to seizure in the slamdance bang-sensitive *Drosophila* mutant. *J Neurophysiol*. 2011 Jul;106(1):18-29. doi: 10.1152/jn.00808.2010. Epub 2011 Mar 30. PMID: 21451059; PMCID: PMC3129721.

Marqués G, Bao H, Haerry TE, Shimell MJ, Duchek P, Zhang B, O'Connor MB. The *Drosophila* BMP type II receptor Wishful Thinking regulates neuromuscular synapse morphology and function. *Neuron*. 2002 Feb 14;33(4):529-43. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00595-0. PMID: 11856528.

Masliah E, Mallory M, Hansen L, Alford M, Albright T, DeTeresa R, Terry R, Baudier J, Saitoh T. Patterns of aberrant sprouting in Alzheimer's disease. *Neuron*. 1991 May;6(5):729-39. doi: 10.1016/0896-6273(91)90170-5. PMID: 1827266.

Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Jun;82(12):4245-9. doi: 10.1073/pnas.82.12.4245. PMID: 3159021; PMCID: PMC397973.

Mathew D, Popescu A, Budnik V. *Drosophila* amphiphysin functions during synaptic Fasciclin II membrane cycling. *J Neurosci*. 2003 Nov 19;23(33):10710-6. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-33-10710.2003. PMID: 14627656; PMCID: PMC6740931.

Maure-Blesa L, Carmona-Iragui M, Lott I, Head E, Wisniewski T, Rafii MS, Espinosa J, Flórez J, Mobley WC, Holland A, Strydom A, Zaman S, Fortea J. The history of Down syndrome-

associated Alzheimer's disease; past, present, and future. *Alzheimers Dement*. 2025 Jun;21(6):e70158. doi: 10.1002/alz.70158. PMID: 40469048; PMCID: PMC12138279.

McCabe BD, Marqués G, Haghighi AP, Fetter RD, Crotty ML, Haerry TE, Goodman CS, O'Connor MB. The BMP homolog Gbb provides a retrograde signal that regulates synaptic growth at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuron*. 2003 Jul 17;39(2):241-54. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00426-4. PMID: 12873382.

McMahon HT, Bolshakov VY, Janz R, Hammer RE, Siegelbaum SA, Südhof TC. Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 May 14;93(10):4760-4. doi: 10.1073/pnas.93.10.4760. PMID: 8643476; PMCID: PMC39352.

McMahon HT, Wigge P, Smith C. Clathrin interacts specifically with amphiphysin and is displaced by dynamin. *FEBS Lett*. 1997 Aug 18;413(2):319-22. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00928-9. PMID: 9280305.

McShane R, Westby MJ, Roberts E, Minakaran N, Schneider L, Farrimond LE, Maayan N, Ware J, Debarros J. Memantine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019 Mar 20;3(3):CD003154. doi: 10.1002/14651858.CD003154.pub6. PMID: 30891742; PMCID: PMC6425228.

Meinecke M, Boucrot E, Camdere G, Hon WC, Mittal R, McMahon HT. Cooperative recruitment of dynamin and BIN/amphiphysin/Rvs (BAR) domain-containing proteins leads to GTP-dependent membrane scission. *J Biol Chem*. 2013 Mar 1;288(9):6651-61. doi: 10.1074/jbc.M112.444869. Epub 2013 Jan 7. PMID: 23297414; PMCID: PMC3585104.

Menon KP, Carrillo RA, Zinn K. Development and plasticity of the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2013 Sep-Oct;2(5):647-70. doi: 10.1002/wdev.108. Epub 2013 Feb 5. PMID: 24014452; PMCID: PMC3767937.

Messina S, Onofri F, Bongiorno-Borbone L, Giovedì S, Valtorta F, Girault JA, Benfenati F. Specific interactions of neuronal focal adhesion kinase isoforms with Src kinases and amphiphysin. *J Neurochem*. 2003 Jan;84(2):253-65. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01519.x. PMID: 12558988.

Mhatre SD, Satyasi V, Killen M, Paddock BE, Moir RD, Saunders AJ, Marena DR. Synaptic abnormalities in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Dis Model Mech*. 2014 Mar;7(3):373-85. doi: 10.1242/dmm.012104. Epub 2014 Jan 30. PMID: 24487408; PMCID: PMC3944497.

Miller DL, Ballard SL, Ganetzky B. Analysis of synaptic growth and function in *Drosophila* with an extended larval stage. *J Neurosci*. 2012 Oct 3;32(40):13776-86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0508-12.2012. PMID: 23035089; PMCID: PMC3482831.

Miquel J, P. R. Lundgren & R. Binnard. « Negative geotaxis and mating behavior in control and gamma-irradiated *Drosophila*. » *Drosophila Information Service* (Vol. 48, 1972)

Miyagawa T, Ebinuma I, Morohashi Y, Hori Y, Young Chang M, Hattori H, Maehara T, Yokoshima S, Fukuyama T, Tsuji S, Iwatsubo T, Prendergast GC, Tomita T. BIN1 regulates BACE1 intracellular trafficking and amyloid- β production. *Hum Mol Genet*. 2016 Jul 15;25(14):2948-2958. doi: 10.1093/hmg/ddw146. Epub 2016 May 14. PMID: 27179792.

Montalban E, Al-Massadi O, Sancho-Balsells A, Brito V, de Pins B, Alberch J, Ginés S, Girault JA, Giralt A. Pyk2 in the amygdala modulates chronic stress sequelae via PSD-95-related

micro-structural changes. *Transl Psychiatry*. 2019 Jan 15;9(1):3. doi: 10.1038/s41398-018-0352-y. PMID: 30664624; PMCID: PMC6341095.

Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, Lannfelt L. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nat Genet*. 1992;1(5):345-347. doi:10.1038/ng0892-345. PMID: 1303239.

Muller AJ, Baker JF, DuHadaway JB, Ge K, Farmer G, Donover PS, Meade R, Reid C, Grzanna R, Roach AH, Shah N, Soler AP, Prendergast GC. Targeted disruption of the murine Bin1/Amphiphysin II gene does not disable endocytosis but results in embryonic cardiomyopathy with aberrant myofibril formation. *Mol Cell Biol*. 2003 Jun;23(12):4295-306. doi: 10.1128/MCB.23.12.4295-4306.2003. PMID: 12773571; PMCID: PMC156129.

New insight into how brain cells die in Alzheimer's and FTD, *Nature Communications*. NIH/National Institutes of Neurological Disorders and Stroke, NIH/National Institute of General Medical Sciences. DOI : 10.1038/s41467-017-00922-9

Newman ZL, Hoagland A, Aghi K, Worden K, Levy SL, Son JH, Lee LP, Isacoff EY. Input-Specific Plasticity and Homeostasis at the *Drosophila* Larval Neuromuscular Junction. *Neuron*. 2017 Mar 22;93(6):1388-1404.e10. doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.028. Epub 2017 Mar 9. PMID: 28285823; PMCID: PMC5464967.

Nicot AS, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Pettersson C, Iwarsson E, Kingston H, Garnier JM, Biancalana V, Oldfors A, Mandel JL, Laporte J. Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet*. 2007 Sep;39(9):1134-9. doi: 10.1038/ng2086. Epub 2007 Aug 5. PMID: 17676042.

Noble W, Hanger DP, Miller CC, Lovestone S. The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases. *Front Neurol*. 2013 Jul 1;4:83. doi: 10.3389/fneur.2013.00083. PMID: 23847585; PMCID: PMC3696910.

Nucci D, Sommariva A, Degoni LM, Gallo G, Mancarella M, Natarelli F, Savoia A, Catalini A, Ferranti R, Pregliasco FE, Castaldi S, Gianfredi V. Association between Mediterranean diet and dementia and Alzheimer disease: a systematic review with meta-analysis. *Aging Clin Exp Res*. 2024 Mar 22;36(1):77. doi: 10.1007/s40520-024-02718-6. PMID: 38519775; PMCID: PMC10959819.

Ossenkoppele R, Pijnenburg YA, Perry DC, Cohn-Sheehy BI, Scheltens NM, Vogel JW, Kramer JH, van der Vlies AE, La Joie R, Rosen HJ, van der Flier WM, Grinberg LT, Rozemuller AJ, Huang EJ, van Berckel BN, Miller BL, Barkhof F, Jagust WJ, Scheltens P, Seeley WW, Rabinovici GD. The behavioural/dysexecutive variant of Alzheimer's disease: clinical, neuroimaging and pathological features. *Brain*. 2015 Sep;138(Pt 9):2732-49. doi: 10.1093/brain/awv191. Epub 2015 Jul 2. PMID: 26141491; PMCID: PMC4623840.

Osterwalder T, Yoon KS, White BH, Keshishian H. A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Oct 23;98(22):12596-601. doi: 10.1073/pnas.221303298. PMID: 11675495; PMCID: PMC60099.

Packard M, Koo ES, Gorczyca M, Sharpe J, Cumberledge S, Budnik V. The *Drosophila* Wnt, wingless, provides an essential signal for pre- and postsynaptic differentiation. *Cell*. 2002 Nov 1;111(3):319-30. doi: 10.1016/s0092-8674(02)01047-4. PMID: 12419243; PMCID: PMC3499980.

Palmer RH, Fessler LI, Edeen PT, Madigan SJ, McKeown M, Hunter T. DFak56 is a novel *Drosophila melanogaster* focal adhesion kinase. *J Biol Chem*. 1999 Dec 10;274(50):35621-9. doi: 10.1074/jbc.274.50.35621. PMID: 10585440; PMCID: PMC1975812.

Pant S, Sharma M, Patel K, Caplan S, Carr CM, Grant BD. AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd1 in endocytic recycling. *Nat Cell Biol.* 2009 Dec;11(12):1399-410. doi: 10.1038/ncb1986. Epub 2009 Nov 15. PMID: 19915558; PMCID: PMC2788952.

Pantazis A, Segaran A, Liu CH, Nikolaev A, Rister J, Thum AS, Roeder T, Semenov E, Juusola M, Hardie RC. Distinct roles for two histamine receptors (hclA and hclB) at the Drosophila photoreceptor synapse. *J Neurosci.* 2008 Jul 16;28(29):7250-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1654-08.2008. PMID: 18632929; PMCID: PMC6670387.

Pavlidis P, Tanouye MA. Seizures and failures in the giant fiber pathway of Drosophila bang-sensitive paralytic mutants. *J Neurosci.* 1995 Aug;15(8):5810-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-08-05810.1995. PMID: 7643221; PMCID: PMC6577637.

Pedditz E, Peters R, Beckett N. The risk of overweight/obesity in mid-life and late life for the development of dementia: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Age Ageing.* 2016 Jan;45(1):14-21. doi: 10.1093/ageing/afv151. Erratum in: *Age Ageing.* 2016 Sep;45(5):740. doi: 10.1093/ageing/afw095. PMID: 26764391.

Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ, Evans PR, McMahon HT. BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science.* 2004 Jan 23;303(5657):495-9. doi: 10.1126/science.1092586. Epub 2003 Nov 26. PMID: 14645856.

de Pins B, Mendes T, Giralt A, Girault JA. The Non-receptor Tyrosine Kinase Pyk2 in Brain Function and Neurological and Psychiatric Diseases. *Front Synaptic Neurosci.* 2021 Oct 6;13:749001. doi: 10.3389/fnsyn.2021.749001. PMID: 34690733; PMCID: PMC8527176.

Ponnusamy M, Wang S, Yuksel M, Hansen MT, Blazier DM, McMillan JD, Zhang X, Dammer EB, Collier L, Thinakaran G. Loss of forebrain BIN1 attenuates hippocampal pathology and neuroinflammation in a tauopathy model. *Brain.* 2023 Apr 19;146(4):1561-1579. doi: 10.1093/brain/awac318. PMID: 36059072; PMCID: PMC10319775.

Pooler AM, Phillips EC, Lau DH, Noble W, Hanger DP. Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO Rep.* 2013 Apr;14(4):389-94. doi: 10.1038/embor.2013.15. Epub 2013 Feb 15. PMID: 23412472; PMCID: PMC3615658.

Pottier C, Hannequin D, Coutant S, Rovelet-Lecrux A, Wallon D, Rousseau S, Legallic S, Paquet C, Bombois S, Pariente J, Thomas-Anterion C, Michon A, Croisile B, Etcharry-Bouyx F, Berr C, Dartigues JF, Amouyel P, Dauchel H, Boutoleau-Bretonnière C, Thauvin C, Frebourg T, Lambert JC, Campion D; PHRC GMAJ Collaborators. High frequency of potentially pathogenic SORL1 mutations in autosomal dominant early-onset Alzheimer disease. *Mol Psychiatry.* 2012 Sep;17(9):875-9. doi: 10.1038/mp.2012.15. Epub 2012 Apr 3. PMID: 22472873.

Potter CJ, Tasic B, Russler EV, Liang L, Luo L. The Q system: a repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. *Cell.* 2010 Apr 30;141(3):536-48. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.025. PMID: 20434990; PMCID: PMC2883883.

Prokic I, Cowling BS, Laporte J. Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J Mol Med (Berl).* 2014 May;92(5):453-63. doi: 10.1007/s00109-014-1138-1. Epub 2014 Mar 5. PMID: 24590001.

Prokic I, Cowling BS, Kutchukian C, Kretz C, Tasfaout H, Gache V, Hergueux J, Wendling O, Ferry A, Toussaint A, Gavriilidis C, Nattarayan V, Koch C, Lainé J, Combe R, Tiret L, Jacquemond V, Pilot-Storck F, Laporte J. Differential physiological roles for BIN1 isoforms in

skeletal muscle development, function and regeneration. *Dis Model Mech*. 2020 Nov 24;13(11):dmm044354. doi: 10.1242/dmm.044354. PMID: 32994313; PMCID: PMC7710016.

Ramachandran P, Budnik V. Dissection of *Drosophila* larval body-wall muscles. *Cold Spring Harb Protoc*. 2010 Aug 1;2010(8):pdb.prot5469. doi: 10.1101/pdb.prot5469. PMID: 20679378.

Ramjaun AR, Micheva KD, Bouchelet I, McPherson PS. Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *J Biol Chem*. 1997 Jun 27;272(26):16700-6. doi: 10.1074/jbc.272.26.16700. PMID: 9195986.

Ramjaun AR, McPherson PS. Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *J Neurochem*. 1998 Jun;70(6):2369-76. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.70062369.x. PMID: 9603201.

Razzaq A, Robinson IM, McMahon HT, Skepper JN, Su Y, Zelhof AC, Jackson AP, Gay NJ, O'Kane CJ. Amphiphysin is necessary for organization of the excitation-contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev*. 2001 Nov 15;15(22):2967-79. doi: 10.1101/gad.207801. PMID: 11711432; PMCID: PMC312829.

Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*. 2001 Jun;11(6):1114-25. doi: 10.1101/gr.169101. PMID: 11381037; PMCID: PMC311089.

Ribeiro I, Yuan L, Tanentzapf G, Dowling JJ, Kiger A. Phosphoinositide regulation of integrin trafficking required for muscle attachment and maintenance. *PLoS Genet*. 2011 Feb 10;7(2):e1001295. doi: 10.1371/journal.pgen.1001295. PMID: 21347281; PMCID: PMC3037412.

Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*. 2006;38(1):24-26. doi:10.1038/ng1718. PMID: 16369530.

Saha O, Melo de Farias AR, Pelletier A, Siedlecki-Wullich D, Landeira BS, Gadaut J, Carrier A, Vreulx AC, Guyot K, Shen Y, Bonnefond A, Amouyel P, Tcw J, Kilinc D, Queiroz CM, Delahaye F, Lambert JC, Costa MR. The Alzheimer's disease risk gene BIN1 regulates activity-dependent gene expression in human-induced glutamatergic neurons. *Mol Psychiatry*. 2024 Sep;29(9):2634-2646. doi: 10.1038/s41380-024-02502-y. Epub 2024 Mar 22. PMID: 38514804; PMCID: PMC11420064.

Saheki Y, De Camilli P. Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Sep 1;4(9):a005645. doi: 10.1101/cshperspect.a005645. PMID: 22763746; PMCID: PMC3428771.

Sakamuro D, Elliott KJ, Wechsler-Reya R, Prendergast GC. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat Genet*. 1996 Sep;14(1):69-77. doi: 10.1038/ng0996-69. PMID: 8782822.

Salazar SV, Cox TO, Lee S, Brody AH, Chyung AS, Haas LT, Strittmatter SM. Alzheimer's Disease Risk Factor Pyk2 Mediates Amyloid- β -Induced Synaptic Dysfunction and Loss. *J Neurosci*. 2019 Jan 23;39(4):758-772. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1873-18.2018. Epub 2018 Dec 5. PMID: 30518596; PMCID: PMC6343652.

Salvadó G, Grothe MJ, Groot C, Moscoso A, Schöll M, Gispert JD, Ossenkoppele R; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Differential associations of APOE- ϵ 2 and APOE-

$\epsilon 4$ alleles with PET-measured amyloid- β and tau deposition in older individuals without dementia. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021 Jul;48(7):2212-2224. doi: 10.1007/s00259-021-05192-8. Epub 2021 Feb 1. PMID: 33521872; PMCID: PMC8175302.

Sartori M, Mendes T, Desai S, Lasorsa A, Herledan A, Malmanche N, Mäkinen P, Marttinen M, Malki I, Chapuis J, Flaig A, Vreulx AC, Ciancia M, Amouyel P, Leroux F, Déprez B, Cantrelle FX, Maréchal D, Pradier L, Hiltunen M, Landrieu I, Kilinc D, Herault Y, Laporte J, Lambert JC. BIN1 recovers tauopathy-induced long-term memory deficits in mice and interacts with Tau through Thr³⁴⁸ phosphorylation. *Acta Neuropathol*. 2019 Oct;138(4):631-652. doi: 10.1007/s00401-019-02017-9. Epub 2019 May 7. PMID: 31065832; PMCID: PMC6778065.

Sasmita AO. Current viral-mediated gene transfer research for treatment of Alzheimer's disease. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2019 Apr;35(1):26-45. doi: 10.1080/02648725.2018.1523521. Epub 2018 Oct 14. PMID: 30317930.

Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L, Nemens E, White JA, Bonnycastle L, Weber JL, Alonso ME, et al. Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*. 1992 Oct 23;258(5082):668-71. doi: 10.1126/science.1411576. PMID: 1411576.

Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*. 1996;2(8):864-870. doi:10.1038/nm0896-864. PMID: 8705854.

Schürmann B, Bermingham DP, Kopeikina KJ, Myczek K, Yoon S, Horan KE, Kelly CJ, Martinde-Saavedra MD, Forrest MP, Fawcett-Patel JM, Smith KR, Gao R, Bach A, Burette AC, Rappoport JZ, Weinberg RJ, Martina M, Penzes P. A novel role for the late-onset Alzheimer's disease (LOAD)-associated protein Bin1 in regulating postsynaptic trafficking and glutamatergic signaling. *Mol Psychiatry*. 2020 Sep;25(9):2000-2016. doi: 10.1038/s41380-019-0407-3. Epub 2019 Apr 9. PMID: 30967682; PMCID: PMC6785379.

Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*. 2002 Oct 25;298(5594):789-91. doi: 10.1126/science.1074069. PMID: 12399581.

Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*. 2016;8(6):595-608. doi:10.15252/emmm.201606210. PMID: 27025652.

Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V, Boada M, Bis JC, Smith AV, Carassquillo MM, Lambert JC, Harold D, Schrijvers EM, Ramirez-Lorca R, Debette S, Longstreth WT Jr, Janssens AC, Pankratz VS, Dartigues JF, Hollingworth P, Aspelund T, Hernandez I, Beiser A, Kuller LH, Koudstaal PJ, Dickson DW, Tzourio C, Abraham R, Antunez C, Du Y, Rotter JI, Aulchenko YS, Harris TB, Petersen RC, Berr C, Owen MJ, Lopez-Arrieta J, Varadarajan BN, Becker JT, Rivadeneira F, Nalls MA, Graff-Radford NR, Campion D, Auerbach S, Rice K, Hofman A, Jonsson PV, Schmidt H, Lathrop M, Mosley TH, Au R, Psaty BM, Uitterlinden AG, Farrer LA, Lumley T, Ruiz A, Williams J, Amouyel P, Younkin SG, Wolf PA, Launer LJ, Lopez OL, van Duijn CM, Breteler MM; CHARGE Consortium; GERAD1 Consortium; EADI1 Consortium. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*. 2010 May 12;303(18):1832-40. doi: 10.1001/jama.2010.574. PMID: 20460622; PMCID: PMC2989531.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL, Selkoe DJ. Amyloid-beta protein

dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med.* 2008 Aug;14(8):837-42. doi: 10.1038/nm1782. Epub 2008 Jun 22. PMID: 18568035; PMCID: PMC2772133.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, Da Silva HA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1995 Jun 29;375(6534):754-60. doi: 10.1038/375754a0. PMID: 7596406.

Shi CS, Sinnarajah S, Cho H, Kozasa T, Kehrl JH. G13alpha-mediated PYK2 activation. PYK2 is a mediator of G13alpha -induced serum response element-dependent transcription. *J Biol Chem.* 2000 Aug 11;275(32):24470-6. doi: 10.1074/jbc.M908449199. PMID: 10821841.

Shi L, Chen SJ, Ma MY, Bao YP, Han Y, Wang YM, Shi J, Vitiello MV, Lu L. Sleep disturbances increase the risk of dementia: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev.* 2018 Aug;40:4-16. doi: 10.1016/j.smrv.2017.06.010. Epub 2017 Jul 6. PMID: 28890168.

Shi Y, Yamada K, Liddel SA, Smith ST, Zhao L, Luo W, Tsai RM, Spina S, Grinberg LT, Rojas JC, Gallardo G, Wang K, Roh J, Robinson G, Finn MB, Jiang H, Sullivan PM, Baufeld C, Wood MW, Sutphen C, McCue L, Xiong C, Del-Aguila JL, Morris JC, Cruchaga C; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative; Fagan AM, Miller BL, Boxer AL, Seeley WW, Butovsky O, Barres BA, Paul SM, Holtzman DM. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature.* 2017 Sep 28;549(7673):523-527. doi: 10.1038/nature24016. Epub 2017 Sep 20. PMID: 28959956; PMCID: PMC5641217.

Shiraishi R, Tamura T, Sone M, Okazawa H. Systematic analysis of fly models with multiple drivers reveals different effects of ataxin-1 and huntingtin in neuron subtype-specific expression. *PLoS One.* 2014 Dec 31;9(12):e116567. doi: 10.1371/journal.pone.0116567. PMID: 25551764; PMCID: PMC4281079.

Shobab LA, Hsiung GY, Feldman HH. Cholesterol in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2005 Dec;4(12):841-52. doi: 10.1016/S1474-4422(05)70248-9. Erratum in: *Lancet Neurol.* 2006 Jan;5(1):21. PMID: 16297842.

Sims R, van der Lee SJ, Naj AC, Bellenguez C, Badarinarayan N, Jakobsdottir J, Kunkle BW, Boland A, Raybould R, Bis JC, Martin ER, Grenier-Boley B, Heilmann-Heimbach S, Chouraki V, Kuzma AB, Sleegers K, Vronskaya M, Ruiz A, Graham RR, Olaso R, Hoffmann P, Grove ML, Vardarajan BN, Hiltunen M, Nöthen MM, White CC, Hamilton-Nelson KL, Epelbaum J, Maier W, Choi SH, Beecham GW, Dulary C, Herms S, Smith AV, Funk CC, Derbois C, Forstner AJ, Ahmad S, Li H, Bacq D, Harold D, Satizabal CL, Valladares O, Squassina A, Thomas R, Brody JA, Qu L, Sánchez-Juan P, Morgan T, Wolters FJ, Zhao Y, Garcia FS, Denning N, Fornage M, Malamon J, Naranjo MCD, Majounie E, Mosley TH, Dombroski B, Wallon D, Lupton MK, Dupuis J, Whitehead P, Fratiglioni L, Medway C, Jian X, Mukherjee S, Keller L, Brown K, Lin H, Cantwell LB, Panza F, McGuinness B, Moreno-Grau S, Burgess JD, Solfrizzi V, Proitsi P, Adams HH, Allen M, Seripa D, Pastor P, Cupples LA, Price ND, Hannequin D, Frank-García A, Levy D, Chakrabarty P, Caffarra P, Giegling I, Beiser AS, Giedraitis V, Hampel H, Garcia ME, Wang X, Lannfelt L, Mecocci P, Eiriksdottir G, Crane PK, Pasquier F, Boccardi V, Henández I, Barber RC, Scherer M, Tarraga L, Adams PM, Leber M, Chen Y, Albert MS, Riedel-Heller S, Emilsson V, Beekly D, Braae A, Schmidt R, Blacker D, Masullo C, Schmidt H, Doody RS, Spalletta G, Longstreth WT Jr, Fairchild TJ, Bossù P, Lopez OL, Frosch MP, Sacchinelli E, Ghetti B, Yang Q, Huebinger RM, Jessen F, Li S, Kamboh MI, Morris J, Sotolongo-Grau O, Katz MJ, Corcoran C, Dunstan M, Braddel A, Thomas C, Meggy A, Marshall

R, Gerrish A, Chapman J, Aguilar M, Taylor S, Hill M, Fairén MD, Hodges A, Vellas B, Soininen H, Kloszewska I, Daniilidou M, Uphill J, Patel Y, Hughes JT, Lord J, Turton J, Hartmann AM, Cecchetti R, Fenoglio C, Serpente M, Arcaro M, Caltagirone C, Orfei MD, Ciaramella A, Pichler S, Mayhaus M, Gu W, Lleó A, Fortea J, Blesa R, Barber IS, Brookes K, Cupidi C, Maletta RG, Carrell D, Sorbi S, Moebus S, Urbano M, Pilotto A, Kornhuber J, Bosco P, Todd S, Craig D, Johnston J, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Fox NC, Hardy J; ARUK Consortium; Albin RL, Apostolova LG, Arnold SE, Asthana S, Atwood CS, Baldwin CT, Barnes LL, Barral S, Beach TG, Becker JT, Bigio EH, Bird TD, Boeve BF, Bowen JD, Boxer A, Burke JR, Burns JM, Buxbaum JD, Cairns NJ, Cao C, Carlson CS, Carlsson CM, Carney RM, Carrasquillo MM, Carroll SL, Diaz CC, Chui HC, Clark DG, Cribbs DH, Crocco EA, DeCarli C, Dick M, Duara R, Evans DA, Faber KM, Fallon KB, Fardo DW, Farlow MR, Ferris S, Foroud TM, Galasko DR, Gearing M, Geschwind DH, Gilbert JR, Graff-Radford NR, Green RC, Growdon JH, Hamilton RL, Harrell LE, Honig LS, Huentelman MJ, Hulette CM, Hyman BT, Jarvik GP, Abner E, Jin LW, Jun G, Karydas A, Kaye JA, Kim R, Kowall NW, Kramer JH, LaFerla FM, Lah JJ, Leverenz JB, Levey AI, Li G, Lieberman AP, Lunetta KL, Lyketsos CG, Marson DC, Martiniuk F, Mash DC, Masliah E, McCormick WC, McCurry SM, McDavid AN, McKee AC, Mesulam M, Miller BL, Miller CA, Miller JW, Morris JC, Murrell JR, Myers AJ, O'Bryant S, Olichney JM, Pankratz VS, Parisi JE, Paulson HL, Perry W, Peskind E, Pierce A, Poon WW, Potter H, Quinn JF, Raj A, Raskind M, Reisberg B, Reitz C, Ringman JM, Roberson ED, Rogaeva E, Rosen HJ, Rosenberg RN, Sager MA, Saykin AJ, Schneider JA, Schneider LS, Seeley WW, Smith AG, Sonnen JA, Spina S, Stern RA, Swerdlow RH, Tanzi RE, Thornton-Wells TA, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Van Deerlin VM, Van Eldik LJ, Vinters HV, Vonsattel JP, Weintraub S, Welsh-Bohmer KA, Wilhelmsen KC, Williamson J, Wingo TS, Woltjer RL, Wright CB, Yu CE, Yu L, Garzia F, Golamaully F, Septier G, Engelborghs S, Vandenberghe R, De Deyn PP, Fernandez CM, Benito YA, Thonberg H, Forsell C, Lilius L, Kinhult-Stählbom A, Kilander L, Brundin R, Concaro L, Helisalmi S, Koivisto AM, Haapasalo A, Dermecourt V, Fievet N, Hanon O, Dufouil C, Brice A, Ritchie K, Dubois B, Himali JJ, Keene CD, Tschanz J, Fitzpatrick AL, Kukull WA, Norton M, Aspelund T, Larson EB, Munger R, Rotter JI, Lipton RB, Bullido MJ, Hofman A, Montine TJ, Coto E, Boerwinkle E, Petersen RC, Alvarez V, Rivadeneira F, Reiman EM, Gallo M, O'Donnell CJ, Reisch JS, Bruni AC, Royall DR, Dichgans M, Sano M, Galimberti D, St George-Hyslop P, Scarpini E, Tsuang DW, Mancuso M, Bonuccelli U, Winslow AR, Daniele A, Wu CK; GERAD/PERADES, CHARGE, ADGC, EADI; Peters O, Nacmias B, Riemenschneider M, Heun R, Brayne C, Rubinsztein DC, Bras J, Guerreiro R, Al-Chalabi A, Shaw CE, Collinge J, Mann D, Tsolaki M, Clarimón J, Sussams R, Lovestone S, O'Donovan MC, Owen MJ, Behrens TW, Mead S, Goate AM, Uitterlinden AG, Holmes C, Cruchaga C, Ingelsson M, Bennett DA, Powell J, Golde TE, Graff C, De Jager PL, Morgan K, Ertekin-Taner N, Combarros O, Psaty BM, Passmore P, Younkin SG, Berr C, Gudnason V, Rujescu D, Dickson DW, Dartigues JF, DeStefano AL, Ortega-Cubero S, Hakonarson H, Campion D, Boada M, Kauwe JK, Farrer LA, Van Broeckhoven C, Ikram MA, Jones L, Haines JL, Tzourio C, Launer LJ, Escott-Price V, Mayeux R, Deleuze JF, Amin N, Holmans PA, Pericak-Vance MA, Amouyel P, van Duijn CM, Ramirez A, Wang LS, Lambert JC, Seshadri S, Williams J, Schellenberg GD. Rare coding variants in *PLCG2*, *ABI3*, and *TREM2* implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2017 Sep;49(9):1373-1384. doi: 10.1038/ng.3916. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28714976; PMCID: PMC5669039.

Slepnev VI, Ochoa GC, Butler MH, De Camilli P. Tandem arrangement of the clathrin and AP-2 binding domains in amphiphysin 1 and disruption of clathrin coat function by amphiphysin fragments comprising these sites. *J Biol Chem.* 2000 Jun 9;275(23):17583-9. doi: 10.1074/jbc.M910430199. PMID: 10748223.

Silva-Rojas R, Nattarayan V, Jaque-Fernandez F, Gomez-Oca R, Menuet A, Reiss D, Goret M, Messaddeq N, Lionello VM, Kretz C, Cowling BS, Jacquemond V, Laporte J. Mice with

muscle-specific deletion of Bin1 recapitulate centronuclear myopathy and acute downregulation of dynamin 2 improves their phenotypes. *Mol Ther*. 2022 Feb 2;30(2):868-880. doi: 10.1016/j.ymthe.2021.08.006. Epub 2021 Aug 8. PMID: 34371181; PMCID: PMC8821932.

Sottejeau Y, Bretteville A, Cantrelle FX, Malmanche N, Demiaute F, Mendes T, Delay C, Alves Dos Alves H, Flaig A, Davies P, Dourlen P, Dermaut B, Laporte J, Amouyel P, Lippens G, Chapuis J, Landrieu I, Lambert JC. Tau phosphorylation regulates the interaction between BIN1's SH3 domain and Tau's proline-rich domain. *Acta Neuropathol Commun*. 2015 Sep 23;3:58. doi: 10.1186/s40478-015-0237-8. PMID: 26395440; PMCID: PMC4580349.

Steinberg S, Stefansson H, Jonsson T, Johannsdottir H, Ingason A, Helgason H, Sulem P, Magnusson OT, Gudjonsson SA, Unnsteinsdottir U, Kong A, Helisalmi S, Soininen H, Lah JJ; DemGene; Aarsland D, Fladby T, Ulstein ID, Djurovic S, Sando SB, White LR, Knudsen GP, Westlye LT, Selbæk G, Giegling I, Hampel H, Hiltunen M, Levey AI, Andreassen OA, Rujescu D, Jonsson PV, Bjornsson S, Snaedal J, Stefansson K. Loss-of-function variants in ABCA7 confer risk of Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2015 May;47(5):445-7. doi: 10.1038/ng.3246. Epub 2015 Mar 25. PMID: 25807283.

Stern Y. Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2012 Nov;11(11):1006-12. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70191-6. PMID: 23079557; PMCID: PMC3507991.

Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD. 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 U S A*. 1993 Mar 1;90(5):1977-81. doi: 10.1073/pnas.90.5.1977. PMID: 8446617; PMCID: PMC46003.

De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*. 1999 Apr 8;398(6727):518-22. doi: 10.1038/19083. PMID: 10206645.

Südhof TC, Baumert M, Perin MS, Jahn R. A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to *Drosophila*. *Neuron*. 1989 May;2(5):1475-81. doi: 10.1016/0896-6273(89)90193-1. PMID: 2560644.

Sudwarts A, Ramesha S, Gao T, Ponnusamy M, Wang S, Hansen M, Kozlova A, Bitarafan S, Kumar P, Beaulieu-Abdelahad D, Zhang X, Collier L, Szekeres C, Wood LB, Duan J, Thinakaran G, Rangaraju S. BIN1 is a key regulator of proinflammatory and neurodegeneration-related activation in microglia. *Mol Neurodegener*. 2022 May 7;17(1):33. doi: 10.1186/s13024-022-00535-x. PMID: 35526014; PMCID: PMC9077874.

Sweeney ST, Davis GW. Unrestricted synaptic growth in spinster-a late endosomal protein implicated in TGF-beta-mediated synaptic growth regulation. *Neuron*. 2002 Oct 24;36(3):403-16. doi: 10.1016/s0896-6273(02)01014-0. PMID: 12408844.

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*. 1997 Aug;56(8):933-44. doi: 10.1097/00005072-199708000-00011. PMID: 9258263.

Taddei RN, E Duff K. Synapse vulnerability and resilience underlying Alzheimer's disease. *EBioMedicine*. 2025 Feb;112:105557. doi: 10.1016/j.ebiom.2025.105557. Epub 2025 Jan 31. PMID: 39891995; PMCID: PMC11833146.

Takei K, Slepnev VI, Haucke V, De Camilli P. Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol.* 1999 May;1(1):33-9. doi: 10.1038/9004. PMID: 10559861.

Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S, Dziewczapolski G, Nakamura T, Cao G, Pratt AE, Kang YJ, Tu S, Molokanova E, McKercher SR, Hires SA, Sason H, Stouffer DG, Buczynski MW, Solomon JP, Michael S, Powers ET, Kelly JW, Roberts A, Tong G, Fang-Newmeyer T, Parker J, Holland EA, Zhang D, Nakanishi N, Chen HS, Wolosker H, Wang Y, Parsons LH, Ambasadhan R, Masliah E, Heinemann SF, Piña-Crespo JC, Lipton SA. A β induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jul 2;110(27):E2518-27. doi: 10.1073/pnas.1306832110. Epub 2013 Jun 17. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Aug 13;110(33):13691. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Jul 7;112(27):E3630. doi: 10.1073/pnas.1511280112. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Jul 14;112(28):E3751-2. doi: 10.1073/pnas.1511282112. PMID: 23776240; PMCID: PMC3704025.

Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol.* 1991 Oct;30(4):572-80. doi: 10.1002/ana.410300410. PMID: 1789684.

Thomas U, Kobler O, Gundelfinger ED. The *Drosophila* larval neuromuscular junction as a model for scaffold complexes at glutamatergic synapses: benefits and limitations. *J Neurogenet.* 2010 Sep;24(3):109-19. doi: 10.3109/01677063.2010.493589. PMID: 20615090.

Tian D, Litvak V, Lev S. Cerebral ischemia and seizures induce tyrosine phosphorylation of PYK2 in neurons and microglial cells. *J Neurosci.* 2000 Sep 1;20(17):6478-87. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-17-06478.2000. PMID: 10964954; PMCID: PMC6772975.

Tsai PI, Kao HH, Grabbe C, Lee YT, Ghose A, Lai TT, Peng KP, Van Vactor D, Palmer RH, Chen RH, Yeh SR, Chien CT. Fak56 functions downstream of integrin alphaPS3betanu and suppresses MAPK activation in neuromuscular junction growth. *Neural Dev.* 2008 Oct 16;3:26. doi: 10.1186/1749-8104-3-26. PMID: 18925939; PMCID: PMC2576229.

Tsai PI, Wang M, Kao HH, Cheng YJ, Walker JA, Chen RH, Chien CT. Neurofibromin mediates FAK signaling in confining synapse growth at *Drosophila* neuromuscular junctions. *J Neurosci.* 2012 Nov 21;32(47):16971-81. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1756-12.2012. PMID: 23175848; PMCID: PMC6621776.

Tully T, Quinn WG. Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A.* 1985 Sep;157(2):263-77. doi: 10.1007/BF01350033. PMID: 3939242.

Ubelmann F, Burrinha T, Salavessa L, Gomes R, Ferreira C, Moreno N, Guimas Almeida C. Bin1 and CD2AP polarise the endocytic generation of beta-amyloid. *EMBO Rep.* 2017 Jan;18(1):102-122. doi: 10.15252/embr.201642738. Epub 2016 Nov 28. PMID: 27895104; PMCID: PMC5210085.

Ueda A, Grabbe C, Lee J, Lee J, Palmer RH, Wu CF. Mutation of *Drosophila* focal adhesion kinase induces bang-sensitive behavior and disrupts glial function, axonal conduction and synaptic transmission. *Eur J Neurosci.* 2008 Jun;27(11):2860-70. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06252.x. Epub 2008 Jun 6. PMID: 18540882; PMCID: PMC2671471.

Ueda A, O'Harrow TCDG, Xing X, Ehaideb S, Manak JR, Wu CF. Abnormal larval neuromuscular junction morphology and physiology in *Drosophila* prickly isoform mutants with

known axonal transport defects and adult seizure behavior. *J Neurogenet.* 2022 Mar-Jun;36(2-3):65-73. doi: 10.1080/01677063.2022.2093353. Epub 2022 Jul 1. PMID: 35775303.

Ullrich O, Reinsch S, Urbé S, Zerial M, Parton RG. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J Cell Biol.* 1996 Nov;135(4):913-24. doi: 10.1083/jcb.135.4.913. PMID: 8922376; PMCID: PMC2133374.

Vanarotti MS, Miller DJ, Guibao CD, Nourse A, Zheng JJ. Structural and mechanistic insights into the interaction between Pyk2 and paxillin LD motifs. *J Mol Biol.* 2014 Dec 12;426(24):3985-4001. doi: 10.1016/j.jmb.2014.08.014. Epub 2014 Aug 29. PMID: 25174335; PMCID: PMC4267758.

Vasin A, Zueva L, Torrez C, Volfson D, Littleton JT, Bykhovskaia M. Synapsin regulates activity-dependent outgrowth of synaptic boutons at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurosci.* 2014 Aug 6;34(32):10554-63. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5074-13.2014. PMID: 25100589; PMCID: PMC4200108.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science.* 1999 Oct 22;286(5440):735-41. doi: 10.1126/science.286.5440.735. PMID: 10531052.

in 't Veld BA, Launer LJ, Hoes AW, Ott A, Hofman A, Breteler MM, Stricker BH. NSAIDs and incident Alzheimer's disease. The Rotterdam Study. *Neurobiol Aging.* 1998 Nov-Dec;19(6):607-11. doi: 10.1016/s0197-4580(98)00096-7. PMID: 10192221.

Verstraelen P, Van Dyck M, Verschuuren M, Kashikar ND, Nuydens R, Timmermans JP, De Vos WH. Image-Based Profiling of Synaptic Connectivity in Primary Neuronal Cell Culture. *Front Neurosci.* 2018 Jun 26;12:389. doi: 10.3389/fnins.2018.00389. PMID: 29997468; PMCID: PMC6028601.

Videliér M, Rundle HD, Careau V. Sex-Specific Among-Individual Covariation in Locomotor Activity and Resting Metabolic Rate in *Drosophila melanogaster*. *Am Nat.* 2019 Dec;194(6):E164-E176. doi: 10.1086/705678. Epub 2019 Oct 8. PMID: 31738101.

Vilinsky I, Johnson KG. Electroretinograms in *Drosophila*: a robust and genetically accessible electrophysiological system for the undergraduate laboratory. *J Undergrad Neurosci Educ.* 2012 Fall;11(1):A149-57. Epub 2012 Oct 15. PMID: 23494679; PMCID: PMC3592731.

Wagh DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, Dürrbeck H, Buchner S, Dabauvalle MC, Schmidt M, Qin G, Wichmann C, Kittel R, Sigrist SJ, Buchner E. Bruchpilot, a protein with homology to ELKS/CAST, is required for structural integrity and function of synaptic active zones in *Drosophila*. *Neuron.* 2006 Mar 16;49(6):833-44. doi: 10.1016/j.neuron.2006.02.008. Erratum in: *Neuron.* 2006 Jul 20;51(2):275. PMID: 16543132.

Waite LM. New and emerging drug therapies for Alzheimer disease. *Aust Prescr.* 2024 Jun;47(3):75-79. doi: 10.18773/austprescr.2024.021. PMID: 38962384; PMCID: PMC11216914.

Wan HI, DiAntonio A, Fetter RD, Bergstrom K, Strauss R, Goodman CS. Highwire regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron.* 2000 May;26(2):313-29. doi: 10.1016/s0896-6273(00)81166-6. PMID: 10839352.

Wang WY, Tan MS, Yu JT, Tan L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med.* 2015 Jun;3(10):136. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.49. PMID: 26207229; PMCID: PMC4486922.

Wang Y, Cella M, Mallinson K, Ulrich JD, Young KL, Robinette ML, Gilfillan S, Krishnan GM, Sudhakar S, Zinselmeyer BH, Holtzman DM, Cirrito JR, Colonna M. TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell.* 2015 Mar 12;160(6):1061-71. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.049. Epub 2015 Feb 26. PMID: 25728668; PMCID: PMC4477963.

Watanabe LP, Riddle NC. Exercise-induced changes in climbing performance. *R Soc Open Sci.* 2021 Nov 10;8(11):211275. doi: 10.1098/rsos.211275. PMID: 34804578; PMCID: PMC8580468.

Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 May;72(5):1858-62. doi: 10.1073/pnas.72.5.1858. PMID: 1057175; PMCID: PMC432646.

Wilker EH, Osman M, Weisskopf MG. Ambient air pollution and clinical dementia: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2023 Apr 5;381:e071620. doi: 10.1136/bmj-2022-071620. PMID: 37019461; PMCID: PMC10498344.

Wixler V, Laplantine E, Geerts D, Sonnenberg A, Petersohn D, Eckes B, Paulsson M, Aumailley M. Identification of novel interaction partners for the conserved membrane proximal region of alpha-integrin cytoplasmic domains. *FEBS Lett.* 1999 Feb 26;445(2-3):351-5. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00151-9. PMID: 10094488.

WHO. Dementia Fact Sheet. 2023.

Wigge P, Köhler K, Vallis Y, Doyle CA, Owen D, Hunt SP, McMahon HT. Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell.* 1997 Oct;8(10):2003-15. doi: 10.1091/mbc.8.10.2003. PMID: 9348539; PMCID: PMC25662.

World Alzheimer Report 2019.

Wu J, Tian Y, Dong W, Han J. Protocol for electroretinogram recording of the *Drosophila* compound eye. *STAR Protoc.* 2022 Apr 11;3(2):101286. doi: 10.1016/j.xpro.2022.101286. PMID: 35463470; PMCID: PMC9019699.

Wu X, Gan B, Yoo Y, Guan JL. FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation. *Dev Cell.* 2005 Aug;9(2):185-96. doi: 10.1016/j.devcel.2005.06.006. PMID: 16054026.

Wu JW, Hussaini SA, Bastille IM, Rodriguez GA, Mrejeru A, Rilett K, Sanders DW, Cook C, Fu H, Boonen RA, Herman M, Nahmani E, Emrani S, Figueroa YH, Diamond MI, Clelland CL, Wray S, Duff KE. Neuronal activity enhances tau propagation and tau pathology in vivo. *Nat Neurosci.* 2016 Aug;19(8):1085-92. doi: 10.1038/nn.4328. Epub 2016 Jun 20. PMID: 27322420; PMCID: PMC4961585.

Xiong WC, Macklem M, Parsons JT. Expression and characterization of splice variants of PYK2, a focal adhesion kinase-related protein. *J Cell Sci.* 1998 Jul 30;111 (Pt 14):1981-91. doi: 10.1242/jcs.111.14.1981. PMID: 9645946.

Yamada H, Padilla-Parra S, Park SJ, Itoh T, Chaineau M, Monaldi I, Cremona O, Benfenati F, De Camilli P, Coppey-Moisan M, Tramier M, Galli T, Takei K. Dynamic interaction of amphiphysin with N-WASP regulates actin assembly. *J Biol Chem.* 2009 Dec 4;284(49):34244-

56. doi: 10.1074/jbc.M109.064204. Epub 2009 Sep 16. PMID: 19759398; PMCID: PMC2797194.

Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu CC, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol*. 2019 Sep;15(9):501-518. doi: 10.1038/s41582-019-0228-7. Epub 2019 Jul 31. PMID: 31367008; PMCID: PMC7055192.

Yao H, Peng F, Fan Y, Zhu X, Hu G, Buch SJ. TRPC channel-mediated neuroprotection by PDGF involves Pyk2/ERK/CREB pathway. *Cell Death Differ*. 2009 Dec;16(12):1681-93. doi: 10.1038/cdd.2009.108. Epub 2009 Aug 14. PMID: 19680266; PMCID: PMC2783976.

Yoshida Y, Kinuta M, Abe T, Liang S, Araki K, Cremona O, Di Paolo G, Moriyama Y, Yasuda T, De Camilli P, Takei K. The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature. *EMBO J*. 2004 Sep 1;23(17):3483-91. doi: 10.1038/sj.emboj.7600355. Epub 2004 Aug 19. PMID: 15318165; PMCID: PMC516627.

Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW, Schreiber SL. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell*. 1994 Mar 11;76(5):933-45. doi: 10.1016/0092-8674(94)90367-0. PMID: 7510218.

Yusein S, Wolstenholme A, Semenov E. Functional consequences of mutations in the *Drosophila* histamine receptor HCLB. *J Insect Physiol*. 2010 Jan;56(1):21-7. doi: 10.1016/j.jinsphys.2009.08.016. PMID: 19716373; PMCID: PMC2805722.

Zambo B, Edelweiss E, Morlet B, Negroni L, Pajkos M, Dosztanyi Z, Ostergaard S, Trave G, Laporte J, Gogl G. Uncovering the BIN1-SH3 interactome underpinning centronuclear myopathy. *Elife*. 2024 Jul 12;13:RP95397. doi: 10.7554/eLife.95397. PMID: 38995680; PMCID: PMC11245310.

Zelhof AC, Bao H, Hardy RW, Razzaq A, Zhang B, Doe CQ. *Drosophila* Amphiphysin is implicated in protein localization and membrane morphogenesis but not in synaptic vesicle endocytosis. *Development*. 2001 Dec;128(24):5005-15. doi: 10.1242/dev.128.24.5005. PMID: 11748137.

Zhai RG, Bellen HJ. The architecture of the active zone in the presynaptic nerve terminal. *Physiology (Bethesda)*. 2004 Oct;19:262-70. doi: 10.1152/physiol.00014.2004. PMID: 15381754.

Zhao R, Hu W, Tsai J, Li W, Gan WB. Microglia limit the expansion of β -amyloid plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2017 Jun 12;12(1):47. doi: 10.1186/s13024-017-0188-6. PMID: 28606182; PMCID: PMC5468952.

Zhang B, Weuve J, Langa KM, D'Souza J, Szpiro A, Faul J, Mendes de Leon C, Gao J, Kaufman JD, Sheppard L, Lee J, Kobayashi LC, Hirth R, Adar SD. Comparison of Particulate Air Pollution From Different Emission Sources and Incident Dementia in the US. *JAMA Intern Med*. 2023 Oct 1;183(10):1080-1089. doi: 10.1001/jamainternmed.2023.3300. PMID: 37578757; PMCID: PMC10425875.

Zhang H, Jiang X, Ma L, Wei W, Li Z, Chang S, Wen J, Sun J, Li H. Role of A β in Alzheimer's-related synaptic dysfunction. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Aug 26;10:964075. doi: 10.3389/fcell.2022.964075. PMID: 36092715; PMCID: PMC9459380.

Zhang J, Zhang Y, Wang J, Xia Y, Zhang J, Chen L. Recent advances in Alzheimer's disease: Mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. *Signal Transduct Target Ther*. 2024 Aug 23;9(1):211. doi: 10.1038/s41392-024-01911-3. PMID: 39174535; PMCID: PMC11344989.

- Zhang X, Li Q, Cong W, Mu S, Zhan R, Zhong S, Zhao M, Zhao C, Kang K, Zhou Z. Effect of physical activity on risk of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis of twenty-nine prospective cohort studies. *Ageing Res Rev.* 2023 Dec;92:102127. doi: 10.1016/j.arr.2023.102127. Epub 2023 Nov 17. PMID: 37979700.
- Zhang X, Zou L, Tang L, Xiong M, Yan XX, Meng L, Chen G, Xiong J, Nie S, Zhang Z, Chen Q, Zhang Z. Bridging integrator 1 fragment accelerates tau aggregation and propagation by enhancing clathrin-mediated endocytosis in mice. *PLoS Biol.* 2024 Jan 11;22(1):e3002470. doi: 10.1371/journal.pbio.3002470. PMID: 38206965; PMCID: PMC10783739.
- Zheng J, Suo L, Zhou Y, Jia L, Li J, Kuang Y, Cui D, Zhang X, Wu Q. Pyk2 suppresses contextual fear memory in an autophosphorylation-independent manner. *J Mol Cell Biol.* 2022 Jan 21;13(11):808-821. doi: 10.1093/jmcb/mjab057. PMID: 34529077; PMCID: PMC8782590.
- Zhong G, Wang Y, Zhang Y, Guo JJ, Zhao Y. Smoking is associated with an increased risk of dementia: a meta-analysis of prospective cohort studies with investigation of potential effect modifiers. *PLoS One.* 2015 Apr 13;10(4):e0126169. doi: 10.1371/journal.pone.0126169. PMID: 25763939; PMCID: PMC4357455.
- Zhu XC, Tan L, Wang HF, Jiang T, Cao L, Wang C, Wang J, Tan CC, Meng XF, Yu JT. Rate of early onset Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Ann Transl Med.* 2015 Mar;3(3):38. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.01.19. Erratum in: *Ann Transl Med.* 2016 May;4(9):E4. doi: 10.21037/atm.2016.05.21. PMID: 25815299; PMCID: PMC4356853.
- Ziegler-Graham K, Brookmeyer R, Johnson E, Arrighi HM. Worldwide variation in the doubling time of Alzheimer's disease incidence rates. *Alzheimers Dement.* 2008 Sep;4(5):316-23. doi: 10.1016/j.jalz.2008.05.2479. PMID: 18790458.
- Zimmerman JE, Chan MT, Jackson N, Maislin G, Pack AI. Genetic background has a major impact on differences in sleep resulting from environmental influences in *Drosophila*. *Sleep.* 2012 Apr 1;35(4):545-57. doi: 10.5665/sleep.1744. PMID: 22467993; PMCID: PMC3296797.

Annexes

Annexe 1

BIN1 expression in the presynaptic compartment leads to isoform-specific synaptotoxicity

Erwan Lambert^{1†}, Carla Gelle^{1†}, Valentin Leclerc^{1†}, Alejandra Freire-Regatillo^{1†}, Nicolas Barois^{2,3}, Tommy Malfoi¹, Xavier Hermant¹, Florie Demiautte¹, Frank Lafont³, Philippe Amouyel¹, Karine Blary⁴, Sabine Kuenen^{5,6}, Chloé Najdek¹, Patrik Verstecken^{5,6}, Dolores Siedlecki-Wullich¹, Pierre Yger⁷, Jean-Charles Lambert¹, Devrim Kilinc^{1*}, Pierre Dourlen^{1*}

¹ Université de Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 – RID – AGE – Facteurs de risque et déterminants moléculaires liés au vieillissement, Lille, France

² Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UAR CNRS 2014 - US Inserm 41 - PLBS, Lille, France.

³ University of Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur Lille, U1019-UMR 9017-CIIL-Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France.

⁴ Univ. Lille, CNRS, Centrale Lille, Univ. Polytechnique Hauts-de-France, UMR 8520 - IEMN - Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologie, F-59000 Lille, France

⁵ VIB Center for Brain and Disease Research, KU Leuven, Leuven, Belgium

⁶ Department of Neurosciences, Leuven Brain Institute, KU Leuven, Leuven, Belgium

⁷ Lille Neurosciences & Cognition (liNCog) – U1172 (INSERM, Lille), Univ Lille, CHU Lille 59045 Lille, France

[†] Equal contribution

[‡] Present address: Donders Center for Neuroscience, Department of Molecular Neurobiology, Radboud University, Nijmegen, the Netherlands

* Address for correspondence: devrim.kilinc@pasteur-lille.fr; pierre.dourlen@pasteur-lille.fr

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is characterized by a strong genetic predisposition and by an early loss of synaptic connectivity that strongly correlates with cognitive deficit. Some genetic determinants could contribute to synapse frailty toward AD pathology. However, the role of genetic determinants in AD pathogenesis remains poorly understood at the synaptic level. Here, we show that the expression of an isoform of the major AD susceptibility gene BIN1 in the presynaptic compartment results in synaptic loss. Using electrophysiology, we observed an early loss of synaptic transmission upon BIN1 isoform 1 (BIN1iso1) expression in *Drosophila* retinal photoreceptor neurons. This was not observed for the other human BIN1 isoforms tested, isoform 8 and isoform 9. Structural analysis of photoreceptor neuron synapses shows a strong accumulation of abnormally large vesicles in the presynaptic compartment, reminiscent of this same isoform-induced endosome defects in cell bodies. In addition, the expression of BIN1iso1 in motoneurons of the *Drosophila* neuromuscular junction alters the morphology of synaptic boutons, with a greater number and a smaller size of synaptic boutons, and the appearance of satellite boutons. As opposed to endosomal defects in cell body, modulating the Rab11 recycling endosome regulator did not prevent BIN1iso1 synaptotoxicity. To test if synaptic deficits are conserved in a mammalian model and to assert a presynaptic vs postsynaptic role for BIN1, we used rat primary neurons cultured in microfluidic devices that restrict gene expression modulation in particular neuron populations. We found a loss of synaptic connectivity only when expressing BIN1iso1 in the presynaptic compartment, which was confirmed by microelectrode array analysis. Together, our results suggest that BIN1 expression in the presynaptic terminal, but not the postsynaptic terminal leads to an isoform-specific, deleterious effect on synaptic integrity. BIN1 synaptotoxicity could contribute to the synapse loss observed early in AD. This supports the idea that genetic determinants could make synapses prone to failure in AD.

Keywords

Alzheimer's disease, BIN1 isoforms, synapse, *Drosophila*, primary neuronal culture, Rab11, electroretinography, MEA

Introduction

Alzheimer Disease (AD) is the most frequent neurodegenerative disease and cause of dementia worldwide. Besides the two pathognomonic protein aggregates, the extracellular senile plaques composed of amyloid- β peptide (A β) and the intracellular neurofibrillary tangles composed of phosphorylated tau, AD is characterized by progressive synaptic and neuronal losses. The synaptic loss strongly correlates with cognitive decline making synapse loss a central element of AD pathogenesis (DeKosky & Scheff, 1990; Mecca et al., 2022; Terry et al., 1991).

In addition, AD is considered to have a strong genetic component. Even in multifactorial cases, which represent the vast majority of AD forms, the heritability is estimated to reach 60-80% (Gatz et al., 2006). Recent advances in genetic studies have identified up to 76 genomic loci associated with the disease (Bellenguez et al., 2022). Genes responsible for the genetic signals in these loci are implicated somehow in the etiology of the disease. Therefore, some of them are likely involved in synapse loss. Accordingly, a genetically driven synaptic failure hypothesis has been raised for the disease (Dourlen

et al., 2019). However, the potential synaptic roles of many AD risk genes are yet to be characterized. It is the case for *BIN1*, which is the susceptibility gene with the strongest association with AD after *APOE* (Bellenguez et al., 2022).

BIN1 has various functions in membrane trafficking, cytoskeleton regulation, DNA repair, cell cycle progression, and apoptosis (Dourlen et al., 2025; Prokic et al., 2014). *BIN1* is expressed in many organs, mainly in muscle and in the brain (Butler et al., 1997). In the brain, it is expressed mostly in oligodendrocytes, microglia and neurons (Adams et al., 2016; De Rossi et al., 2016; Marques-Coelho et al., 2021). *BIN1* has more than 10 isoforms. Some are ubiquitous, like *BIN1* isoform 9 (*BIN1iso9*) and others are brain- or muscle-specific, like *BIN1* isoform 1 (*BIN1iso1*) or *BIN1* isoform 8 (*BIN1iso8*) respectively (Butler et al., 1997; Dourlen et al., 2025). In the brain, *BIN1iso1* and *BIN1iso9* are the most expressed (Crotti et al., 2019; Taga et al., 2020) and *BIN1iso1* is considered neuron-specific (De Rossi et al., 2016).

BIN1 has been identified as a member of the Amphiphysin family of proteins and therefore involved in the regulation of endocytosis and the endolysosomal pathway (Butler et al., 1997; Ramjaun et al., 1997; Tsutsui et al., 1997; Wigge et al., 1997). Also named AMPH2, *BIN1* shows sequence similarity with AMPH, a neuronal protein highly enriched in synaptic terminals and involved in synaptic vesicle endocytosis (David et al., 1996; Lichte et al., 1992; Shupliakov et al., 1997). *BIN1* interacts with many components involved in clathrin-mediated endocytosis, namely dynamin, synaptojanin, AP-2, clathrin and endophilin (Drake & Traub, 2001; LePrince et al., 1997; McMahon et al., 1997; Micheva et al., 1997; Ramjaun et al., 1997). Furthermore, *BIN1* has been visualized to be recruited to clathrin-coated pits in the sequence of events when the neck of the endocytic vesicle is formed just before vesicle scission (Taylor et al., 2012). *BIN1* also contributes to fast endophilin-mediated endocytosis, a process regulating axonal growth *in vitro* in mouse hippocampal neurons (Ferreira et al., 2021). In Neuro2a cells, *BIN1iso1* expression increases transferrin uptake (Ellis et al., 2012). However, in primary embryonic rat neurons, *BIN1iso1* inhibits clathrin-mediated endocytosis resulting in smaller endosomes (Calafate et al., 2016). In human induced neurons, gain and loss of *BIN1iso1* increases and decreases respectively the size of early endosomes (Lambert et al., 2022). This effect of *BIN1iso1* overexpression is conserved when expressed in *Drosophila* neurons and leads to neurodegeneration, which can be prevented upon inhibition of the early endosome regulator Rab5 and upon activation of the recycling endosome regulator Rab11 (Lambert et al., 2022). Of note, regulation of the endosome size is of interest for AD as endosomal enlargement is one of the first AD pathological hallmark (Cataldo et al., 1997, 2000).

Intracellular trafficking is crucial for synapses; in the presynaptic compartment it ensures the correct generation and release of synaptic vesicles and in the postsynaptic compartment it is required for the correct recycling of neurotransmitter receptors. From *Drosophila* to mammals, *BIN1* is localized at synapses (Leventis et al., 2001; Ramjaun et al., 1997; Zehhof et al., 2001). Whether it is localized more in the presynaptic compartment or in the postsynaptic compartment depends on the experimental model and study (De Rossi et al., 2020; Schürmann et al., 2020). At the functional level, in the postsynaptic compartment, *BIN1* has been shown to regulate the recycling of AMPA receptors at the plasma membrane *in vitro* (Schürmann et al., 2020). In the presynaptic compartment, loss of *BIN1* has been shown to regulate presynaptic vesicular release in hippocampal excitatory synapses *in vivo* (De

Rossi et al., 2020). Therefore, the role of BIN1 at the synapse remains poorly understood and it is essential to address this question if we aim at better understanding its role in AD pathogenesis.

For this purpose, we investigated the synaptic role and potential toxicity of human BIN1iso1, BIN1iso8 and BIN1iso9. We used the highly tractable *in vivo* model *Drosophila*, in which human BIN1 functions are conserved. This is exemplified by human BIN1 being able to rescue the locomotor deficits of endogenous *Drosophila* BIN1 mutants (called Amphiphysin) (Lambert et al., 2022). We first analyzed the synaptotoxicity of human BIN1 isoforms expression in the retina photoreceptor neurons. We confirmed our results in third instar larval glutamatergic neuromuscular junction (NMJ), a synaptic reference model in *Drosophila* (Menon et al., 2013). We further tested the toxicity of BIN1iso1 and BIN1iso9 in rat primary neuronal cultures using microfluidic devices and multielectrode (MEA) arrays, which enabled us to assess pre- and postsynaptic roles of BIN1 in synaptic structure and transmission in the mammalian context.

Material and Methods

***Drosophila* genetics**

Flies were raised on a standard medium (Nutri-fly BF, Genesee Scientific, San Diego, CA, USA) at 25°C under a 12h/12h day/night cycle. The UAS-BIN1iso1, UAS-BIN1iso9, UAS-BIN1iso8, UAS-dAmphA and rh1-Gal4 lines were described previously (Dourlen et al., 2012; Lambert et al., 2022). Other stocks were obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC, Bloomington, IN, USA): UAS-Luciferase (#35788), UAS-mCD8::GFP (#27400), UAS-GFP (#35786), UAS-Rab11::GFP (#8506), Nsyb-Gal4 (#42714).

Western blotting

Drosophila heads (10 heads per condition) were dissected and crushed in 30µL of NuPAGE LDS buffer (NP0008, NuPAGE, Novex, Life Technologies) supplemented with reducing agent (NP0009, NuPAGE, Novex, Life Technologies). Samples were centrifuged (8500g, 10min, 4°C) and the supernatants were stored at -80°C. Once thawed, they were denatured by heating for 10 minutes at 85°C, then plated and separated on a 4-12% bis-tris acrylamide gel (NuPAGE, Novex, Life Technologies) in 1X MOPS buffer (NP0001-02, NuPAGE, Novex, Life Technologies). Samples were transferred to nitrocellulose membrane (NuPAGE, Novex, Life Technologies) using the Biorad Trans-Blot transfer system kit (Biorad) according to the supplier's technical recommendations (7 min, 2.5A, 25V). The quality of migration and transfer was checked by staining with Ponceau Red 0.2% (Sigma).

Membranes were incubated for 1h at room temperature in 1X TNT (Tris 0.15M, NaCl 1.5M, Tween20 0.5%) supplemented with 5% skimmed milk powder to block aspecific sites, and labeled with primary antibody in SuperBlock Tween 20 blocking buffer (37563, Thermo Scientific) overnight at 4°C. This incubation was followed by three 10-minute rinses with 1X TNT to remove aspecifically bound antibodies. The membrane was then incubated with the secondary antibody for 2 hours, followed by 3 further 10-minute rinses with 1X TNT to remove excess of secondary antibodies. The antibodies used

were: anti-BIN1 primary antibodies (BIN1 99D, 05-449, Merck Millipore, RRID:AB_309738, 1/2500, BIN1 ab27796, abcam, RRID:AB_725699, 1/1000), anti- α -tubulin primary antibody (α -tubulin DM1A, T9026, Sigma, RRID: AB_477593, 1/5000), anti-actin primary antibody (Sigma-Aldrich Cat# A2066, RRID:AB_476693), anti-GFP primary antibody (anti-GFP, G1544, Sigma, RRID:AB_439690, 1/4000) and HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, anti-mouse 115-035-003, RRID:AB_10015289 and anti-rabbit 111-035-003, RRID:AB_2313567, 1/10000). Immunoreactivity was revealed by incubation with ECL (WBLUC0500, Immobilon Classico Western HRP Substrate, Millipore) and the chemiluminescence imaged with the Amersham Imager 600 camera (GE lifesciences, GE Healthcare, USA). Relative quantification was performed using Fiji software.

Electroretinography

Electroretinograms (ERGs) were recorded in flies immobilized on a glass microscope slide using liquid Pritt glue. For the recordings, glass pipettes (borosilicate, 1.5 mm outer diameter; Hilgenberg) were filled with 3M NaCl and placed in the thorax, as a reference, and over the fly's eye, lightly penetrating the cornea for the recordings. Responses to a repetitive light stimulus (1 s) given by a green light-emitting diode were recorded using AxoScope 10.5 software and analyzed using Clampfit 10.5 software (Molecular Devices). Recordings were amplified using a Warner DP311 AC/DC amplifier (Warner Instruments) and digitized using MiniDigi 1A (Molecular Devices). Raw data traces were analyzed with Igor Pro 6.36 (Wavemetrics).

Electron microscopy

Electron microscopy was performed as described previously (Lambert et al., 2022). After dissection, *Drosophila* eyes were fixed in 1% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, 0.1M sodium cacodylate buffer (pH 6.8) 30 min at room temperature and then overnight at 4°C. After washing, eyes were post-fixed in 1% OsO₄ and 1.5% potassium ferricyanide for 1h, then with 1% uranyl acetate for 45 min, both in distilled water at room temperature in the dark. After washing, they were dehydrated with successive ethanol solutions. Eyes were infiltrated with epoxy resin (EMbed 812 from EMS) and were mounted in resin into silicone embedding molds. Polymerization was performed at 60°C for 2 days. Ultrathin sections of 70-80 nm thickness were observed on formvar-coated grid with a Hitachi H7500 TEM (Milexia, France), and images were acquired with a 1 Mpixel digital camera from AMT (Milexia, France).

NMJ dissection and immunostaining

Third instar larvae were placed on a Petri dish coated with sylgard, a bicomponent silicone (Sylgard™ 184 Elastomer Base, Dow Corning), in a drop of cold Schneider's medium (Schneider's *Drosophila* Medium (1X), 21720-024, Gibco), to prevent the larvae from drying out and to stun them, making the work easier. The larvae were then pinned between the posterior spiracles and at the level of the pharyngeal apparatus, dorsal side up. Using dissecting scissors, we cut the dorsal cuticle along the anteroposterior axis in-between the two dorsal tracheal trunks to open larvae. We performed two additional horizontal incisions at the level of anterior and posterior spiracles. The muscular walls were deployed on either side of the vertical section to reveal the interior. We then removed the internal organs. Once the dissection was complete, we replaced the Schneider medium with 100 μ L of 4% PFA fixation solution (Electron Microscopy Sciences, 15712) in 1x PBS (70011-036, Gibco) per larva for 20

minutes. We then performed three 10-minute washes with PBT (PBS 1x with 0.1% Triton-X100, AppliChem A4975). Saturation was carried out with 5% NGS (Normal Goat Serum, Jackson ImmunoResearch, 005-000-121) in PBT for 30 minutes. Primary antibodies were deposited overnight at 4°C in PBT 0.1% NGS 5%. The following antibodies were used: anti-HRP488 (123-545-021, Jackson ImmunoResearch, RRID:AB_2338965, 1/400), anti-Disc Large (Dlg 4F3, DSHB, RRID:AB_528203, 1/250), anti-Bruchpilot (nc82, DSHB, RRID:AB_2314866, 1/250) and anti-BIN1 (99D, Merck Millipore, RRID:AB_309738, 1/250). The following day, we performed three 10-minute washes with 0.1% PBT. Following this, we incubate the larvae with secondary antibodies in PBT 0.1% NGS 5%, 2 hours at room temperature: phalloidin (anti-F-actin Alexa 555, A34055, ThermoFisher Scientific), Alexa 633 Goat anti-mouse (A21052, Life Technology, RRID:AB_2535719) and Dye Light 405 Donkey anti-rabbit (711-475-152, Jackson ImmunoResearch, RRID:AB_2340616). We then performed three 10-minute washes with 0.1% PBT followed by a rinse with 90% glycerol in 1X PBS. NMJs were imaged with a Gataca Systems disk spinning microscope (Gataca Systems, France) equipped with a Yokogawa CSU-W1 head (Yokogawa, Japan), a Prime95B camera (Photometrics, Teledyne Technologies Inc., USA) and a Ti-2 inverted stand (Nikon, Japan). To quantitatively analyze NMJs, we manually delineated each synaptic bouton (including satellite boutons if present) one by one using FIJI (NIH, Bethesda, MD) and measured their area. These values were statistically analyzed using R software.

Microfluidic device preparation

Microfluidics masters were fabricated at the Institute of Electronics, Microelectronics and Nanotechnology, Lille, France using two-step photolithography as previously described (Blasiak et al., 2015). For synaptic connectivity analysis, we used a three-chamber design where the side chambers house neuronal cell bodies, and the central (or synaptic) chamber houses neurites arriving from the side chambers and the synaptic connections they form (Kilinc et al., 2020). The device consists of a 450- μm -wide central channel flanked by two 750- μm -wide side channels. All three channels are *ca.* 100 μm high. The left side channel (termed presynaptic) and the central channel (termed synaptic) are interconnected via 4-mm-high, 450- μm -long parallel microchannels that narrow from an entry width of 10 μm to an exit width of 3 μm . The right-side channel (termed postsynaptic) and the synaptic chamber are also interconnected via parallel microchannels with identical dimensions, except that they were 75- μm -long. 4-mm-high polydimethylsiloxane pads were replica molded. Access wells were punched at the termini of the synaptic chamber and of the side channels using 3-mm and 4-mm biopsy punches (Harris Unicore), respectively. The devices were permanently bonded to 24 \times 50 mm glass coverslips (Menzel) via O₂ plasma (Diener, Ebhausen, Germany). Prior to cell culture, the devices were sterilized under ultraviolet light (Light Progress, Anghiari, Italy) for 20 min, treated with 0.1 mg/mL poly-D-lysine (Sigma) for at least 2 h, followed by 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ laminin (Sigma) treatment for 2 h. The devices were then washed once with PBS prior to neuron seeding.

Primary neuron culture

Culture media and supplements were purchased from Thermo Fisher unless specified otherwise. Primary neurons were obtained from P0 (post-natal day 0) rats according to established procedures (Sartori et al., 2019). The hippocampi were isolated from the cortex and washed with ice cold dissection medium (Hanks' balanced salt solution supplemented with HEPES, 1% sodium pyruvate, and 0.5% penicillin/streptomycin) and treated with 2.5% Trypsin at 37°C for 10 min. The trypsin was then

inactivated using an MEM/FBS medium (Minimum Essential Media supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, 1% GlutaMAX, 3% D-glucose (Sigma), 0.8% Minimum Essential Media vitamins and 0.5% Pen/Strep) and incubated with 5 mg/mL DNase (Sigma) for 1 min followed by 3 washes with MEM/FBS medium. The cells were then dissociated in culture medium (Neurobasal A, supplemented with 1% GlutaMAX and 2% B₂₇ neural supplement with antioxidants) before being centrifuged at 200 $\times g$ for 8 min. Cells were then resuspended in culture medium, counted and plated at 100,000 cells/cm² density in the pre- and post-synaptic chambers. The next day, the medium in reservoirs was replaced with fresh culture medium. The 0.1% ethylenediaminetetraacetic acid (in H₂O) was added to the Petri dishes containing microfluidic devices to minimize evaporation. The cultures were maintained in a tissue culture incubator (Panasonic; Osaka, Japan) at 37°C and 5% CO₂ for up to 21 days.

BIN1 isoform overexpression

Overexpression constructs were obtained from Gene Art (Thermo Fisher) based on pLenti6.3/Ubc/V5-DEST A244 backbone vectors with a CMV promoter (Life Technologies, Carlsbad, CA): BIN1iso1 (NM_009668), BIN1 isoform 9 (NM_139349), and an overexpression control vector (Mock). On day 7 *in vitro* (DIV7), neurons in the pre-synaptic or post-synaptic chambers were transduced as previously described (Eysert et al., 2021). To avoid the transduction of neurons in the opposite chamber, a hydrostatic pressure gradient is formed across the microchannels separating the synaptic chamber and the target cell chamber. Lentiviral particles were diluted in pre-warmed culture medium containing 2 μ g/mL Polybrene (hexadimethrine bromide; Sigma). Media from all wells were collected in a common tube. A total of 20, 15 and 25 μ L of the collected medium were added to the reservoirs of the target cell chamber, synaptic chamber and opposite cell chamber, respectively. Cells were transduced at a multiplicity of infection (MOI) of 2 by adding 10 μ L of virus suspension to one of the wells of the target cell chamber. Neurons were incubated with viral particles for 6 h before the wells were topped-up with the remaining collected medium. In a separate experiment, cells in the pre- and postsynaptic chambers were transduced with lentiviral vectors encoding LifeAct-Ruby (pLenti.PGK.LifeAct-Ruby.W; RRID:Addgene_51009) and LifeAct-GFP (pLenti.PGK.LifeAct-GFP.W; RRID:Addgene_51010), respectively, to demonstrate that viral transductions were restricted to the intended cell chamber.

Immunocytochemistry of primary neurons

To quantify synaptic connectivity, we fixed the neurons on DIV14 in 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min, washed 3 \times with PBS, and permeabilized for 5 min with 0.3% Triton X-100. Cells were incubated with 5% normal donkey serum for 2 h at RT before overnight incubation with the following primary antibodies: BIN1 (Millipore Cat# 05-449, RRID: AB_309738), Homer1 (Synaptic Systems Cat# 160 004, RRID: AB_10549720), MAP2 (Synaptic Systems Cat# 188 006, RRID: AB_2619881). The cells were then washed 3 \times with PBS and incubated with the following secondary antibodies raised in donkey: AlexaFluor-conjugated AffiniPure Fragment 405, 594, or 647 (Jackson ImmunoResearch). The cells were then washed 3 \times with PBS and incubated with a Cy2-tagged monoclonal antibody against Synaptophysin 1 (Synaptic Systems Cat# 101 011C2, RRID: AB_10890165).

Microscopy and synaptic connectivity analysis

Microfluidic devices were imaged using a Zeiss LSM880 confocal microscope, equipped with a 63× 1.4-NA objective. Images were analyzed with Imaris software (Bitplane, Zürich, Switzerland) by reconstructing Synaptophysin I and Homer puncta in 3D. The volume and position information of all puncta were processed using a custom Matlab (MathWorks, Natick, MA) program. This program assigns each postsynaptic spot to the nearest presynaptic spot (within a distance threshold of 1 μm) and calculates the number of such assignments for all presynaptic puncta. The percentage of presynaptic spots assigned by at least one postsynaptic spot was systematically used as a readout for synaptic connectivity (Kilinc et al 2020).

Microfluidic device integration to MEAs

We used 256-electrode MEA chips (256MEA100/30iR-ITO-w/o, MultiChannel Systems, Reutlingen, Germany) where electrodes form a 16×16 Cartesian grid, except for the corners where the tips of large, triangular reference electrodes are positioned. As previously done for 60-electrode MEA chips (Lefebvre et al., 2024), we adapted the microfluidic device layout by adding a triangular chamber between the flow channels connecting synaptic and postsynaptic chambers to their respective medium reservoirs. This chamber matches the tip of one reference electrode such that the reference electrode is fluidically connected to the rest of the device. To minimize the effect of this reference electrode chamber on fluid flow in the aforementioned channels, we used sets of parallel microchannels (18 μm width; 7 μm separation) for the connections. MEA-adapted microfluidic devices were prepared in the same way as the regular microfluidic devices and align-bonded to MEA chips using O₂ plasma.

To position similar numbers of microelectrodes underneath pre- and postsynaptic chambers, we use a mechanical tool to precisely align the microfluidic device over the MEA chip (Lefebvre et al., 2024). Briefly, after O₂ plasma exposure, the MEA chip was placed on a manual stage allowing rotation and two-axis translation in the *xy*-plane (Newport; Irvine, CA). The microfluidic device was held above the MEA chip with a vacuum pen (Virtual Industries Inc.; Colorado Springs, CO) that was attached to manual *z*-axis translational stage. Using binoculars, the microfluidic device was then aligned with the MEA chip in a way that pre- and postsynaptic chamber were covered by *ca.* 50 electrodes each. The device was then lowered onto the MEA chip until contact was established, and the integrated device was kept at 70°C for 2 min to strengthen the bond. The MEA-integrated microfluidic devices were placed in 100 mm polystyrene Petri dishes and sterilized and coated in the same way as the regular microfluidic devices. A 35 mm Petri dish containing sterile milliQ water was placed next to the MEA chips to minimize evaporation.

MEA recordings

At DIV19, the spontaneous neuronal activity in each MEA chip was recorded using a MEA2100-System equipped with a single 256-channel headstage and an integrated temperature controller (MultiChannel Systems, Reutlingen, Germany). First, the headstage was preheated to 37°C. A plastic ring with ethylene-propylene membrane was placed over the microfluidic device to ensure sterility during transport and recordings. The MEA chip was brought on the headstage and left there for 5 min for the neurons to adjust to the new environment. Spontaneous activity was recorded from all channels for 5 min at 25 kHz sampling rate. The recordings were exported to .h5 files for further

analysis. For each MEA-integrated microfluidic device, a chip map was generated that lists the electrodes corresponding to pre- and post-synaptic chambers.

MEA analysis

Spike Sorting. The extracellular recordings were analyzed using SpikeInterface (Buccino et al., 2020), and the SpyKING CIRCUS 2 spike sorting pipelines, conceived as an extension of our spike sorting toolbox (Yger et al., 2018). Briefly, the spike sorting procedure to extract the single unit activities starts with a preprocessing step, as follows: bandpass filter (frequency [150Hz, 7kHz]), then a common median reference filter (to remove shared fluctuations across channels) before whitening (to remove shared noise across channels). Then, negative threshold crossings are detected, aligned, and a subset is projected into a lower dimensional space via Principal Components (see (Yger et al., 2018) for details). Density-based clustering is then launched on these projected spikes to detect the templates, *i.e.*, the motifs regularly occurring in the data. Once the dictionary of templates is constructed, a proper orthogonal matching pursuit algorithm (Tropp & Gilbert, 2007) reconstructs the signal as a linear sum of these templates to identify all the spike times. After spike sorting, only the putative units with a refractory period violation less than 0.1 and a signal-to-noise ratio more than 2 were kept as valid neurons.

Position of the units. The putative positions of the units kept after spike sorting are estimated from the extracellular templates, assuming that units could be considered as monopoles (Scopin et al., 2024; Varol et al., 2021). All the units that would be found within the presynaptic chamber are labeled as belonging to the *pre* population, while those found within the postsynaptic chamber are labeled as *post*. Note that while all electrodes were analyzed simultaneously during the spike sorting process (to make use of spatiotemporal information to disambiguate sources), very few units were found between the two chambers, in accordance with the experimental setup. We analyzed the ratio of *post* units to *pre* units to identify potentially abnormal devices. To this end, we used Matlab (Mathworks, Natick, MA) to generate a probability plot for normal distribution, using detected unit numbers for all devices (Supplementary figure 5). Based on this plot, devices with $|z\text{-score}| > 1.5$ were considered outside the normally distributed post:pre unit number ratio and discarded from further analysis. Note that this threshold corresponds to $\left| \log_2 \frac{\#post}{\#pre} \right| > 2$, *i.e.*, a maximum of 4-fold difference in unit numbers between the two chambers was allowed.

Drive between *pre* and *post* populations. To assess the directionality of the functional connectivity between pairs of units, we defined a metric called the *pre-post-drive* that measures to what extent the units in the *pre* population are leading the activity of the units in the *post* population. The assumption behind such a metric is that assuming monosynaptic, direct connections between *pre* and *post* neurons, one must see an increase in activity in the *post* population following spikes emitted by the *pre* population. To do so, for each pair of unit i belonging to the *pre* population and of unit j belonging to the *post* population, we measured the cross-correlogram $CC_{i_{pre},j_{post}}(t)$ of their spiking activity with a given time bin $T_{bin} = 2\text{ ms}$ and during a time window $T_{window} = 20\text{ ms}$. The *drive* $\Phi(i_{pre},j_{post})$ was then computed as the ratio of the integral of $CC_{i_{pre},j_{post}}(t)$ for positive times (*i.e.*, how much the activity of i_{pre} drives the one of j_{post}) divided by the integral of $CC_{i_{pre},j_{post}}(t)$ for negative times (*i.e.*, how much the activity of j_{post} drives the one of i_{pre}). If the two units were firing independently, as

Poisson sources, then $\Phi(i_{pre}, j_{post})$ should be close to 1. If, on the other hand, $\Phi(i_{pre}, j_{post})$ is larger than 1, it means that, on average, spikes of i_{pre} is more likely to precede the ones in j_{post} . Such an asymmetry in the cross-correlogram is often used to infer putative directional connectivity (Aertsen & Gerstein, 1985). Then, at the population level, the *drive* between *pre* and *post* populations is simply obtained as $\Phi(pre, post) = \text{mean}_{i \in pre, j \in post} \Phi(i_{pre}, i_{post})$. Data points beyond median ± 3 median absolute deviations (MAD) were deemed as outliers and excluded from subsequent statistical analysis.

Statistical analysis

Statistical information is available in the figure legends. Two-tailed statistical tests were used. Hypothesis testing was performed with the Kruskal Wallis test followed by a Mann-Whitney comparison, or by a post-hoc Dunn multiple comparison test (Holm method), or with Tukey-Kramer corrections. Statistical analyses were performed using Matlab (Mathworks, Natick, MA), R 3.6.0 (R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>), especially with the FSA package (Ogle et al., 2023), and RStudio 1.2.1335. For box plots, the middle segment, lower and upper hinges represent the median, first quartile and third quartile respectively. The upper whisker extends from the upper hinge to the largest value within 1.5 x IQR of the hinge (where IQR is the interquartile range, or the distance between the first and third quartiles). The lower whisker extends from the lower hinge to the smallest value located at a maximum of 1.5 * IQR from the hinge. Differences with a *p*-value <0.05 were considered significant.

Results

BIN1iso1 altered synaptic transmission of adult photoreceptor neurons in *Drosophila*

To assess the effect of BIN1 isoforms on synaptic transmission, we investigated the electrophysiological response of *Drosophila* photoreceptor neurons expressing BIN1 isoforms upon light illumination. Flies expressed BIN1iso1, BIN1iso8, BIN1iso9, dAmphisoA (the longest endogenous BIN1 isoform) and Luciferase (used as a control) in the outer photoreceptor neurons at day2, day8-9 and day15-16 after birth. The expression was driven by a Rh1 promoter, active just before birth, after photoreceptor neuron development, and by the Gal4/UAS system (Brand & Perrimon, 1993). We checked BIN1 isoforms and dAmphisoA protein expression by western blot using two antibodies. The UAS constructs are inserted in the same genomic location and therefore exhibit similar expression (Lambert et al., 2022). All the constructs were expressed as expected (Supplementary figure 1). The ab27796 antibody cross-reacted partially with dAmphisoA whereas the 99D antibody did not detect dAmphisoA and more strongly detected BIN1iso1. On these flies, we performed electroretinograms (ERGs). Upon a 1 sec-long orange light stimulation, retinas usually exhibit a depolarization and two transient currents, called the ON transient and the OFF transient, at the initiation and termination of the light stimulation respectively (Figure 1A). The ON and OFF transients reflect the synaptic transmission activity of the photoreceptor neurons at the level of the lamina, the outermost part of the optic lobe. On day 2, we did not observe any alteration of the electrophysiological activity whatever the BIN1 isoforms. This indicated that all photoreceptor neurons were normal at birth. On day 8-9, we observed a significant reduction of the amplitude of the ON and OFF transients specifically for flies

expressing BIN1iso1 (Figure 1A, B). On day 15-16, the amplitude of all electrophysiological parameters, the ON and OFF transients and the depolarization, were strongly reduced for retinas expressing BIN1iso1 (Figure 1A, B). It was not observed for retinas expressing BIN1iso8, BIN1iso9 and dAmphisoA. The amplitude of the OFF transient was even slightly increased in these conditions. The loss of all electrophysiological parameters on day 15-16 for BIN1iso1 likely reflected neurodegeneration and loss of the photoreceptor neurons that have been shown in these flies (Lambert et al., 2022). The loss of the ON and OFF transients on day 8-9, observed here, showed in addition that BIN1iso1 expression altered synaptic transmission before neurodegeneration.

To understand the isoform-specificity of the result, we wondered whether all BIN1 isoforms were localized at the photoreceptor neuron axon synaptic terminals in the lamina. By immunofluorescence in 1-day-old whole-mount *Drosophila* retina, we observed that BIN1iso1, BIN1iso9 and to a lesser extent BIN1iso8 were all localized to the synaptic terminals (Figure 1C). This remained true in 7-day-old flies. Therefore, BIN1iso1 synaptotoxicity did not originate from an aberrant localization of this isoform at the synaptic terminals. In addition, we observed in 7-day-old flies a strong accumulation of vesicles in the presynaptic terminals for the BIN1iso1 condition. Some of these vesicles were very big, even bigger than the size of synaptic terminals (Figure 1C, arrows). We further analyzed the synaptic terminal structure using electron microscopy (Figure 1D). We confirmed the presence of abnormal giant vesicles. These vesicles had a single membrane and did not have any specific content. We could see mitochondria and capitate projections as in the control. Finally, we observed some degenerating synaptic terminals (Supplementary figure 2). Overall, the vesicles, observed in the synaptic terminals, perfectly corresponded to the ones exhibiting endosomal markers, described in photoreceptor neuron cell bodies (Lambert et al., 2022). Therefore, they likely originate from a defect in intracellular trafficking and are responsible for the synaptic transmission defects and synaptic terminal degeneration.

BIN1iso1 altered *Drosophila* larval neuromuscular junction

We wanted to further assess the role of BIN1 isoforms on synapse integrity and tested the effect of their expression in third instar larval type Ib neuromuscular junctions (NMJ). It is a large glutamatergic synapse between a motor neuron and a muscle cell. Expression of BIN1 isoforms and dAmphisoA was performed thanks to a Nsyb driver. We checked the expression of the protein by western blot in adult head originating from the larvae, as the Nsyb driver remains active in adulthood, and observed similar results as in the eye with the rh1 driver (Supplementary figure 3). For each larva, we observed the same NMJ, located on muscle cells 6/7 in abdominal segment A2. We labelled the actin cytoskeleton (Phalloidin), the neuron-specific horseradish peroxidase (HRP) epitope and Disc large (Dlg), the orthologue of PSD95, to visualize muscles, motor neuron axon terminals and postsynaptic compartments respectively (Figure 2A).

In larvae expressing luciferase (used as a control), BIN1iso8, BIN1iso9 and dAmphisoA, the innervation pattern appeared to be normal, with large, well-rounded, well-contoured Ib-type synaptic boutons and a stereotyped branching pattern (Figure 2A). It indicates that these isoforms did not impact NMJ morphology. In contrast, BIN1iso1-expressing synaptic boutons looked shredded, clustered in places, and their contours were not as sharp and defined as the control boutons. When quantifying the boutons, it translated in a significantly higher number (~225 boutons per NMJ versus ~150 for the control) of smaller boutons (~1.75 μm^2 versus ~2.5 μm^2 for the control) in the BIN1iso1-expressing

condition (Figure 2B). In addition, in this condition, we were able to see a significantly higher number of satellite boutons (~40 satellite boutons per NMJ compared with ~10 for the control), *i.e.*, boutons budding off from a bouton present in the axis of the branch, or boutons budding off from neuronal connections between two boutons. We did not observe any significant change when summing all individual bouton areas (cumulative area), nor when quantifying the number of active zones using a bruchpilot (brp) staining (Figure 2C, D). Active zones are synaptic vesicle-rich compartments in the presynaptic boutons, where precisely orchestrated molecular interactions control the fusion of synaptic vesicles with the presynaptic membrane. It indicates that despite the strong NMJ morphological alterations, the total size of the NMJ remained constant between the conditions. Thanks to a BIN1 staining, we could detect BIN1iso1, BIN1iso9 and to a lesser extent BIN1iso8 in the motor neuron terminals and synaptic boutons (Figure 2A, C), indicating that the specificity of BIN1iso1 synaptotoxicity does not result from a different addressing of BIN1 isoforms in motor neurons.

Rab11 expression did not prevent BIN1iso1-induced morphological changes of the *Drosophila* larval neuromuscular junction

It is known in the PR neuron model, that BIN1iso1 leads to degeneration via a defect in early endosome trafficking, and that the activation of recycling endosomes via Rab11 alleviates the neurodegeneration (Lambert et al., 2022). Because in this work, BIN1iso1-associated synaptotoxicity exhibited endosomal-like vesicles and because the intracellular trafficking is crucial for synaptic function, we hypothesized that BIN1iso1 synaptotoxicity could also originate from an intracellular trafficking defect. To test this hypothesis, we expressed the recycling endosome regulator Rab11 and assessed if it was possible to restore the BIN1iso1-induced phenotype of NMJs to a wild-type appearance.

Wild-type NMJs exhibited normal morphology with round, well-defined synaptic boutons (Figure 3A). Expression of BIN1iso1 resulted again in NMJs featuring a higher number of smaller synaptic boutons, with a higher number of satellite boutons (Figure 3A, B). Overexpression of Rab11 alone did not affect the morphology of synaptic neurons but significantly decreased the number of synaptic boutons (Figure 3A, B). In this background, overexpression of BIN1iso1 still increased the number of synaptic and satellite boutons, although without changing the mean area of single boutons, and the increase in synaptic bouton number was significantly lower than in the control background (Figure 3A, B). This indicated that Rab11 overexpression did not clearly prevent the effect of BIN1iso1 on NMJs and suggested more an additive effect rather than an epistatic one between the overexpression of BIN1iso1 and Rab11. We checked that the staining of BIN1 was similar between the BIN1iso1 alone and the BIN1iso1+Rab11 conditions, which we confirmed by western blot (Supplementary figure 4). Overall, these results suggested that BIN1iso1 synaptotoxicity is rather independent of Rab11-controlled endosomal trafficking.

BIN1iso1 is toxic for rodent synapses only when expressed in the presynaptic compartment

We next sought to determine if the isoform-specific effect of BIN1iso1 on synapses could be replicated in a mammalian system. To this end, we cultured rat hippocampal neurons in custom-design, three-chamber microfluidic devices that fluidically isolate synapses from their cell bodies and permit

modulation of gene expression exclusively in pre- or postsynaptic chambers (Kilinc et al., 2020). By employing two sets of parallel microchannels of different length to connect presynaptic and postsynaptic chambers to the (central) synaptic chamber (Figure 4A), these devices ensure that the synaptic chamber receives dendrites only from the postsynaptic chamber and contains $83.2 \pm 6.1\%$ of all synaptic connections between pre- and postsynaptic chambers (Kilinc et al., 2020). We plated primary neuron cultures in pre- and postsynaptic chambers and transduced them on DIV7 with lentiviruses encoding for human BIN1iso1, BIN1iso9 or a scrambled control vector (Mock), either in the presynaptic or in the postsynaptic chamber. At DIV14, we fixed the cultures and immunostained them against BIN1, somatodendritic marker MAP2, presynaptic marker Synaptophysin and postsynaptic marker Homer (Figure 4B). We applied our distance-based synaptic connectivity analysis workflow, which assigns each postsynaptic puncta to the nearest presynaptic puncta within a distance threshold (Eysert et al., 2021; Kilinc et al., 2020; Saha et al., 2024). Overexpression of BIN1iso1 –but not BIN1iso9– in the presynaptic chamber –but not in the postsynaptic chamber– induced synaptotoxicity in mature hippocampal neurons as evidenced by a decrease in the fraction of presynaptic spots assigned by at least one postsynaptic spot (Figure 4C). This corroborates our findings in *Drosophila* NMJ that BIN1 induces isoform-specific perturbations at the presynaptic compartment.

Presynaptic BIN1iso1 overexpression decreases network-level functional connectivity

Analysis of synaptic connectivity by immunofluorescence provides inherently limited information on the functionality of the neuronal network. We therefore assessed network-level synaptic connectivity in three-chamber microfluidic devices integrated to MEA chips (Figure 5A-C) – based on the experimental model we recently developed in the context of A β -induced synaptotoxicity (Lefebvre et al., 2024). We analyzed the spiking activity via an established spike sorting algorithm (Yger et al., 2018), which identifies putative units based on their spatiotemporal firing patterns and calculated the cross-correlation for each unit pair that can be formed between units in the pre- and postsynaptic chambers (Figure 5D-F). As a measure for functional connectivity, we defined a *pre-post-drive* parameter by taking the ratio of right-hand-side integral to left-hand-side integral of the cross-correlation histogram for each such unit pair (Figure 5G) (see Materials and Methods for details).

We made a total of 40 recordings (14 Mock, 15 BIN1iso1, 11 BIN1iso9, expressed only in the presynaptic chamber) using primary neuronal cultures from 7 independent cultures. For 5 devices (1 Mock and 4 BIN1iso1) the algorithm was not able to identify any units in the presynaptic chamber (that passed the defined quality criteria). In addition, we discarded a total of 5 recordings (1 Mock, 3 BIN1iso1, 1 BIN1iso9) as they fell outside the normal distribution of post:pre unit number ratio (Supplementary figure 5). For the remaining recordings (12 Mock, 8 BIN1iso1, 10 BIN1iso9), we first assessed whether the number of units detected by the spike sorting algorithm correlated with *pre-post-drive*. When all conditions were pooled, the pre-post-drive parameter did not correlate with the number of units detected in the presynaptic chamber ($R^2 = 0.136$), number of units detected in the postsynaptic chamber ($R^2 = 0.078$) or with the total number of units detected ($R^2 = 0.122$) (Supplementary figure 6). This finding suggests that the *pre-post-drive* parameter can be used as a read-out for network-level connectivity, independently of the number of units detected in the microfluidic device.

We then compared the experimental groups in terms of detected unit numbers and pre-post-drive. To this end, we first plotted pre-post-drive as a function of numbers of detected units in each chamber (Figure 5H). For clarity, we included in this plot the outlier data points as defined by median \pm 3×MAD pre-post-drive (1 Mock, 1 BIN1iso1, 3 BIN1iso9). Interestingly, the pre-post-drive was significantly lower in the BIN1iso1 group compared to the Mock and BIN1iso9 groups (Figure 5I). In fact, for the BIN1iso1 condition, the pre-post-drive parameter was very close to 1, indicating that the presynaptic chamber was no longer driving the postsynaptic chamber, in contrast with the other conditions. The number of units in the postsynaptic chamber was also lower for the BIN1iso1 group when compared to Mock and BIN1iso9 groups despite the fact that the overexpression was restricted to the presynaptic chamber (Figure 5J). This suggests that the postsynaptic activity is (in part) driven by the pre-to-post synaptic connections, which are perturbed by the expression of BIN1iso1 in the presynaptic chamber. The number of units in the presynaptic chamber was also decreased, but this is not reflected in Figure 5J due to the exclusion of 4 out of 15 devices with no presynaptic units, as this precludes cross-correlation analysis. Finally, despite these detrimental functional changes caused by BIN1iso1, neither the mean firing rate (Figure 5K) nor amplitude (signal-to-noise ratio) (Figure 5L) were affected. In summary, the MEA results based on the spontaneous activity of live neurons recapitulate our microscopy-based findings and confirm that presynaptic BIN1iso1 overexpression leads to a loss of network-level synaptic connectivity.

Discussion

Our findings demonstrate that the overexpression of BIN1iso1 induces synaptic dysfunction both morphologically and functionally across invertebrate and vertebrate models. In *Drosophila* photoreceptor neurons, BIN1iso1 impaired synaptic transmission prior to the complete loss of electrophysiological response, suggesting that synaptic dysfunction is an early and possibly primary event in BIN1-mediated toxicity. Notably, this effect was specific to isoform 1, as neither BIN1iso9 nor BIN1iso8 recapitulated the phenotype. Morphologically, BIN1iso1 expression resulted in an altered NMJ architecture characterized by an increased number of synaptic boutons, many of which were smaller in size and appeared as satellite boutons. This structural remodeling was accompanied in the photoreceptor synaptic terminals by an accumulation of endosome-like vesicles, pointing to a disruption of vesicular trafficking. These vesicles were reminiscent of the ones seen in cell bodies of degenerating photoreceptors, which could be rescued by gain-of-function of Rab11, a key regulator of recycling endosomes. In this work, we found that overexpression of Rab11 only partially rescued in an additive manner the synaptic defects caused by BIN1iso1, suggesting a slightly different mechanism at the synaptic level. We then extended our observations to mammalian models using rat hippocampal neurons. BIN1iso1 overexpression in the presynaptic compartment significantly reduced synaptic density, while postsynaptic expression had no detectable effect. This presynaptic specificity was again isoform-dependent, as BIN1iso9 expression did not affect synaptic density. Functionally, presynaptic BIN1iso1 expression led to disrupted synaptic transmission and altered network activity, further highlighting a conserved and isoform-specific synaptotoxic effect.

We showed in this work an early synapse toxicity for BIN1iso1. Because synapses are known to be affected early in AD and their loss correlates with cognitive decline, BIN1, a risk gene for the disease, may contribute to this process (DeKosky & Scheff, 1990; Mecca et al., 2022; Terry et al., 1991). This is

supported by some variants of BIN1, associated with AD and shown to increase the expression of BIN1iso1 (Chapuis et al., 2013). Other evidence suggests that BIN1 expression decreases in the later stages of AD (Marques-Coelho et al., 2021; Saha et al., 2024). This could be due to the death of high-expressing neurons, leaving only low-expressing neurons. Alternatively, the decline in BIN1 expression may be causal in disease progression. In this context, therapeutic strategies aimed at increasing BIN1 activity need to be carefully controlled to avoid exacerbating neurotoxicity due to BIN1iso1 overexpression, as demonstrated in our study.

Importantly, our results not only reveal structural synaptic loss upon BIN1iso1 expression but also demonstrate functional consequences on synaptic transmission. In *Drosophila*, thanks to ERGs, we showed an early progressive loss of synaptic transmission between photoreceptor neurons and the optic lobe. In rat primary neuronal cultures, we used MEA technology to assess neuronal activity. A key advantage of using this technology is its ability to measure neuronal activity directly, without relying on indirect calcium or glutamate sensors for example. For all these recordings, changes in signal frequency and amplitude can result from alterations in either intrinsic neuronal excitability or synaptic transmission, making it challenging to distinguish between the two. One way to disentangle these effects is by analyzing network synchronicity, which has been used as an indirect measure of synaptic transmission. This way, BIN1 knockout iPSC-derived neurons were shown to be defective in functional synaptic connectivity (Saha et al., 2024). To go further, in this work, we combined MEA with microfluidic compartmentalization to directly assess functional connectivity within a defined network of pre- and postsynaptic neuron populations. While we did not observe changes in firing rate or spike amplitude in the presynaptic chamber where BIN1iso1 was overexpressed, we did detect a clear reduction in functional connectivity as the pre-to-post synaptic drive was close to 1 upon BIN1iso1 expression. We did not observe the same result with BIN1iso9, reinforcing the isoform-specific effect. The absence of effect on the firing rate or spike amplitude contrasts with previous reports showing hyperexcitability with increased spike frequency upon BIN1 overexpression (Voskobiynek et al., 2020). This may be explained by differences in the maturity of the neurons at the time of transduction and analysis. More broadly, our findings further support BIN1's role as a modulator of synaptic transmission and network dynamics.

Our results consistently point to a presynaptic-specific role for BIN1iso1. BIN1 has been shown to be predominantly localized in the pre- and post-synaptic compartments in rat primary neuronal cells and mouse brain (De Rossi et al., 2020; Schürmann et al., 2020). In both the *Drosophila* photoreceptor model and the larval NMJ model, BIN1iso1 was tested presynaptically. We further confirmed this compartment-specific effect using a microfluidic device allowing for precise control of protein expression in rat primary neuron cultures. This system revealed a clear reduction in synaptic density when BIN1iso1 was expressed presynaptically, but not postsynaptically. This is in accordance with a role of BIN1 in regulating presynaptic synaptic vesicle release probability seen in conditional knockout mouse brain (De Rossi et al., 2020), and with a presynaptic role of BIN1 in the synaptic vesicle endocytic cycle in inhibitory synapses of mouse primary neuronal cultures (Barata et al., 2025). A postsynaptic role has also been reported in the exocytosis of GluA1 AMPA receptor subunit (Schürmann et al., 2020). These observations suggest that BIN1 may have distinct, context-dependent functions on both sides of the synapse.

Mechanistically, the synaptic toxicity of BIN1iso1 appears to be linked to disruptions in endo-lysosomal trafficking. Indeed, BIN1iso1 expression led to the accumulation of endosome-like large vesicular structures in the terminals of photoreceptor neurons, as observed via immunofluorescence and electron microscopy. In addition, the synaptic overgrowth phenotypes, especially the formation of satellite boutons at the larval NMJ, have been reported in mutants affecting endocytosis, such as *endophilin*, *synaptojanin*, *dynammin*, *AP180*, *synaptotagmin* and *σ 2-adaptin* (Choudhury et al., 2016; Dickman et al., 2006). These morphological changes are thought to arise from defective intracellular trafficking of signaling molecules from the BMP pathway that regulate synaptic growth (O'Connor-Giles et al., 2008). In addition, BIN1iso1-induced photoreceptor degeneration was previously linked to trafficking defects and could be suppressed by modulating Rab5 or Rab11 activity (Lambert et al., 2022), both key regulators of early and recycling endosomes. In the present study, overexpression of Rab11 only partially rescued in an additive manner the synaptic overgrowth phenotype induced by BIN1iso1, suggesting mechanistic divergence between the soma and presynaptic terminals. Similarly, Rab11 overexpression has been shown to mitigate synaptic toxicity in *Drosophila* models of Parkinson's disease involving *Parkin* and *PINK1* (Rai et al., 2023), yet it does not rescue overgrowth phenotypes in *AP-2* loss-of-function *Drosophila* models (Choudhury et al., 2022). The existence of different mechanisms in subcellular compartments in mammals may also explain why BIN1 loss-of-function has been associated with both smaller and bigger Rab5-positive endosomes in rodent primary neurons (Barata et al., 2025; Calafate et al., 2016). Of note, we also observed that Rab11 overexpression alone reduced bouton number at the *Drosophila* NMJ, a novel finding consistent with previously reported increases in bouton number in Rab11 loss-of-function mutants (Khodosh et al., 2006). The endo-lysosomal dysregulation by BIN1 is of interest for AD as endo-lysosomal defects are considered potentially causal in AD (Nixon et al. 2024). BIN1 is known to interact with many components of this system, such as RIN3, another AD genetic risk factor (Dourlen et al., 2025; Kajihio et al., 2003; Shen et al., 2020). Together, these data further support a role for BIN1iso1 in regulating synaptic architecture via intracellular endo-lysosomal trafficking pathways.

Altogether, our data establish BIN1iso1 as a potent modifier of synaptic integrity, at structural and functional levels. The early synaptic alterations, the accumulation of endosomal vesicles, and the isoform and compartment specificity of BIN1iso1 toxicity provide novel insights into the molecular mechanisms by which BIN1 may contribute to neurodegeneration. These findings are particularly relevant given the genetic association of BIN1 with Alzheimer's disease and suggest that isoform-specific targeting could represent a therapeutic strategy.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the BiImaging Center Lille (BICeL) and la Plateforme d'Expérimentation et de Haute Technologie Animale (PLEHTA), both part of Plateformes Lilloises en Biologie et Santé (PLBS) - UAR 2014 - US 41), for microscopy maintenance and animal housing, respectively. pLenti.PGK.LifeAct-Ruby.W and pLenti.PGK.LifeAct-GFP.W were gifts from Rusty Lansford (Addgene plasmid # 51009; <http://n2t.net/addgene:51009>; RRID:Addgene_51009 and Addgene plasmid # 51010; <http://n2t.net/addgene:51010>; RRID:Addgene_51010). The authors thank the vectorology service of the University of Bordeaux for lentiviral packaging. The 4F3 and nc82 antibodies developed by Goodman, C. (University of California, Berkeley) and Buchner, E. (Universitaetsklinikum Wuerzburg) were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD

of the NIH and maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242. Stocks obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (NIH P40OD018537) were used in this study.

This work was supported by the Joint Programme–Neurodegenerative Disease Research (JPND; 3DMiniBrain), by France Alzheimer (#328 ADhesion, #1999 BIN1DROSO), by Fondation Vaincre Alzheimer (LECMA Grant The BIN1-Tau neurotoxic link in *Drosophila*), by ANR (TAUFUNALZ project, ANR-23-CE14-0064), by the LabEx (Laboratory of Excellence) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer’s disease ANR-11-LABX-01), by the Région Hauts-de-France Regional Council and by an Alzheimer’s Association Grant (AARG-22-926152). CG was supported by a fellowship from FranceAlzheimer (Soutien aux jeunes chercheurs – AAP JC 2024 – #6473). This work has been partially undertaken with the support of IEMN CMNF facilities and supported by the French Renatech network.

Conflicts of interest:

None.

Availability of data and material

Data and material from the current study are available from the corresponding authors upon request.

References

- Adams, S. L., Tilton, K., Kozubek, J. A., Seshadri, S., & Delalle, I. (2016). Subcellular Changes in Bridging Integrator 1 Protein Expression in the Cerebral Cortex During the Progression of Alzheimer Disease Pathology. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *75*(8), 779–790. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw056>
- Aertsen, A. M. H. J., & Gerstein, G. L. (1985). Evaluation of neuronal connectivity: Sensitivity of cross-correlation. *Brain Research*, *340*(2), 341–354. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(85\)90931-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(85)90931-X)
- Barata, M. A., Perdigão, C., Ramalho, J., Gomes, E. R., & Guimas Almeida, C. (2025). Alzheimer’s genetic risk factor Bin1 controls synapse vesicle exo-endocytosis in inhibitory synapses. *Cell Reports*, *44*(8). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2025.116005>
- Bellenguez, C., Küçükali, F., Jansen, I. E., Kleindam, L., Moreno-Grau, S., Amin, N., Naj, A. C., Campos-Martin, R., Grenier-Boley, B., Andrade, V., Holmans, P. A., Boland, A., Damotte, V., van der Lee, S. J., Costa, M. R., Kuulasmaa, T., Yang, Q., de Rojas, I., Bis, J. C., ... Lambert, J. C. (2022). New insights into the genetic etiology of Alzheimer’s disease and related dementias. *Nature Genetics*, *54*(4), 412–436. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01024-z>
- Blasiak, A., Lee, G. U., & Kilinc, D. (2015). Neuron Subpopulations with Different Elongation Rates and DCC Dynamics Exhibit Distinct Responses to Isolated Netrin-1 Treatment. *ACS Chemical Neuroscience*, *6*(9), 1578–1590. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.5b00142>
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, *118*(2), 401–415. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8223268>
- Buccino, A. P., Hurwitz, C. L., Garcia, S., Magland, J., Siegle, J. H., Hurwitz, R., & Hennig, M. H. (2020). Spikeinterface, a unified framework for spike sorting. *ELife*, *9*, 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.61834>
- Butler, M. H., David, C., Ochoa, G. C., Freyberg, Z., Daniell, L., Grabs, D., Cremona, O., & De Camilli, P. (1997). Amphiphysin II (SH3p9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *Journal of Cell Biology*, *137*(6), 1355–1367. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.6.1355>
- Calafate, S., Flavin, W., Verstreken, P., & Moechars, D. (2016). Loss of Bin1 Promotes the Propagation of Tau Pathology. *Cell Reports*, *17*(4), 931–940. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.063>
- Cataldo, A. M., Barnett, J. L., Pieroni, C., & Nixon, R. A. (1997). Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer’s disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *17*(16), 6142–6151. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9236226>

- Cataldo, A. M., Peterhoff, C. M., Troncoso, J. C., Gomez-Isla, T., Hyman, B. T., & Nixon, R. A. (2000). Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *The American Journal of Pathology*, *157*(1), 277–286. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10880397>
- Chapuis, J., Hansmannel, F., Gistelincq, M., Mounier, A., Van Cauwenberghe, C., Kolen, K. V., Geller, F., Sottejeau, Y., Harold, D., Dourlen, P., Grenier-Boley, B., Kamatani, Y., Delepine, B., Demiautte, F., Zelenika, D., Zommer, N., Hamdane, M., Bellenguez, C., Dartigues, J.-F., ... Lambert, J.-C. (2013). Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Molecular Psychiatry*, *18*(11), 1225–1234. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.1>
- Choudhury, S. D., Dwivedi, M. K., Pippadpally, S., Patnaik, A., Mishra, S., Padinjat, R., & Kumar, V. (2022). AP2 Regulates Thickveins Trafficking to Attenuate NMJ Growth Signaling in *Drosophila*. *ENeuro*, *9*(5). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0044-22.2022>
- Choudhury, S. D., Mushtaq, Z., Reddy-Alla, S., Balakrishnan, S. S., Thakur, R. S., Krishnan, K. S., Raghu, P., Ramaswami, M., & Kumar, V. (2016). σ 2-Adaptin facilitates basal synaptic transmission and is required for regenerating endo-exo cycling pool under high-frequency nerve stimulation in *Drosophila*. *Genetics*, *203*(1), 369–385. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.183863>
- Crotti, A., Sait, H. R., McAvoy, K. M., Estrada, K., Ergun, A., Szak, S., Marsh, G., Jandreski, L., Peterson, M., Reynolds, T. L., Dalkilic-Liddle, I., Cameron, A., Cahir-McFarland, E., & Ransohoff, R. M. (2019). BIN1 favors the spreading of Tau via extracellular vesicles. *Scientific Reports*, *9*(1), 9477. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45676-0>
- David, C., McPherson, P. S., Mundigl, O., & De Camilli, P. (1996). A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(1), 331–335. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.1.331>
- DeKosky, S. T., & Scheff, S. W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. *Annals of Neurology*, *27*(5), 457–464. <https://doi.org/10.1002/ana.410270502>
- De Rossi, P., Buggia-Prévoit, V., Clayton, B. L. L., Vasquez, J. B., van Sanford, C., Andrew, R. J., Lesnick, R., Botté, A., Deyts, C., Salem, S., Rao, E., Rice, R. C., Parent, A., Kar, S., Popko, B., Pytel, P., Estus, S., & Thinakaran, G. (2016). Predominant expression of Alzheimer's disease-associated BIN1 in mature oligodendrocytes and localization to white matter tracts. *Molecular Neurodegeneration*, *11*(1), 59. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0124-1>
- De Rossi, P., Nomura, T., Andrew, R. J., Masse, N. Y., Sampathkumar, V., Musial, T. F., Sudwarts, A., Recupero, A. J., Le Metayer, T., Hansen, M. T., Shim, H. N., Krause, S. V., Freedman, D. J., Bindokas, V. P., Kasthuri, N., Nicholson, D. A., Contractor, A., & Thinakaran, G. (2020). Neuronal BIN1 Regulates Presynaptic Neurotransmitter Release and Memory Consolidation. *Cell Reports*, *30*(10), 3520–3535.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.026>

- Dickman, D. K., Lu, Z., Meinertzhagen, I. A., & Schwarz, T. L. (2006). Altered synaptic development and active zone spacing in endocytosis mutants. *Current Biology*, *16*(6), 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.02.058>
- Dourlen, P., Bertin, B., Chatelain, G., Robin, M., Napoletano, F., Roux, M. J., & Mollereau, B. (2012). *Drosophila* fatty acid transport protein regulates rhodopsin-1 metabolism and is required for photoreceptor neuron survival. *PLoS Genetics*, *8*(7), e1002833. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002833>
- Dourlen, P., Kilinc, D., Landrieu, I., Chapuis, J., & Lambert, J. C. (2025). BIN1 and Alzheimer’s disease: the tau connection. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 48, Issue 5, pp. 349–361). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2025.03.004>
- Dourlen, P., Kilinc, D., Malmanche, N., Chapuis, J., & Lambert, J.-C. (2019). The new genetic landscape of Alzheimer’s disease: from amyloid cascade to genetically driven synaptic failure hypothesis? *Acta Neuropathologica*, *138*(2), 221–236. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02004-0>
- Drake, M. T., & Traub, L. M. (2001). Interaction of Two Structurally Distinct Sequence Types with the Clathrin Terminal Domain β -Propeller. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(31), 28700–28709. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104226200>
- Ellis, J. D., Barrios-Rodiles, M., Colak, R., Irimia, M., Kim, T., Calarco, J. A., Wang, X., Pan, Q., O’Hanlon, D., Kim, P. M., Wrana, J. L., & Blencowe, B. J. (2012). Tissue-specific alternative splicing remodels protein-protein interaction networks. *Molecular Cell*, *46*(6), 884–892. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.037>
- 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., Chécler, F., Farinelli, M., ... Chapuis, J. (2021). Alzheimer’s genetic risk factor FERMT2 (Kindlin-2) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner. *Molecular Psychiatry*, *26*(10), 5592–5607. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00926-w>
- Ferreira, A. P. A., Casamento, A., Carrillo Roas, S., Halff, E. F., Panambalana, J., Subramaniam, S., Schützenhofer, K., Chan Wah Hak, L., McGourty, K., Thalassinou, K., Kittler, J. T., Martinvalet, D., & Boucrot, E. (2021). Cdk5 and GSK3 β inhibit fast endophilin-mediated endocytosis. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22603-4>
- Gatz, M., Reynolds, C. A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J. A., Berg, S., Fiske, A., & Pedersen, N. L. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Archives of General Psychiatry*, *63*(2), 168–174. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.2.168>
- Kajiho, H., Saito, K., Tsujita, K., Kontani, K., Araki, Y., Kurosu, H., & Katada, T. (2003). RIN3: A novel Rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway. In *Journal of Cell Science* (Vol. 116, Issue 20, pp. 4159–4168). J Cell Sci. <https://doi.org/10.1242/jcs.00718>
- Khodosh, R., Augsburger, A., Schwarz, T. L., & Garrity, P. A. (2006). Bchs, a BEACH domain protein, antagonizes Rab11 in synapse morphogenesis and other developmental events. *Development*, *133*(23), 4655–4665. <https://doi.org/10.1242/dev.02650>

- Kilinc, D., Vreulx, A.-C., Mendes, T., Flaig, A., Marques-Coelho, D., Verschoore, M., Demiautte, F., Amouyel, P., Eysert, F., Dourlen, P., Chapuis, J., Costa, M. R., Malmanche, N., Checler, F., & Lambert, J.-C. (2020). Pyk2 overexpression in postsynaptic neurons blocks amyloid β 1–42-induced synaptotoxicity in microfluidic co-cultures. *Brain Communications*, 2(2). <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa139>
- Lambert, E., Saha, O., Soares Landeira, B., Melo de Farias, A. R., Hermant, X., Carrier, A., Pelletier, A., Gadaut, J., Davoine, L., Dupont, C., Amouyel, P., Bonnefond, A., Lafont, F., Abdelfettah, F., Verstreken, P., Chapuis, J., Barois, N., Delahaye, F., Dermaut, B., ... Dourlen, P. (2022). The Alzheimer susceptibility gene BIN1 induces isoform-dependent neurotoxicity through early endosome defects. *Acta Neuropathologica Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01285-5>
- Lefebvre, C., Vreulx, A. C., Dumortier, C., Bégard, S., Gelle, C., Siedlecki-Wullich, D., Colin, M., Kilinc, D., & Halliez, S. (2024). Integration of Microfluidic Devices with Microelectrode Arrays to Functionally Assay Amyloid- β -Induced Synaptotoxicity. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 10(3), 1856–1868. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.3c00997>
- Leprince, C., Romero, F., Cussac, D., Vayssiere, B., Berger, R., Tavitian, A., & Camonis, J. H. (1997). A new member of the amphiphysin family connecting endocytosis and signal transduction pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15101–15105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9182529>
- Leventis, P. A., Chow, B. M., Stewart, B. A., Iyengar, B., Campos, A. R., & Boulianne, G. L. (2001). *Drosophila* Amphiphysin is a post-synaptic protein required for normal locomotion but not endocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2(11), 839–850. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11733051>
- Lichte, B., Veh, R. W., Meyer, H. E., & Kilimann, M. W. (1992). Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *The EMBO Journal*, 11(7), 2521–2530. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05317.x>
- Marques-Coelho, D., Iohan, L. da C. C., Melo de Farias, A. R., Flaig, A., Letournel, F., Martin-Négrier, M. L., Chapon, F., Faisant, M., Godfraind, C., Maurage, C. A., Deramecourt, V., Duchesne, M., Meyronnet, D., Streichenberger, N., de Paula, A. M., Rigau, V., Vandenbos-Burel, F., Duyckaerts, C., Seilhean, D., ... Costa, M. R. (2021). Differential transcript usage unravels gene expression alterations in Alzheimer’s disease human brains. *Npj Aging and Mechanisms of Disease*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41514-020-00052-5>
- McMahon, H. T., Wigge, P., & Smith, C. (1997). Clathrin interacts specifically with amphiphysin and is displaced by dynamin. *FEBS Letters*, 413(2), 319–322. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00928-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00928-9)
- Mecca, A. P., O’Dell, R. S., Sharp, E. S., Banks, E. R., Bartlett, H. H., Zhao, W., Lipior, S., Diepenbrock, N. G., Chen, M. K., Naganawa, M., Toyonaga, T., Nabulsi, N. B., Vander Wyk, B. C., Arnsten, A. F. T., Huang, Y., Carson, R. E., & van Dyck, C. H. (2022). Synaptic density and cognitive performance in Alzheimer’s disease: A PET imaging study with [11C]UCB-J. *Alzheimer’s and Dementia*, 18(12), 2527–2536. <https://doi.org/10.1002/alz.12582>

- Menon, K. P., Carrillo, R. A., & Zinn, K. (2013). Development and plasticity of the *Drosophila* larval neuromuscular junction. In *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* (Vol. 2, Issue 5, pp. 647–670). Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. <https://doi.org/10.1002/wdev.108>
- Micheva, K. D., Kay, B. K., & McPherson, P. S. (1997). Synaptotagmin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(43), 27239–27245. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9341169>
- O'Connor-Giles, K. M., Ho, L. L., & Ganetzky, B. (2008). Nervous Wreck Interacts with Thickveins and the Endocytic Machinery to Attenuate Retrograde BMP Signaling during Synaptic Growth. *Neuron*, 58(4), 507–518. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.03.007>
- Ogle, D. H., Doll, J. C., Wheeler, A. P., & Dinno, A. (2023). *FSA: Simple Fisheries Stock Assessment Methods*. <https://fishr-core-team.github.io/FSA/authors.html#citation>
- Prokic, I., Cowling, B. S., & Laporte, J. (2014). Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *Journal of Molecular Medicine*, 92(5), 453–463. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1138-1>
- Rai, P., Ratnaparkhi, A., & Kumar Roy, J. (2023). Rab11 rescues muscle degeneration and synaptic morphology in the park13/+ Parkinson model of *Drosophila melanogaster*. *Brain Research*, 1816. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2023.148442>
- Ramjaun, A. R., Micheva, K. D., Bouchelet, I., & McPherson, P. S. (1997). Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *Journal of Biological Chemistry*, 272(26), 16700–16706. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16700>
- Saha, O., Melo de Farias, A. R., Pelletier, A., Siedlecki-Wullich, D., Landeira, B. S., Gadaut, J., Carrier, A., Vreulx, A. C., Guyot, K., Shen, Y., Bonnefond, A., Amouyel, P., TCW, J., Kilinc, D., Queiroz, C. M., Delahaye, F., Lambert, J. C., & Costa, M. R. (2024). The Alzheimer's disease risk gene BIN1 regulates activity-dependent gene expression in human-induced glutamatergic neurons. *Molecular Psychiatry*, 29(9). <https://doi.org/10.1038/s41380-024-02502-y>
- Sartori, M., Mendes, T., Desai, S., Lasorsa, A., Herledan, A., Malmanche, N., Mäkinen, P., Marttinen, M., Malki, I., Chapuis, J., Flaig, A., Vreulx, A.-C., Ciancia, M., Amouyel, P., Leroux, F., Déprez, B., Cantrelle, F.-X., Maréchal, D., Pradier, L., ... Lambert, J.-C. (2019). BIN1 recovers tauopathy-induced long-term memory deficits in mice and interacts with Tau through Thr348 phosphorylation. *Acta Neuropathologica*, 138(4), 631–652. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02017-9>
- Schürmann, B., Bermingham, D. P., Kopeikina, K. J., Myczek, K., Yoon, S., Horan, K. E., Kelly, C. J., Martin-de-Saavedra, M. D., Forrest, M. P., Fawcett-Patel, J. M., Smith, K. R., Gao, R., Bach, A., Burette, A. C., Rappoport, J. Z., Weinberg, R. J., Martina, M., & Penzes, P. (2020). A novel role for the late-onset Alzheimer's disease (LOAD)-associated protein Bin1 in regulating postsynaptic trafficking and glutamatergic signaling. *Molecular Psychiatry*, 25(9), 2000–2016. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0407-3>

- Scopin, M., Spampinato, G. L. B., Marre, O., Garcia, S., & Yger, P. (2024). Localization of neurons from extracellular footprints. *Journal of Neuroscience Methods*, 412. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2024.110297>
- Shen, R., Zhao, X., He, L., Ding, Y., Xu, W., Lin, S., Fang, S., Yang, W., Sung, K., Spencer, B., Rissman, R. A., Lei, M., Ding, J., & Wu, C. (2020). Upregulation of RIN3 induces endosomal dysfunction in Alzheimer's disease. *Translational Neurodegeneration*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00206-1>
- Shupliakov, O., Löw, P., Grabs, D., Gad, H., Chen, H., David, C., Takei, K., De Camilli, P., & Brodin, L. (1997). Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science*, 276(5310), 259–263. <https://doi.org/10.1126/science.276.5310.259>
- Taga, M., Petyuk, V. A., White, C., Marsh, G., Ma, Y., Klein, H. U., Connor, S. M., Kroshilina, A., Yung, C. J., Khairallah, A., Olah, M., Schneider, J., Karhohs, K., Carpenter, A. E., Ransohoff, R., Bennett, D. A., Crotti, A., Bradshaw, E. M., & De Jager, P. L. (2020). BIN1 protein isoforms are differentially expressed in astrocytes, neurons, and microglia: neuronal and astrocyte BIN1 are implicated in tau pathology. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00387-3>
- Taylor, M. J., Lampe, M., & Merrifield, C. J. (2012). A feedback loop between dynamin and actin recruitment during clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001302>
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., Deteresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., & Katzman, R. (1991). Physical Basis of Cognitive Alterations in Alzheimer's Disease : Synapse Loss Is the Major Correlate of Cognitive Impairment. *Annals of Neurology*, 30(4), 572–580.
- Tropp, J. A., & Gilbert, A. C. (2007). Signal recovery from random measurements via orthogonal matching pursuit. *IEEE Transactions on Information Theory*, 53(12), 4655–4666. <https://doi.org/10.1109/TIT.2007.909108>
- Tsutsui, K., Maeda, Y., Tsutsui, K., Seki, S., & Tokunaga, A. (1997). cDNA cloning of a novel amphiphysin isoform and tissue specific expression of its multiple splice variants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236(1), 178–183. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6927>
- Varol, E., Boussard, J., Dethé, N., Winter, O., Urai, A., Churchland, A., Steinmetz, N., & Paninski, L. (2021). Decentralized motion inference and registration of neuropixel data. *ICASSP, IEEE International Conference on Acoustics, Speech and Signal Processing - Proceedings, 2021-June*, 1085–1089. <https://doi.org/10.1109/ICASSP39728.2021.9414145>
- Voskobiynyk, Y., Roth, J. R., Cochran, J. N., Rush, T., Carullo, N. V. N., Mesina, J. S., Waqas, M., Vollmer, R. M., Day, J. J., McMahon, L. L., & Roberson, E. D. (2020). Alzheimer's disease risk gene BIN1 induces Tau-dependent network hyperexcitability. *ELife*, 9, 1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.57354>

- Wigge, P., Köhler, K., Vallis, Y., Doyle, C. A., Owen, D., Hunt, S. P., & McMahon, H. T. (1997). Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*, 8(10), 2003–2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9348539>
- Yger, P., Spampinato, G. L. B., Esposito, E., Lefebvre, B., Deny, S., Gardella, C., Stimberg, M., Jetter, F., Zeck, G., Picaud, S., Duebel, J., & Marre, O. (2018). A spike sorting toolbox for up to thousands of electrodes validated with ground truth recordings in vitro and in vivo. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.34518>
- Zelhof, A. C., Bao, H., Hardy, R. W., Razzaq, A., Zhang, B., & Doe, C. Q. (2001). *Drosophila* Amphiphysin is implicated in protein localization and membrane morphogenesis but not in synaptic vesicle endocytosis. *Development (Cambridge, England)*, 128(24), 5005–5015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11748137>

Figure legends

Figure 1: BIN1iso1 disrupted synaptic transmission of *Drosophila* photoreceptor neurons with age. **A.** Electroretinograms of *Drosophila* expressing BIN1iso1, BIN1iso8, BIN1iso9, dAmphisoA and Luciferase (control) under a rh1 driver at day 2, day 8-9 and day 15-16. Specifically, for BIN1iso1, we observed a loss of ON and OFF transients (magenta arrows) at day 8-9 followed by a loss of all electrophysiological parameters, (depolarization, ON and OFF transients, magenta arrows) at day 15-16. **B.** Quantification of the depolarization and ON and OFF transients (Kruskal-Wallis ANOVA followed by Wilcoxon rank-sum test). **C.** Immunofluorescence of the synaptic extremities of photoreceptor neurons expressing BIN1iso1, BIN1iso8, BIN1iso9, dAmphisoA and Luciferase (as a control) under a rh1 driver at day 1 and day 7. BIN1 staining shows the localization of BIN1iso1, BIN1iso9 and BIN1iso8 at the presynaptic terminal at day 1 and day 7. The neuron-specific plasma membrane Na/K ATPase and the actin staining are used to label these structures. At day 7, presynaptic extremities of BIN1iso1-expressing photoreceptor neurons accumulate big vesicles (arrows). **D.** Electron microscopy analysis of synaptic terminals of photoreceptor neurons expressing Luciferase and BIN1iso1 at day 15. Six synaptic terminals (cyan dotted lines) are gathered into a lamina cartridge (yellow dotted lines). Expression of BIN1iso1 resulted in the presence of giant vesicles (*, magenta dotted lines).

Figure 2: BIN1iso1 caused morphological alterations in *Drosophila* NMJs without affecting the number of active zones. **A.** Immunofluorescence of NMJs from 3rd instar larvae expressing BIN1iso1, BIN1iso8, BIN1iso9 and dAmphisoA and Luciferase (control) in motoneurons with the Nsyb promoter. HRP, Dlg and actin labeling are used to label motor neuron terminals, postsynaptic compartments and muscle cells, respectively. Arrowheads show satellite boutons. **B.** Quantification of NMJ morphometric parameters: the number of boutons per NMJ, the mean area of single bouton per NMJ, the cumulative area of all boutons per NMJ and the number of satellite boutons per NMJ. The number of NMJ analyzed per condition are indicated at the bottom of the top left graph. Data were analyzed with a non-parametric Kruskal Wallis test followed by post-hoc Dunn's multiple comparison test (Holm method, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 1.10^{-3}$, **** $p < 1.10^{-4}$, ***** $p < 1.10^{-5}$, ***** $p < 1.10^{-6}$). **C.** Immunofluorescence of NMJs from 3rd instar larvae expressing BIN1iso1, BIN1iso8, BIN1iso9 and dAmphA and Luciferase (control) in motoneurons with the Nsyb promoter. HRP, Brp and actin labeling are used to label the motor neuron terminals, active zones and muscle cells, respectively. Arrowheads show satellite boutons. **D.** Quantification of the number of active zones. Numbers at the bottom of the graph indicate the number of quantified NMJs. Non-parametric Kruskal Wallis analysis did not show any statistically significant difference between conditions.

Figure 3: Rab11 did not prevent BIN1iso1-induced morphological defects at the larval NMJs. **A.** Immunofluorescence of NMJ from 3rd instar larvae expressing BIN1iso1 and/or Rab11 in motoneurons (Nsyb driver). mCD8::GFP and luciferase are used as controls respectively for Rab11::GFP and BIN1iso1. HRP, Dlg and actin labeling are used to label motor neuron terminals, post-synaptic compartments and muscle cells respectively. **B.** Quantification of NMJ morphometric parameters: the number of boutons per NMJ, the mean area of single bouton per NMJ, the cumulative area of all boutons per NMJ and the number of satellite boutons per NMJ. The number of NMJ analyzed per condition are indicated at the bottom of the top left graph. Data were analyzed with a non-parametric Kruskal Wallis test followed by post-hoc Dunn multiple comparison test (Holm method, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 1.10^{-4}$, ***** $p < 1.10^{-6}$).

Figure 4: Presynaptic overexpression of BIN1iso1 induces synaptotoxicity in hippocampal neurons. **A.** Scheme of the custom-design, three-chamber microfluidic devices used to culture primary rat hippocampal neurons. Scale bar = 2 mm. **B.** Representative images of the synaptic network at DIV14. Overexpression of Mock (control), BIN1iso1 or BIN1iso9 vectors in the pre- or postsynaptic neuron chamber is indicated in the left schemes (scale bars = 5 μ m). **C.** Quantification of Synaptophysin (Syp) and Homer spot densities and the fraction of Syp spots assigned by at least one Homer spot, as a measure for synaptic connectivity between the two neuronal populations. In box plots, data points correspond to device means. Fraction of Syp assigned was normalized by the mean of the control group. N = 3 independent cultures each for presynaptic and postsynaptic expression. Kruskal–Wallis ANOVA with Tukey–Kramer correction. * $p < 0.05$. N/S: not significant. a.u.: arbitrary units.

Figure 5: Presynaptic overexpression of BIN1iso1 perturbs the network-level connectivity in hippocampal neurons. **A.** Schematics of the three-chamber microfluidic device integrated with a 256-electrode MEA. Reference electrodes are marked with “R”. **B.** Mosaic image of the MEA-integrated microfluidic device housing rat hippocampal neurons. Cells in the pre- and postsynaptic chambers were lentivirally transduced to express LifeAct-Ruby (red) and PSD95-YFP (green) vectors, respectively, to demonstrate isolated transductions in cell chambers. Scale bar = 2 mm. **C.** Boxed area in panel B at higher magnification. Scale bar = 500 μ m. Zoomed area (C') is 3.4 \times magnified. **D.** A representative map of units identified through the spike-sorting algorithm (gray). One presynaptic unit and three postsynaptic units are color-coded for demonstration purposes. **E.** Spike waveform patterns corresponding to these four color-coded units. **F.** Cross-correlograms and the calculated *pre-post-drive* parameters for the three pre-post unit pairs that can be formed using these four units. **G.** Pre-post-drive histograms for representative microfluidic devices (one device per condition). Lines show the corresponding kernel distribution fits. **H.** Bubble chart showing *pre-post-drive* as a function of numbers of units detected in the pre- and postsynaptic chambers. The unit number ratios were normally distributed among all devices (see Supplementary figure 5), except for those with $|z\text{-score}| > 1.5$ (dark gray). This threshold corresponds to a 4-fold difference in the unit number ratio (broken lines). Outlier data points according to $\text{median} \pm 3 \times \text{MAD}$ are included (light gray). **I-L.** *Pre-post-drive* (I), number of detected units (J), mean firing rate for these units (K) and mean amplitude for these units (L) as a function of BIN1 isoform (or Mock vector) expression in the presynaptic chamber. In box plots, data points refer to individual devices. N = 6 independent cultures. Kruskal–Wallis ANOVA with Tukey–Kramer correction. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$. N/S: not significant.

Figure 1:

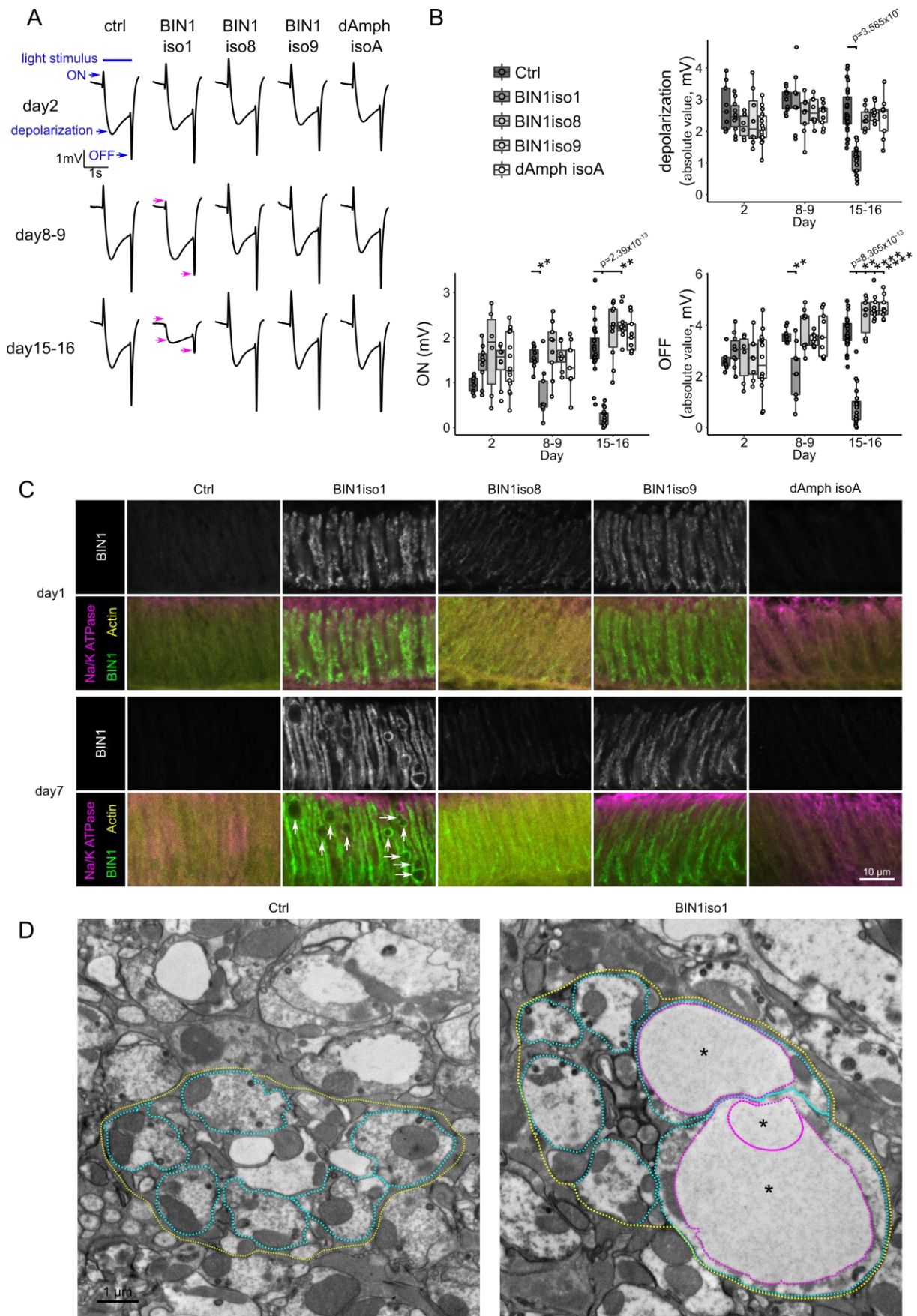


Figure 2:

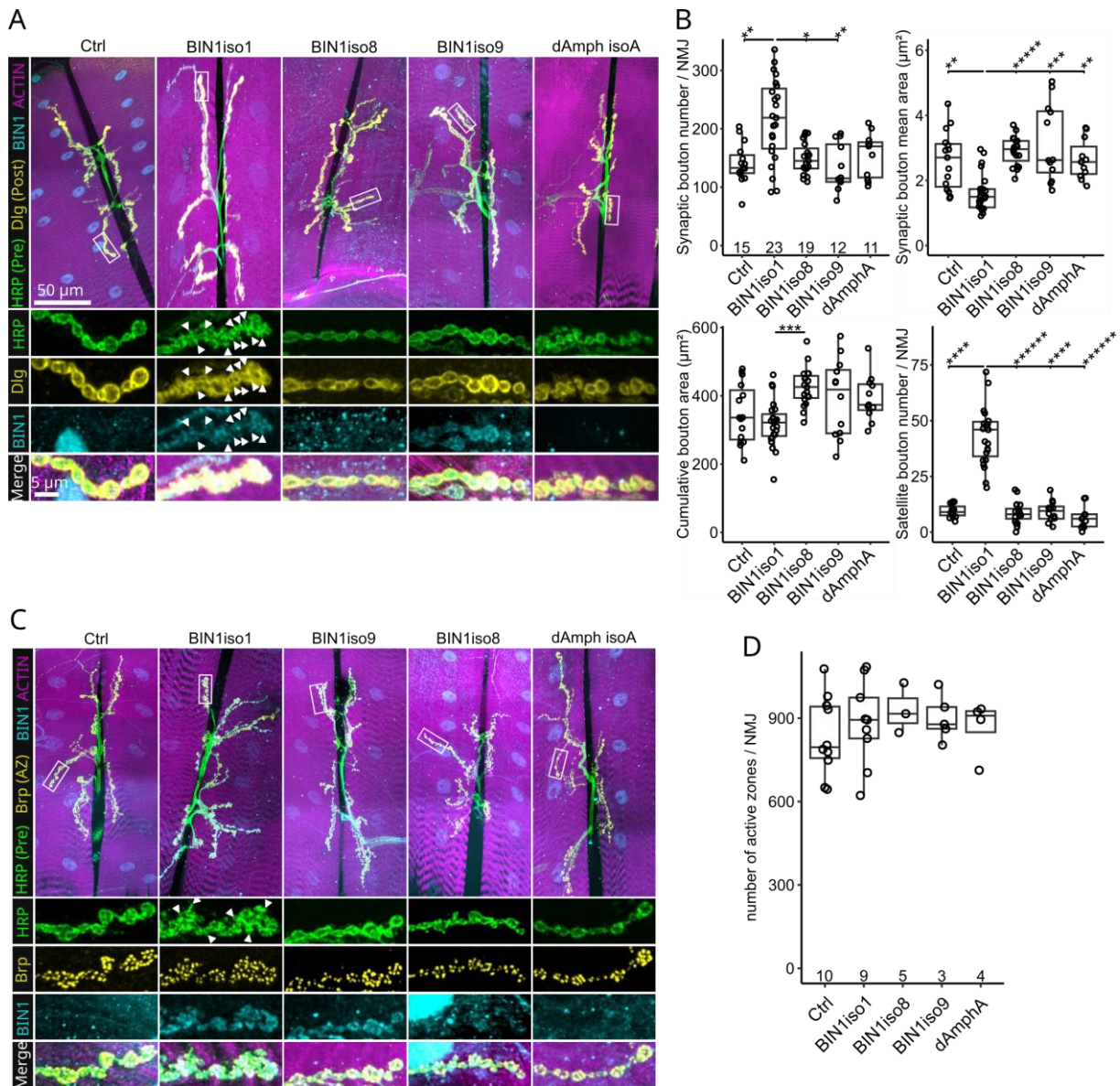


Figure 3:

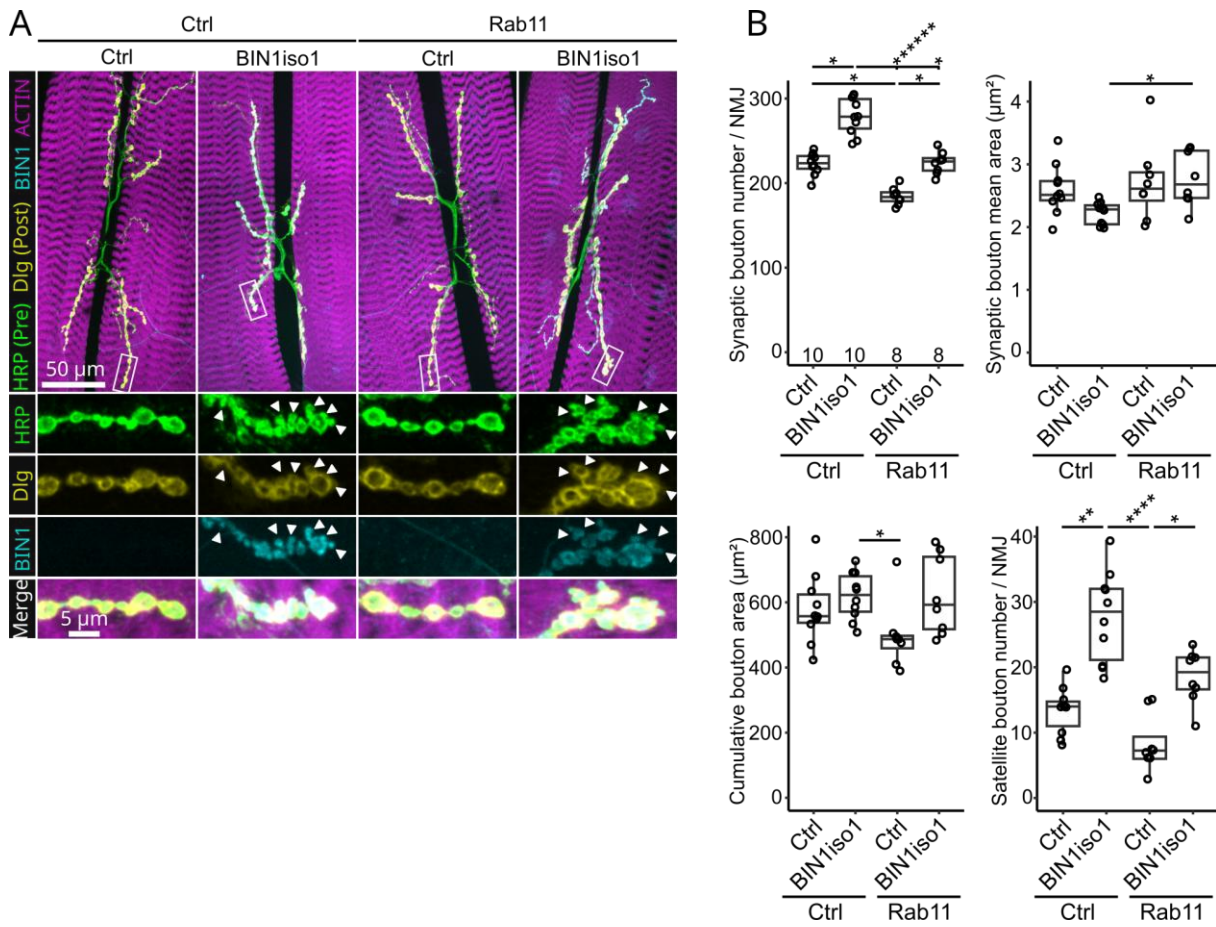


Figure 4:

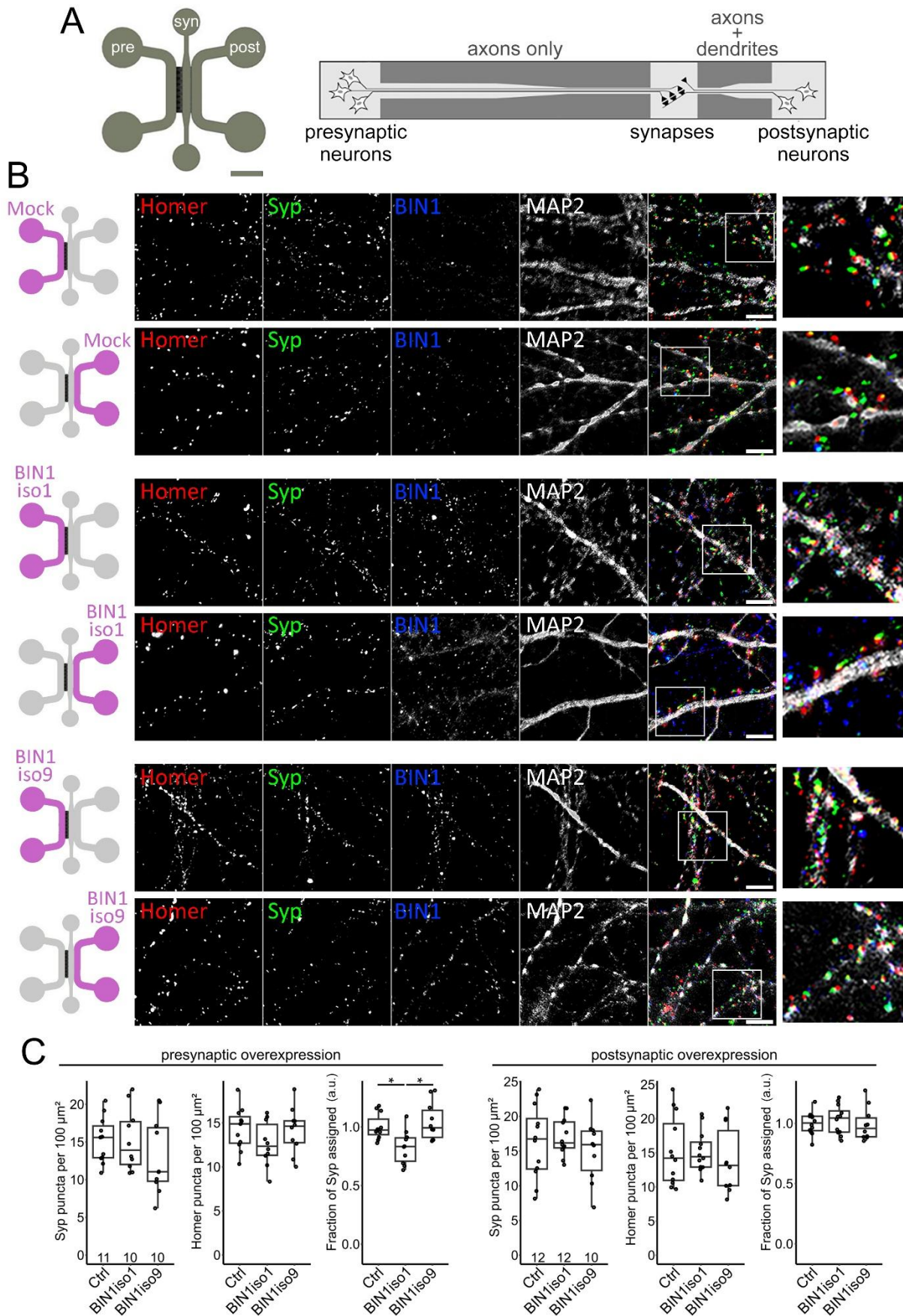


Figure 5:

