



HAL
open science

Altérations des synapses et des corps cellulaires neuronaux chez les souris APPxPS1-KI et dans la Maladie d'Alzheimer

Alexandre Androuin

► **To cite this version:**

Alexandre Androuin. Altérations des synapses et des corps cellulaires neuronaux chez les souris APPxPS1-KI et dans la Maladie d'Alzheimer. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS547 . tel-02924681

HAL Id: tel-02924681

<https://theses.hal.science/tel-02924681>

Submitted on 28 Aug 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 394 Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Institut du Cerveau et de la Moelle épinière - Equipe Maladie d'Alzheimer, maladies à prions

Altérations des synapses et des corps cellulaires neuronaux chez les souris APPxPS1-KI et dans la Maladie d'Alzheimer

Par Alexandre Androuin

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par le Dr. Serge Marty

Présentée et soutenue publiquement le 06 février 2018

Devant un jury composé de :

Dr. Isabelle Dusart	Présidente du jury
Dr. Etienne Herzog	Rapporteur
Dr. Davide Tampellini	Rapporteur
Dr. Lydia Danglot	Examinatrice
Dr. Serge Marty	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr. Isabelle Dusart d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie également le Dr. Etienne Herzog et le Dr. Davide Tampellini d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse.

Je souhaite enfin remercier le Dr. Lydia Danglot d'avoir accepté de participer au jury de thèse en qualité d'examinatrice.

Je tiens à remercier très chaleureusement le Dr. Serge Marty, mon directeur de thèse. Merci de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci pour la qualité de ton encadrement, ta grande disponibilité et les nombreuses discussions tout au long de ces 3 années de thèse. Je te remercie pour tout ce que tu as pu m'apprendre au quotidien et ton soutien. J'ai beaucoup apprécié la passion pour la recherche que tu arrives à communiquer, ta curiosité dans tous les domaines et ta grande gentillesse qui ont marqué ces 3 années qui sont passées bien trop vite.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Dr. Benoît Delatour. Merci de m'avoir accueilli il y a quelques années pour mon stage de 5^e année de Pharmacie et par la suite pour mon stage de Master 2. Je te remercie aussi d'avoir accepté d'encadrer ma thèse de pharmacie. J'ai beaucoup apprécié les discussions scientifiques et tes nombreuses connaissances qui m'ont beaucoup appris au cours de ces années. Je te suis profondément reconnaissant de m'avoir permis de continuer en thèse et je te remercie pour ton soutien et ton encadrement durant toutes ces années au cours de mes différents projets de recherche.

Serge, Benoît, merci pour tous vos enseignements au cours de ces années. J'ai beaucoup appris et apprécié travailler à vos côtés et espère avoir l'occasion de pouvoir retravailler un jour avec vous.

Je tiens à remercier la Fondation France Alzheimer pour leur soutien financier.

Je souhaiterais remercier le Dr. Marie-Claude Potier de m'avoir accueilli dans son équipe. Merci pour tes conseils, ta bonne humeur et ta gentillesse.

Merci à Marie-Claude, Serge et Benoît de m'avoir donné la chance de participer à des congrès nationaux et internationaux.

Je remercie également le Pr. Charles Duyckaerts pour ses remarques, ses conseils et son regard de spécialiste tout au long de l'avancée des projets.

Je souhaiterais remercier le Dr. Brigitte Potier, le Dr. Patrick Dutar et le Dr. Lydia Danglot de m'avoir permis d'assister aux expérimentations d'électrophysiologie et d'extraction biochimique au sein de leur laboratoire.

J'aimerais remercier toute la plateforme d'histologie de l'ICM, avec une pensée toute particulière pour Annick Prigent et Brigitte Zeau dont la bonne humeur et la gentillesse font la renommée de cette plateforme. Merci pour votre expertise et votre disponibilité. J'ai réalisé la majorité de mes expérimentations sur votre plateforme et ai beaucoup apprécié l'ambiance toujours sympathique et chaleureuse qui rend nos longues heures passées sur la paillasse agréables.

Je voudrais aussi remercier la plateforme PICPS, en particulier Dominique Langui et Asha Baskarun pour leur aide précieuse et leur expertise au cours des nombreuses expérimentations de microscopie électronique. Merci pour votre disponibilité et surtout votre bonne humeur.

Je souhaiterais également remercier la plateforme d'animalerie et les animaliers pour leur aide au quotidien.

J'aimerais remercier tout le 5^e étage de l'ICM et toutes les personnes sympathiques rencontrées au cours de ces quelques années passées à l'institut, notamment Nicole, Rolando, Eric, Violetta, Magali, Cynthia, Aude, Julie, Benjamin, Alexandre, Javier, Jaime, Cyril, Nadège, ...

Je souhaiterais remercier le Dr. Virginie Beray-Berthat de m'avoir encouragé dans la voie de la recherche au cours de mes études de pharmacie, sa disponibilité pour répondre à mes interrogations et pour sa bienveillance. Je souhaiterais une nouvelle fois vous remercier, avec le Pr. Isabelle Margail, pour vos enseignements à la faculté de pharmacie qui m'ont donné l'envie de faire de la recherche.

Je souhaiterais remercier très profondément tout mon bureau, le 5.041. Merci Gaëlle pour ta gentillesse sans égale, Alexandra pour ta bonne humeur quotidienne et Christelle pour ces nombreuses rigolades depuis le premier jour où l'aventure a commencé dans ce laboratoire il y a quelques années. Merci également à Arthur pour ton passage mémorable dans le bureau. Enfin, merci à Manon, la dernière arrivée, pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Merci pour tous ces moments agréables passés en votre compagnie, ces rigolades quotidiennes, ces pauses café, ces virées en congrès, ces apéros, ces chansons et autres envolées lyriques ... Je n'aurais pas rêvé meilleure ambiance pour effectuer une thèse. Merci pour votre soutien et votre amitié. Ce n'est pas sans émotion que je vais quitter ce bureau et n'arrive pas encore à imaginer ne plus vous voir au quotidien et travailler dans une autre ambiance que celle créée ici.

Je remercie sincèrement tous les membres de l'équipe Alzheimer, actuels et anciens : Luce, Yah-Sé, Tengfei, Ihsen, Susanna, Laura, Linda, Lydie. Merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse. Merci pour votre aide et vos conseils au cours des différentes expériences, en particulier Ihsen pour tes nombreuses formations en expérimentation animale.

Je remercie également les membres de l'équipe Prion, notamment Sofian, Valéria, Sébastien, Alexianne, Nicolas et Etienne, pour votre gentillesse et votre sympathie.

Enfin, je tiens à remercier mes proches pour leur soutien tout au long de mes études et dans la réalisation de cette thèse.

A mes amis de la faculté de pharmacie, Christelle, Claire A., Claire C., Margaux, MFM, Marie G., Nam et Xavier pour toutes ces années partagées sur les bancs de la fac. Je vous remercie pour votre présence indéfectible tout au long de ces années, vous étiez déjà présent à ma thèse de pharmacie et l'êtes encore aujourd'hui.

A mes amis de Rouen, Charlotte, Damien, Marie-Olivia, Pierre, Maxime, Manu, Elisa, Max.

A Anne-Fleur pour tes encouragements tout au long de la thèse et ta présence dans ces derniers moments de rédaction.

A mes parents, ma sœur et ma famille pour vos conseils, votre écoute et votre amour. Merci de m'avoir soutenu durant toutes mes études et pendant cette thèse (promis, ça devrait être la dernière !).

Table des matières

Abréviations	11
Liste des figures	15
Résumé	19
Abstract	21
INTRODUCTION	23
I. La Maladie d'Alzheimer	25
I. 1. Présentation de la Maladie d'Alzheimer	25
I. 1. 1. <i>L'épidémiologie</i>	25
I. 1. 2. <i>La clinique</i>	26
I. 1. 3. <i>La génétique</i>	28
I. 2. Physiopathologie de la Maladie d'Alzheimer	30
I. 2. 1. <i>Les lésions par accumulation</i>	30
a. Le peptide amyloïde	30
b. La protéine tau.....	33
c. La toxicité des accumulations de protéines chez les patients et dans les modèles de Maladie d'Alzheimer	37
I. 2. 2. <i>Les lésions par perte</i>	41
a. L'atrophie cérébrale.....	41
b. La perte de neurone	43
c. La perte de synapses.....	44
II. Rôle des altérations du fonctionnement synaptique dans les pertes de synapses	46
II. 1. La synapse	46
II. 2. L'épine dendritique.....	47
II. 2. 1. <i>La structure de l'épine dendritique</i>	47
a. La Densité Post-Synaptique.....	48
b. Les différentes morphologies de l'épine	49
c. Rôle de l'actine et ses partenaires dans la forme des épines.....	51
II. 2. 2. <i>Les rôles de la forme de l'épine dendritique</i>	52
a. La plasticité synaptique	53
b. La compartimentalisation biochimique	54
c. La compartimentalisation électrique.....	55
II. 3. La transmission synaptique glutamatergique.....	57
II. 3. 1. <i>La transmission synaptique basale</i>	57
II. 3. 2. <i>La plasticité synaptique</i>	59
a. La potentialisation à long terme	59
b. La dépression à long terme.....	61
II. 4. Altérations du fonctionnement synaptique dans les modèles de Maladie d'Alzheimer	62
II. 4. 1. <i>Effets du peptide Aβ sur les récepteurs au glutamate</i>	63
II. 4. 2. <i>Effets du peptide Aβ sur la transmission synaptique</i>	63

II. 4. 3. Effets du peptide A β sur la plasticité synaptique.....	64
II. 4. 4. Hypothèse de la dépression synaptique à l'origine des pertes de synapses .	64
III. Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans les pertes de neurones et de synapses	66
III. 1. Le stress du réticulum endoplasmique	66
III. 1. 1. Le métabolisme des protéines.....	66
III. 1. 2. Le stress du réticulum endoplasmique	68
III. 1. 3. Les mécanismes du stress du réticulum endoplasmique.....	69
a. IRE1	70
b. ATF6.....	70
c. PERK.....	71
III. 1. 4. Le stress du réticulum endoplasmique et la mort cellulaire.....	74
III. 1. 5. Implication de la phosphorylation d'eIF2 α dans la plasticité synaptique et la mémoire	76
III. 2. Le stress du réticulum endoplasmique dans la Maladie d'Alzheimer.....	77
III. 3. Implication du stress du réticulum endoplasmique dans les pertes de neurones et de synapses dans des modèles de maladies neurodégénératives.....	79
III. 3. 1. Un stress du réticulum endoplasmique est observé dans des modèles de maladie d'Alzheimer.....	79
III. 3. 2. Le stress du réticulum endoplasmique module la plasticité synaptique et la mémoire dans des modèles de Maladie d'Alzheimer	80
III. 3. 3. Le stress du réticulum endoplasmique induit une perte de neurones et de synapses dans des modèles de maladies neurodégénératives	81
IV. Rôle des altérations du système lysosomal dans les pertes de neurones et de synapses	85
IV. 1. La physiologie des lysosomes.....	85
IV. 1. 1. La structure des lysosomes	85
IV. 1. 2. Les fonctions des lysosomes.....	87
IV. 1. 3. La régulation des lysosomes.....	89
IV. 2. Rôle du système endo-lysosomal dans la dégradation de l'APP et la production d'A β	90
IV. 3. Les altérations du système lysosomal dans la Maladie d'Alzheimer.....	93
IV. 4. Implication des altérations du système lysosomal dans les pertes de neurones et de synapses dans des modèles de maladies neurodégénératives.....	96
IV. 4. 1. Les altérations du système lysosomal dans des modèles de Maladie d'Alzheimer.....	96
IV. 4. 2. Implication des altérations du système lysosomal dans la pathogénicité de modèles de la Maladie d'Alzheimer	98
IV. 4. 3. Implication des altérations du système lysosomal dans les pertes de neurones et de synapses dans des modèles de maladies neurodégénératives.....	100
RESULTATS	103
I. Altérations précoces des épines dendritiques chez les souris APPxPS1-KI	110
II. Altérations lysosomales chez les souris APPxPS1-KI et chez les patients atteints de Maladie d'Alzheimer.....	147

II. 1. Matériels et méthodes	148
II. 2. Résultats.....	151
DISCUSSION	159
I. Absence d'implication du stress du réticulum endoplasmique	162
II. Absence d'implication d'une dépression de la transmission synaptique	164
III. Altération de la plasticité et de la morphologie des épines dendritiques	165
IV. Mécanisme potentiel de l'altération de la morphologie des épines dendritiques 	168
V. Implication d'un dysfonctionnement lysosomal	170
Références bibliographiques.....	177

Abréviations

AD	Alzheimer's Disease
ADAM	A Disintegrin and Metalloprotease
ADF	Actin Depolymerizing Factor
AICD	APP Intracellular Domain
AMPA	Acide α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique
APH-1	Anterior Pharynx defective 1
APOE	Apolipoprotéine E
APP	Amyloid Protein Precursor
APP-CTF	APP-C-Terminal Fragment
APPxPS1-KI	Amyloid Protein Precursor x Presenilin 1 Knock-In
ATF6	Activation Transcription Factor 6
A β	Amyloid β
BACE1	Beta-site APP-Cleaving Enzyme 1
BiP	Binding immunoglobulin Protein
CaMKII	Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase II
cdk5	cyclin-dependent kinase
CHOP	C/EBP Homologous Protein
DLT	Dépression à Long Terme
DNF	Dégénérescence Neurofibrillaire
DPS	Densité Post Synaptique
DR5	Death Receptor 5
E/L-LTP	Early/Late Long-Term Potentiation
eIF2 α	eukaryotic Initiation Factor 2 α
EOAD	Early-Onset Alzheimer's Disease
ER	Endoplasmic Reticulum
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
ERO1 α	ER oxidase 1 α

FAD	Familial Alzheimer's Disease
fEPSPs	field Excitatory Post Synaptic Potentials
GABA	Gamma-Aminobutyric Acid
GADD34	Growth Arrest and DNA Damage-inducible 34
GCN2	General Control Non-derepressible-2
GFP	Green Fluorescent Protein
GRP94	Glucose Regulated Protein 94
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HRI	Heme-Regulated Inhibitor
IRE1	Inositol Requiring Enzyme 1
ISR	Integrated Stress Response
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinase
KI	Knock-In
Lamp-1	Lysosome-associated membrane protein 1
LOAD	Late-Onset Alzheimer's Disease
LSD	Lysosomal Storage Disease
LTD	Long-Term Depression
LTP	Long-Term Potentiation
LV-GADD34-GFP	Lentivirus expressing both GADD34 and GFP
LV-GFP	Lentivirus expressing GFP alone
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	Microtubule Associated Protein
MARK	Microtubule-Affinity Regulating Kinases
mEPSCs	miniature Excitatory Post Synaptic Currents
mGluR	récepteurs glutamatergiques métabotropiques
mTORC1	mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
NBQX	non-NMDAR antagonist 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzoquinoxaline-7-sulfonamide »
NFTs	Neurofibrillary tangles
NMDA	<i>N</i> -Méthyl-D-Aspartate

OD	Optical Density
PDI	Protein Disulfide Isomerase
PDPK	Proline-Directed Protein Kinases
PEN-2	Presenilin Enhancer 2
PERK	double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)–like ER kinase
PFV	Presynaptic Fiber Volley
PHF	Paired Helical Filament
PKA	cyclic-AMP-dependent kinase
PKR	Protein Kinase double-stranded RNA-dependent
PLT	Potentialisation à Long Terme
PPF	Paired-Pulse Facilitation
PS1	presenilin 1
PS1-KI	presenilin 1 knock-in
PS2	presenilin 2
PSD	Post-Synaptic Density
RE	Réticulum Endoplasmique
Rneck	electrical resistance of spine necks
S1P / S2P	Site-1 Protease / Site-2 Protease
TFEB	Transcription Factor EB
TRAF2	Tumour necrosis factor Receptor (TNFR)-Associated Factor-2
TRB3	Tribbles homolog 3
TTX	Tetrodotoxin
UPR	Unfolded Protein Response
UPS	Ubiquitin Proteasome System
XBP1	X-box Binding Protein 1

Liste des figures

Figure 1. Evolution clinique de la Maladie d'Alzheimer	27
Figure 2. Accumulation de peptide $A\beta$ dans la Maladie d'Alzheimer	31
Figure 3. Les différentes voies du métabolisme de l'APP et la production d' $A\beta$	32
Figure 4. La progression de la pathologie amyloïde dans la Maladie d'Alzheimer	33
Figure 5. Accumulation de protéine tau dans la Maladie d'Alzheimer	34
Figure 6. La formation des dégénérescences neurofibrillaires de protéine tau	36
Figure 7. La progression de la pathologie tau dans la Maladie d'Alzheimer	37
Figure 8. L'hypothèse de la cascade amyloïde.....	38
Figure 9. Une autre topographie du peptide amyloïde : l'accumulation intracellulaire d' $A\beta$	41
Figure 10. La composition de la synapse chimique excitatrice et inhibitrice	48
Figure 11. Les différentes morphologies de l'épine dendritique	50
Figure 12. Le cytosquelette d'actine définit la morphologie des épines.....	52
Figure 13. Le cytosquelette d'actine dans les changements de structure de l'épine dendritique pendant les processus de plasticité synaptique	54
Figure 14. La compartimentalisation électrique et biochimique de l'épine.....	56
Figure 15. La plasticité synaptique.....	61
Figure 16. Le métabolisme des protéines dans le Réticulum Endoplasmique.....	67
Figure 17. Les trois voies du stress du réticulum endoplasmique.....	72
Figure 18. La réponse intégrée au stress	73
Figure 19. Stress du réticulum endoplasmique et apoptose	75
Figure 20. Stress du réticulum endoplasmique dans la Maladie d'Alzheimer et dans d'autres maladies neurodégénératives.....	78
Figure 21. Structure d'un lysosome.....	86
Figure 22. La fonction de dégradation des lysosomes	88
Figure 23. La régulation des lysosomes par TFEB	89
Figure 24. Le système endo-lysosomal dans la dégradation de l'APP et la production d' $A\beta$	92

Figure 25. La localisation subcellulaire des présénilines pourrait déterminer les sites de production d'A β intracellulaire	93
Figure 26. Sites d'accumulation intracellulaire d'A β dans la Maladie d'Alzheimer	94
Figure 27. Accumulation d'A β dans des organelles élargies de souris APPxPS1-KI	152
Figure 28. Présence d'inclusions fibrillaires dans les lysosomes tertiaires de souris APPxPS1-KI	153
Figure 29. Altération des lysosomes spécifiquement dans les souris APPxPS1-KI	155
Figure 30. Accumulation de granules de lipofuscine dans les biopsies de patients atteints de Maladie d'Alzheimer	156
Figure 31. Les anneaux d'actine périodique sous-tendent la constriction du cou des épines	169

Résumé

La Maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui se définit par le développement progressif de pertes de mémoire et de troubles cognitifs évoluant vers une démence. Cette maladie se caractérise par une perte progressive de synapses et de neurones. La perte de synapses est un marqueur précoce, précédant la perte de neurones et corrélant de façon significative avec le déclin cognitif des patients. Comment le peptide amyloïde (A β) issu du clivage de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) peut induire ces pertes est toujours sujet à débat. Nous avons étudié ce mécanisme dans les souris APP x presenilin 1 knock-in (APPxPS1-KI) qui développent une perte de neurones dans le champ CA1 de l'hippocampe. Ces souris présentent une production importante d'A β qui se traduit par une accumulation accélérée de plaques amyloïdes extracellulaires et d'A β intracellulaire. Nous avons montré que la perte de neurones est précédée d'une perte de synapses dans la stratum radiatum du champ CA1 de l'hippocampe. Cette perte s'accompagne d'un élargissement des densités post-synaptiques des synapses restantes, de façon similaire à la pathologie humaine.

Nous avons montré que ces pertes ne sont pas induites par un stress du réticulum endoplasmique, et n'avons pas observé de dépression de l'activité synaptique ou d'augmentation de la dépression à long terme. Par contre, un déficit de potentialisation à long terme est observé de façon précoce, associé à des troubles de la mémoire spatiale, avant la perte de neurones et de synapses. Ces altérations coïncident avec une modification de la morphologie des épines dendritiques, dont la longueur est diminuée et la largeur du cou augmentée. Des altérations similaires de la morphologie des épines sont observées dans les biopsies de patients atteints de MA. Dans les souris, des simulations indiquent que ces altérations modifient la compartimentalisation électrique et biochimique de l'épine, potentiellement impliquée dans la potentialisation à long terme.

Dans les corps cellulaires des souris APPxPS1-KI, une accumulation d'A β est observée dans les lysosomes. Une modification du système lysosomal est également observée dans les biopsies de patients qui présentent une accumulation de granules de lipofuscine. Par des immunomarquages dirigés contre les lysosomes, nous avons montré que le système lysosomal est altéré spécifiquement dans les souris APPxPS1-KI, et pas dans les souris transgéniques APP qui ne développent pas de perte de neurones et de synapses. Les altérations du système lysosomal pourraient donc être impliquées dans les pertes de synapses et de neurones.

Abstract

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disease defined by a progressive loss of memory and cognitive troubles evolving toward dementia. AD is characterized by a progressive loss of synapses and neurons. The loss of synapses is an early pathological marker, preceding the loss of neurons and being the best correlate of the cognitive decline in patients. How the Amyloid Protein Precursor (APP) cleavage product Amyloid β ($A\beta$) can trigger synapse and neuron loss remains debated. We investigated this mechanism in APP x presenilin 1 knock-in (APPxPS1-KI) mice that were previously shown to present with a loss of pyramidal neurons in the CA1 hippocampus. These mice displayed an important production of $A\beta$ resulting in an accelerated accumulation of extracellular amyloid plaques and intracellular $A\beta$. We showed that the loss of neurons was preceded by a loss of synapses in the CA1 stratum radiatum. This loss was accompanied by an enlargement of the remaining postsynaptic structures like the postsynaptic densities, as observed in the human pathology.

We showed that these losses were not induced by an endoplasmic reticulum stress, and we did not observe a depression of synaptic activity or an increase of long-term depression. By contrast, an early deficit in long-term potentiation was observed, associated to troubles in spatial memory, before the loss of neurons and synapses. These alterations were along with a modification in the morphology of the dendritic spines, whose length was decreased and neck diameter increased. Similar alterations of dendritic spine morphology were observed in biopsies from AD patients. In mice, simulations indicated that these morphological alterations modified electrical and biochemical compartmentalization of the spine, potentially implicated in long-term potentiation.

In neuronal cell bodies of APPxPS1-KI mice, an accumulation of $A\beta$ was observed in the lysosomes. A modification of the lysosomal system was also observed in biopsies from AD patients displaying an accumulation of lipofuscin granules. Immunostainings of lysosomes revealed an alteration of the lysosomal system specifically in APPxPS1-KI mice, which was not observed in transgenic APP mice with no loss of neurons and synapses. Alterations of the lysosomal system could be implicated in the loss of neurons and synapses.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. La Maladie d'Alzheimer

La Maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par le développement de pertes de mémoire associées à des troubles cognitifs et comportementaux. L'aggravation progressive de ces troubles porte atteinte aux activités quotidiennes des patients et se traduit par le développement d'une démence. Différents marqueurs anormaux de la maladie ont été mis en évidence, dont l'implication relative dans la physiopathologie reste débattue. Actuellement, seuls des traitements symptomatiques sont disponibles, bien que leur efficacité sur la progression de la maladie soit discutée. Avec le vieillissement accru de la population et l'absence de traitements efficaces, la Maladie d'Alzheimer représente un problème majeur de santé publique. L'identification du mécanisme responsable des dégénérescences dans la Maladie d'Alzheimer est nécessaire pour orienter le développement de nouveaux traitements ciblant les causes de la maladie.

I. 1. Présentation de la Maladie d'Alzheimer

I. 1. 1. L'épidémiologie

La Maladie d'Alzheimer (MA) est la cause la plus commune de démence liée à l'âge. Aujourd'hui, plus de 35 millions de personnes dans le monde seraient touchées par une démence. Parmi ces cas, entre 50 à 75% seraient dus à la Maladie d'Alzheimer, portant à plus de 24 millions le nombre total de personnes atteintes (Mayeux and Stern, 2012; Prince and Jackson, 2009). Avec le vieillissement de la population, il est estimé que le nombre de personnes atteintes de démence devrait doubler tous les 20 ans, et dépasser 115 millions en 2050 (Prince et al., 2013). En France, plus de 850 000 personnes sont atteintes de démence, avec 225 000 nouveaux cas par an (Inserm, 2007).

Le principal facteur de risque est l'âge (Prince et al., 2013; Tarawneh and Holtzman, 2012), comme le suggère l'augmentation de l'incidence et de la prévalence de la maladie avec l'âge (Mayeux and Stern, 2012; Prince et al., 2013). Le décès du patient survient moins de 10 ans après le diagnostic, généralement suite à des affections infectieuses, respiratoires ou une inanition générale (Tarawneh and Holtzman, 2012). Le coût total en dépense de santé dans cette affection dans le monde dépasse les 604 milliards de dollars en 2010 (Wimo and Prince, 2010).

I. 1. 2. La clinique

La Maladie d'Alzheimer se définit par le développement d'une démence progressive caractérisée par des déficits mnésiques et des perturbations cognitives, comportementales et neuropsychiatriques portant atteintes aux activités quotidiennes des patients (Cummings, 2004). L'évolution de la maladie suit différents stades cliniques selon la sévérité des symptômes (Fig. 1).

Le stade pré-symptomatique correspond au stade où les fonctions cognitives sont normales. Une longue période asymptomatique est observée entre le début du développement des lésions neuropathologiques et l'apparition des symptômes. Cette phase pourrait mettre en jeu des phénomènes de compensation neuronale (hyperactivité neuronale, réserve cognitive) qui une fois dépassés signent l'apparition des symptômes (Dubois et al., 2002).

La phase prodromale, ou trouble cognitif léger (« Mild Cognitive Impairment » ou MCI), correspond au stade d'apparition des premiers symptômes qui ne sont pas assez importants pour perturber les activités quotidiennes des patients.

Dans les stades précoces, la mémoire épisodique est la plus touchée et responsable des premiers symptômes (Gold and Budson, 2008; Tarawneh and Holtzman, 2012). Les patients souffrent d'un syndrome amnésique de type hippocampique (Dubois et al., 2009), avec une perturbation de la mémorisation de nouvelles informations (amnésie antérograde) et du rappel d'informations récentes (amnésie rétrograde). Le rappel d'informations plus anciennes reste quant à lui relativement épargné (Budson and Price, 2005; Gold and Budson, 2008; Tarawneh and Holtzman, 2012). Des troubles de la mémoire sémantique peuvent s'ajouter, responsables de perturbations du langage et de difficultés à nommer certains objets. Les mémoires

procédurales et de travail sont quant à elles moins touchées à ce stade. Des troubles cognitifs progressifs peuvent être associés tels que des perturbations des capacités verbales (aphasie), motrices (apraxie) et de la perception (agnosie), notamment une incapacité de reconnaître la maladie (anosognosie) ou ses proches (prosopagnosie). De plus, des difficultés dans les fonctions exécutives (planification, organisation) ainsi que des désorientations spatiales et temporelles sont également présentes. Enfin, des modifications de la personnalité et du comportement (apathie) sont observées, pouvant être associées à des symptômes dépressifs (Budson and Price, 2005; Gold and Budson, 2008; Tarawneh and Holtzman, 2012).

Dans les stades modérés à plus tardifs, les déficits vont se propager à d'autres aires cognitives responsables d'un déclin progressif dans les fonctions cognitives et des perturbations fonctionnelles plus sévères. Ce déclin cognitif, associé à des pertes de mémoire et des troubles des fonctions exécutives plus importants, est responsable d'une augmentation de la dépendance aux autres dans les activités quotidiennes marquant le stade final de démence (Tarawneh and Holtzman, 2012). Les patients vont développer des symptômes neuropsychiatriques caractéristiques des symptômes de démence dans 60 à 80% des cas (agressivité, agitation, dépression, anxiété, psychoses avec illusions et hallucinations) (Jalbert et al., 2008).

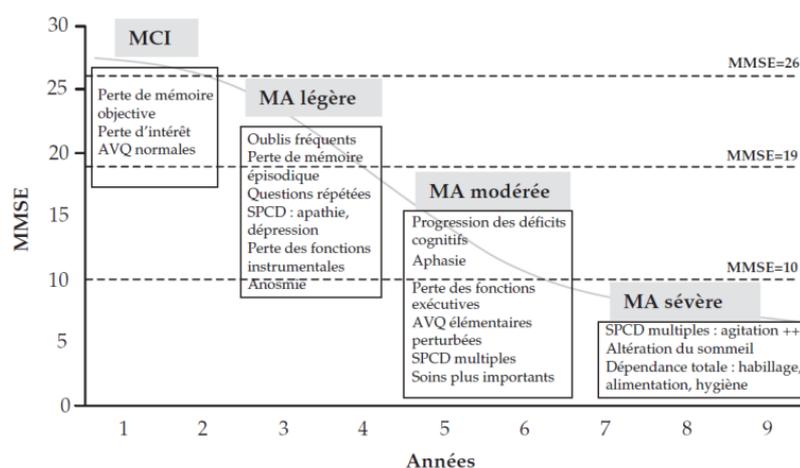


Figure 1. Evolution clinique de la Maladie d'Alzheimer

Evolution des symptômes au cours du temps et dans les différents stades de la maladie (MMSE, Mini-Mental State Examination : score évaluant les fonctions cognitives. Plus le score est faible, plus les troubles cognitifs sont importants ; MA : Maladie d'Alzheimer ; AVQ : activités de la vie quotidienne ; SPCD : Symptômes psychologiques et comportementaux des démences) (d'après Inserm, 2007).

I. 1. 3. La génétique

Différentes formes de la Maladie d'Alzheimer peuvent être définies selon l'âge d'apparition avec d'une part les formes familiales d'apparition précoce et d'autre part les formes sporadique d'apparition tardive (Bekris et al., 2010; Bertram et al., 2010).

Les formes familiales précoces de la Maladie d'Alzheimer (« Early-Onset Alzheimer's Disease » EOAD) apparaissent avant l'âge de 60-65 ans et représentent moins de 1% des cas (Campion et al., 1999). Elles possèdent une transmission autosomique dominante associée à trois gènes. Des mutations dans ces gènes sont responsables d'une augmentation de la production et de la capacité d'agrégation du peptide amyloïde β ($A\beta$), une protéine retrouvée dans les plaques amyloïdes caractéristiques de la pathologie (Bertram et al., 2010; Scheuner et al., 1996).

- Des mutations dans le gène codant pour la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) ont été identifiées (Glenner and Wong, 1984; Goate et al., 1991; Kang et al., 1987; St George-Hyslop et al., 1992; Tanzi et al., 1987). Le clivage de cette protéine est responsable de la production d' $A\beta$ caractéristique de la maladie. Les mutations dans ce gène comptent pour 10-15% des cas de formes familiales précoces (Bekris et al., 2010). Ce gène se situe sur le chromosome 21 (Goate et al., 1991; Goldgaber et al., 1987; St George-Hyslop et al., 1992; Tanzi, 2012; Tanzi et al., 1987). C'est pourquoi un développement précoce de dépôts amyloïdes, de caractéristiques neuropathologiques de la Maladie d'Alzheimer et d'une démence est observé chez les patients atteints de trisomie 21, avec 3 copies du gène de l'APP (Millan Sanchez et al., 2012; Wisniewski et al., 1985).

Beaucoup de mutations de ce gène ont été associées à des formes familiales de la maladie, comme la mutation « swedish » (APP^{swe}) ou « arctic » (APP^{arc}) responsables respectivement d'une augmentation du clivage de l'APP ou d'une augmentation de l'agrégation de l' $A\beta$ (Haass et al., 1995; Nilsberth et al., 2001). Des duplications du locus de l'APP ont également été observées dans quelques familles présentant des formes précoces de Maladie d'Alzheimer et une accumulation importante d' $A\beta$ (Rovelet-Lecrux et al., 2006). A noter que récemment, une mutation dans le gène de l'APP a été identifiée comme protectrice contre la Maladie d'Alzheimer, et contre le déclin cognitif dans une population âgée sans Maladie

d'Alzheimer (Jonsson et al., 2012). Cette mutation, responsable d'une diminution de la formation de peptides amyloïdogéniques *in vitro*, confirme l'implication du gène de l'APP dans la Maladie d'Alzheimer.

- Des mutations dans les gènes Préséniline 1 (Sherrington et al., 1995) et Préséniline 2 (Levy-Lahad et al., 1995a, 1995b) (PS1 et PS2) ont été identifiées comme étant responsable du développement précoce de la Maladie d'Alzheimer. Ces gènes, situés respectivement sur le chromosome 14 et 1, codent les composants majeurs du complexe enzymatique impliqué dans le clivage de l'APP par la γ -sécrétase et responsable de la production d'A β (De Strooper and Annaert, 2010; De Strooper et al., 1998). Ces mutations induisent une augmentation de la production d'A β à 42 acides aminés (Citron et al., 1997; Price et al., 1998) et correspondent à la cause la plus commune des formes familiales (Bekris et al., 2010; De Strooper and Annaert, 2010).

Les formes tardives (« Late-Onset Alzheimer's Disease » LOAD), apparaissant après 60-65 ans, représentent la majorité des cas de Maladie d'Alzheimer. Ces formes impliquent l'association de plusieurs facteurs, génétique et environnementaux (Tanzi, 2012). Le seul variant génétique considéré comme un facteur de risque pour les formes sporadiques de la maladie est l'allèle ϵ 4 du gène de l'apolipoprotéine E (APOE) (Strittmatter et al., 1993). Ce gène est situé sur le chromosome 19 et code pour l'apolipoprotéine E, une protéine impliquée dans la distribution et le métabolisme du cholestérol. L'isoforme APOE4 apparaît moins efficace dans la clairance de l'A β que les autres isoformes et est associé à un nombre de dépôts amyloïdes sous forme de plaques plus important (Castellano et al., 2011; Liu et al., 2013a). Au contraire, les génotypes APOE2 et APOE3 sont associés à un risque plus faible de développer une Maladie d'Alzheimer (Corder et al., 1993). Le génotype APOE4 constitue ainsi le facteur de risque le plus important pour la Maladie d'Alzheimer (Corder et al., 1993; Liu et al., 2013a). Récemment, par des études de type « Genome Wide Association Studies » (GWAS), d'autres gènes ont été identifiés comme associés à la Maladie d'Alzheimer, comme par exemple les gènes « CD33 molecule ou siglec 3 » (CD33), « clusterin » (CLU), « phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein » (PICALM), « complement component (3b/4b) receptor 1 » (CR1) ou encore « bridging integrator 1 » (BIN 1) (Bertram et al., 2010; Harold et al., 2009; Lambert et al., 2009; Seshadri et al., 2010; Tanzi, 2012).

I. 2. Physiopathologie de la Maladie d'Alzheimer

Les altérations neuropathologiques observées dans la Maladie d'Alzheimer peuvent être classées selon des lésions dites par accumulation, correspondant aux plaques amyloïdes formées de peptide amyloïde et aux dégénérescences neurofibrillaires de protéine tau, et des lésions dites par perte, définies par des pertes de neurones et de synapses (Duyckaerts et al., 2009).

I. 2. 1. Les lésions par accumulation

a. Le peptide amyloïde

La Maladie d'Alzheimer se caractérise notamment par l'accumulation extracellulaire de plaques amyloïdes. Ces dépôts sont principalement formés de l'accumulation de peptide amyloïde β (A β) (Fig. 2A) (Glennner, 1980; Glennner and Wong, 1984; Masters et al., 1985). D'autres types d'accumulations de ce peptide peuvent également être observées dans les cerveaux des patients comme des dépôts diffus dans le parenchyme ou des accumulations dans les vaisseaux (Fig. 2B) (Delaère et al., 1991; Duyckaerts et al., 2009). Le peptide A β identifié par Glennner et Wong en 1984 (Glennner and Wong, 1984) est issu du clivage protéolytique successif de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (De Strooper, 2010; Glennner and Wong, 1984; Haass and Selkoe, 1993). L'APP est une protéine transmembranaire dont le métabolisme peut suivre deux voies : une voie non-amyloïdogénique et une voie amyloïdogénique (Haass and Selkoe, 1993; Kang et al., 1987).

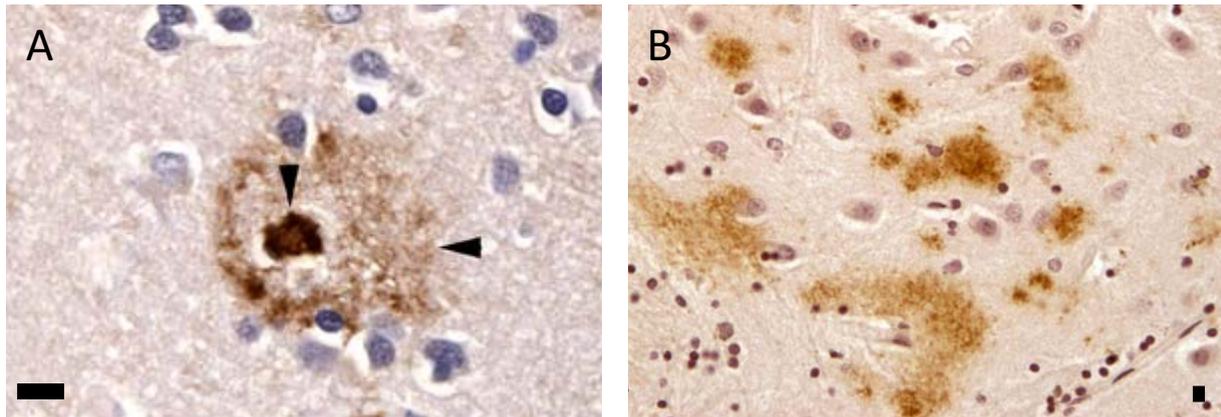


Figure 2. Accumulation de peptide A β dans la Maladie d'Alzheimer

Différents types d'accumulation d'A β extracellulaire dans les cerveaux de patients atteints de Maladie d'Alzheimer, mis en évidence par un immunomarquage contre l'A β (modifiée de (Duyckaerts et al., 2009).

A. Plaque amyloïde constitué d'un dépôt focal entouré d'un halo et d'une couronne d'A β légèrement marquée.

B. Dépôts diffus d'A β . Barre d'échelle en A-B : 10 μ m.

Dans la voie non-amyloïdogénique, l'APP est tout d'abord clivé par une α -sécrétase responsable de la sécrétion d'un fragment sAPP α dans le milieu extracellulaire (Fig. 3A) (Haass and Selkoe, 1993). De ce clivage subsiste un fragment C-terminal de l'APP formé de 83 acides aminés (APP-CTF α ou C83) qui est maintenu dans la membrane puis clivé par une γ -sécrétase. Ce dernier clivage induit la libération d'un fragment appelé p3 et du domaine intracellulaire de l'APP (« APP intracellular domain » ou AICD). Beaucoup de membre de la famille des enzymes « A disintegrin and metalloprotease » (ADAM) sont impliquées dans la voie non-amyloïdogénique par leur activité α -sécrétase (De Strooper, 2010). Le clivage par l' α -sécrétase se produit dans la séquence du peptide amyloïde, ce qui empêche toute formation d'A β par cette voie (Sisodia et al., 1990). Le fragment sAPP α sécrété dans cette voie possède des propriétés neuroprotectrices et favorise l'activité synaptique (Bandyopadhyay et al., 2007; Chasseigneaux and Allinquant, 2012; De Strooper, 2010).

Dans la voie amyloïdogénique, l'APP est clivé initialement par une β -sécrétase (« Beta-site APP-Cleaving Enzyme 1 », BACE 1) (Fig. 3A) (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). Cette enzyme clive l'APP au niveau de son domaine extracellulaire. Le fragment C-terminal de l'APP formé de 99 acides aminés (APP-CTF β ou C99) est maintenu dans la membrane puis clivé par une γ -sécrétase. Cette dernière est formée d'un complexe d'enzymes composé de la préséniline 1 ou 2, de la nicastrine, de l'« anterior pharynx defective 1 »

(APH-1) et du « presenilin enhancer 2 » (PEN-2) (De Strooper, 2010; De Strooper and Annaert, 2010; Takasugi et al., 2003). Ce complexe est responsable de la libération du peptide amyloïde β et de l'AICD. La localisation subcellulaire précise du métabolisme de l'APP et de la production de l'A β n'est pas encore bien définie mais semble impliquer le système endo-lysosomal (Rajendran and Annaert, 2012). La γ -sécrétase clive l'APP à différentes positions, générant une variété de peptides A β de différentes tailles (Benilova et al., 2012; De Strooper, 2010; De Strooper and Annaert, 2010). Dans la Maladie d'Alzheimer, il y a une augmentation de la production de l'A β 42 (42 acides aminés) qui est plus hydrophobique et davantage enclin à s'agréger par rapport aux formes plus courtes comme l'A β 40 (Burdick et al., 1992; Jarrett and Lansbury, 1993). En effet, l'A β 42 est le principal constituant des plaques amyloïdes et correspond à l'espèce majeure détectée dans les cerveaux des patients (Iwatsubo et al., 1994; Younkin and Steven, 1998). Le peptide A β libéré après le clivage de l'APP est initialement un monomère, et une réaction de polymérisation des monomères induit la formation de petits intermédiaires solubles appelés oligomères (dimères, trimères, ... de peptide A β). Les oligomères s'étendent par l'addition de monomères pour former des protofibrilles se regroupant en une fibrille large et insoluble qui va s'accumuler dans les plaques amyloïdes (Fig. 3B) (Bernstein et al., 2009; Gilbert, 2013; Podlisny et al., 1995; Walsh et al., 2000).

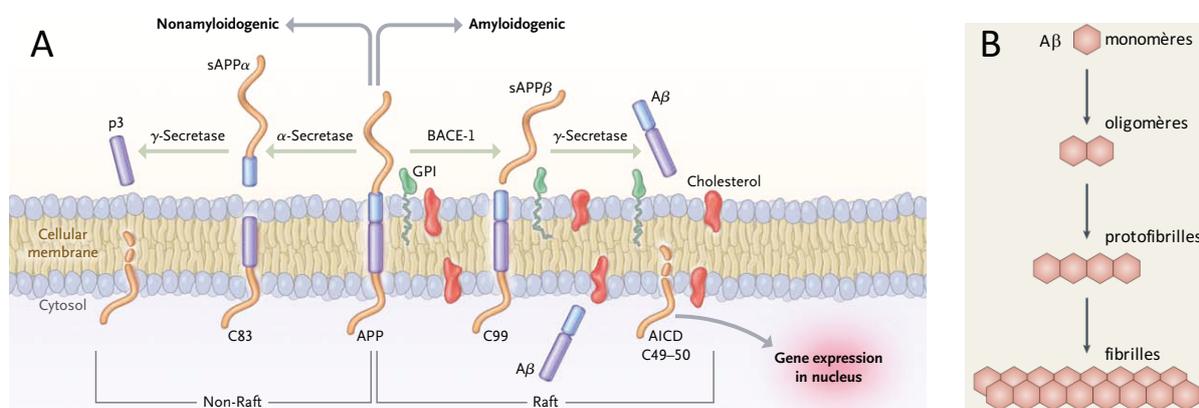


Figure 3. Les différentes voies du métabolisme de l'APP et la production d'A β

A. Les différentes voies du métabolisme de l'APP. La voie non-amyloïdogénique correspond au clivage successif de l'APP par une α -sécrétase puis une γ -sécrétase, résultant en la production de sAPP α et du fragment p3. La voie amyloïdogénique correspond au clivage successif de l'APP par la β -sécrétase (BACE-1) et la γ -sécrétase (complexe formé notamment de la PS1 ou PS2) résultant en la production de sAPP β et de peptide A β (d'après Querfurth and LaFerla, 2010).

B. Les différents états du peptide A β . Les monomères d'A β produits initialement subissent une réaction de polymérisation responsable de la formation d'oligomères qui s'étendent pour former des protofibrilles se regroupant en une fibrille large et insoluble qui s'accumule dans les plaques amyloïdes (d'après LaFerla et al., 2007).

La progression des dépôts d'A β dans le cerveau peut être divisée en 5 phases définies par Thal selon l'évolution des régions touchées au cours de la maladie (Fig. 4) (Duyckaerts et al., 2009; Thal et al., 2002). L'isocortex est touché en premier (phase 1), puis l'hippocampe et le cortex entorhinal (phase 2), le diencephale (phase 3), les noyaux du tronc cérébral (phase 4) et enfin le cervelet (phase 5).

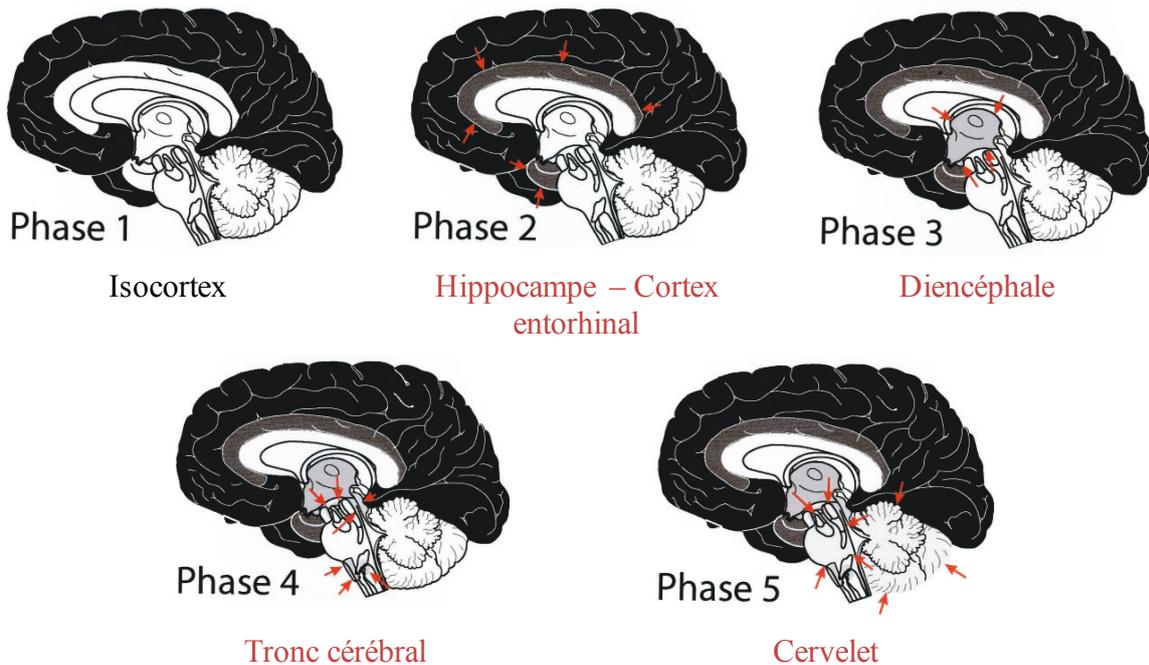


Figure 4. La progression de la pathologie amyloïde dans la Maladie d'Alzheimer

La progression de la pathologie amyloïde est définie selon les phases de Thal, où les dépôts s'accumulent d'abord dans l'isocortex (phase 1), puis l'hippocampe et le cortex entorhinal (phase 2), le diencephale (phase 3), les noyaux du tronc cérébral (phase 4) et enfin le cervelet (phase 5) (d'après Thal et al., 2002).

b. La protéine tau

Contrairement aux plaques amyloïdes extracellulaires, des dégénérescences neurofibrillaires (DNFs ou « Neurofibrillary tangles » NFTs) s'accumulent dans les neurones des patients atteints de Maladie d'Alzheimer (Fig. 5A). Le composant majeur de ces dégénérescences est une forme hyperphosphorylée de protéine tau, mise en évidence pour la première fois par

Brion et al. en 1985 par immunohistochimie sur des coupes de cerveaux de patient (Braak and Braak, 1991a; Brion et al., 1985). La composition en protéine tau des dégénérescences neurofibrillaires a été confirmée par la suite grâce à des expériences de biochimie (Delacourte and Defossez, 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986a, 1986b). Des agrégats de filaments de protéine tau hyperphosphorylée sont également visibles dans les neurites dystrophiques qui entourent le cœur des plaques amyloïdes (Fig. 5B) (Duyckaerts et al., 2009).

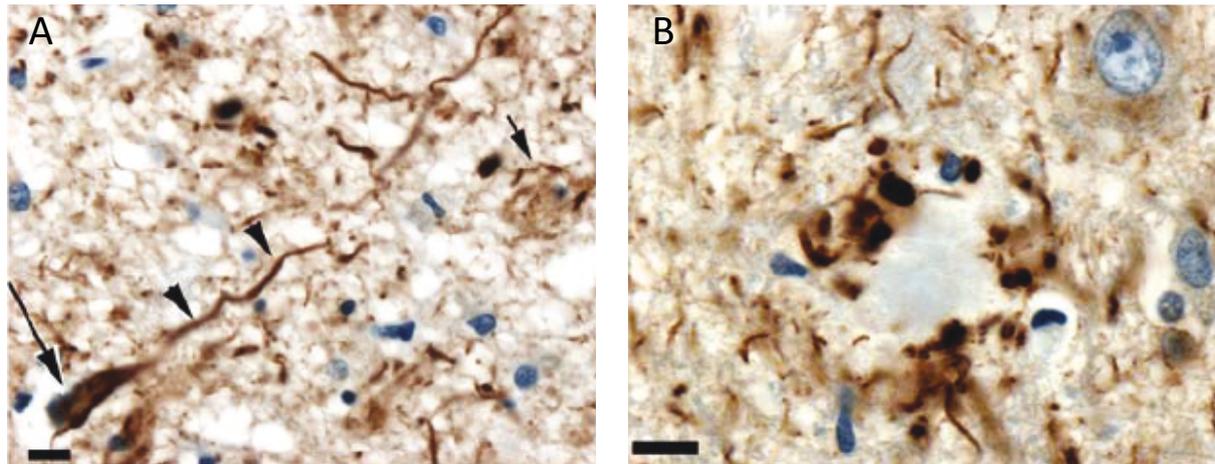


Figure 5. Accumulation de protéine tau dans la Maladie d'Alzheimer

Accumulation de protéine tau mise en évidence par des immunomarquages dirigés contre la protéine tau (d'après Duyckaerts et al., 2009).

A. Dégénérescence neurofibrillaire formée de protéine tau qui s'accumule dans le neurone (flèche). A noter que la protéine tau s'accumule également dans le dendrite (tête de flèche). Des « ghost tangles » extracellulaires sont visibles (petite flèche) qui correspondent à des dégénérescences neurofibrillaires qui restent dans le milieu extracellulaire après la mort du neurone.

B. La couronne d'une plaque sénile contient des structures immunoréactives pour la protéine tau (surtout des axones) alors que le cœur amyloïde n'est pas marqué par l'anticorps anti-tau.

La protéine Tau appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (« microtubule associated protein » ou MAP) (Iqbal et al., 2010). L'épissage alternatif de l'ARN messager de tau résulte dans la formation de six isomères, qui diffèrent par le nombre de répétitions (trois ou quatre) du domaine de liaison aux microtubules (Buée et al., 2000; Goedert et al., 1989). Les deux types d'isomères (tau 3R ou tau 4R) sont retrouvés dans la Maladie d'Alzheimer (Duyckaerts et al., 2009).

Dans la Maladie d'Alzheimer, la protéine tau hyperphosphorylée s'agrège sous la forme d'inclusions intraneuronales appelées paires de filaments appariés en hélice (« Paired helical filament » ou PHF). Ces PHF s'accumulent ensuite pour former les dégénérescences neurofibrillaires (Fig. 6) (Buée et al., 2000). L'hyperphosphorylation de tau est due à une augmentation de l'activité de kinases ou une diminution de l'activité de phosphatases de tau (Buée et al., 2000; Trojanowski and Lee, 1995). Différentes kinases sont impliquées dans la phosphorylation de la protéine tau, notamment le groupe des « proline-directed protein kinases » (PDPK) qui incluent la « glycogen synthase kinase 3 » (GSK3), la kinase tau tubuline ou encore la « cyclin-dependent kinase » (cdk5) qui vont phosphoryler des motifs Serine ou Thréonine suivis d'une Proline. Des phosphorylations en dehors de ces sites peuvent être induites par d'autres kinases comme les « microtubule-affinity regulating kinases » (MARK) ou encore la « cyclic-AMP-dependent kinase » (PKA) (Fig. 6). Inversement, la protéine tau peut être déphosphorylée par les phosphatases 1, 2A ou 2B (Buée et al., 2000). Contrairement à la pathologie amyloïde, aucune mutation du gène codant pour la protéine tau n'a été associée à la Maladie d'Alzheimer, ces mutations étant d'avantage associées à des pathologies comme la démence frontotemporal (Hutton et al., 1998).

Le rôle physiologique de la protéine tau est de se lier aux microtubules pour les stabiliser. Les microtubules assurent le maintien de la forme des cellules et constituent des voies de transports cellulaires. La forme hyperphosphorylée de la protéine tau retrouvée dans la Maladie d'Alzheimer perd son affinité pour les microtubules et les déstabilise (Fig. 6). La protéine tau hyperphosphorylée perturbe donc le transport axonal et induit des troubles synaptiques (Jaworski et al., 2010).

L'accumulation de dégénérescences neurofibrillaires n'est pas spécifique de la Maladie d'Alzheimer mais est retrouvée dans un ensemble de maladie neurodégénérative regroupé sous le nom de tauopathies. La distribution spécifique des DNFs caractérise chaque pathologie (Buée et al., 2000). Dans la Maladie d'Alzheimer, la progression de la pathologie tau dans le cerveau diffère de celle de la pathologie amyloïde. Elle peut être divisée en 5 stades définis par Braak en fonction de l'évolution des régions touchées par les dégénérescences neurofibrillaires (Fig. 7) (Braak and Braak, 1991b). Ainsi, le cortex entorhinal est touché en premier (stade I et II), puis l'hippocampe (stade III et IV) et enfin l'isocortex (stade V et VI). La pathologie tau suit une progression anatomique séquentielle stéréotypée très conservée entre les individus, à l'inverse de la pathologie amyloïde qui est plus diffuse et hétérogène (Braak and Braak, 1991b; Delacourte et al., 2002). Cette

progression hiérarchique se ferait notamment entre des régions anatomiquement connectées (Duyckaerts et al., 2009).

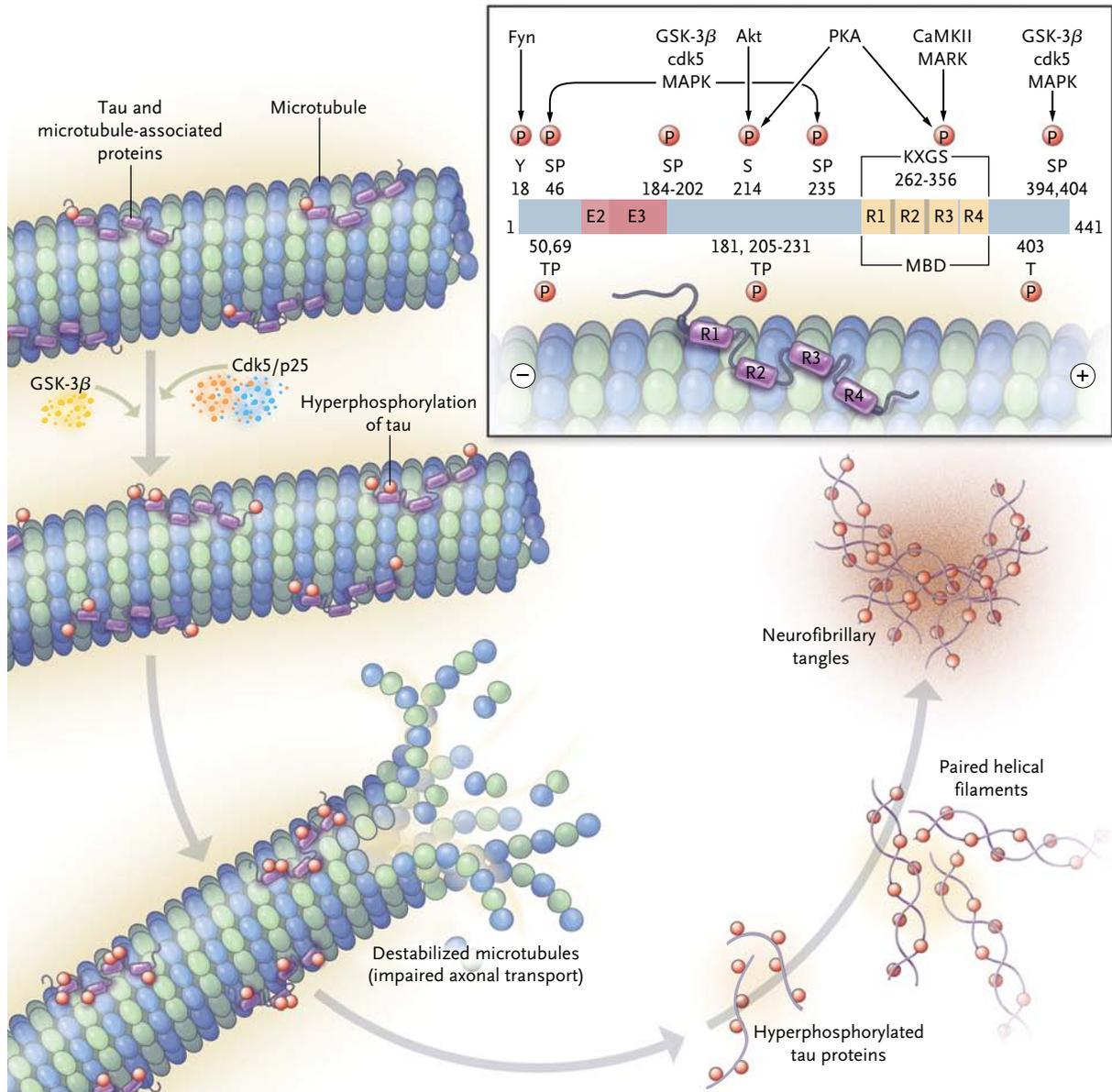


Figure 6. La formation des dégénérescences neurofibrillaires de protéine tau

La protéine tau se lie aux microtubules pour les stabiliser. L'augmentation de l'activité de kinases (GSK-3β, cdk5) ou la diminution d'activité de phosphatases induit une hyperphosphorylation de tau qui perd alors son affinité pour les microtubules et les déstabilise. La protéine tau hyperphosphorylée s'agrège sous la forme de paires de filaments appariés en hélice (« Paired Helical Filaments ») qui s'accumulent pour former les dégénérescences neurofibrillaires (« neurofibrillary tangles »). L'encart présente les différentes kinases de tau et leur site de phosphorylation (d'après Querfurth and LaFerla, 2010)

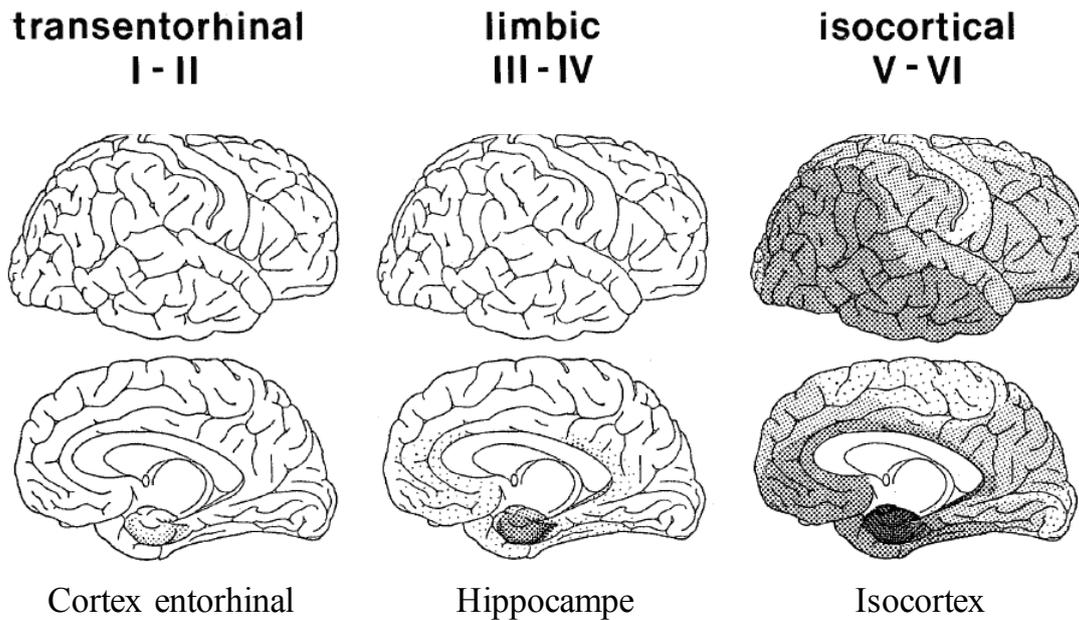


Figure 7. La progression de la pathologie tau dans la Maladie d'Alzheimer

La progression de la pathologie tau est définie selon les phases de Braak, où les dégénérescences neurofibrillaires s'accumulent d'abord le cortex entorhinal (stade I et II), puis l'hippocampe (stade III et IV) et enfin l'isocortex (stade V et VI) (d'après Braak and Braak, 1991b)

c. La toxicité des accumulations de protéines chez les patients et dans les modèles de Maladie d'Alzheimer

Les mutations retrouvées dans les formes familiales de la Maladie d'Alzheimer sont responsables d'une augmentation de la production ou de la capacité d'agrégation de l'A β , favorisant l'accumulation de plaques amyloïdes précoce. La découverte de ces mutations induisant un développement plus précoce de la maladie a permis de développer l'hypothèse de la cascade amyloïde, avancée par Hardy et Higgins en 1992 (Hardy and Higgins, 1992). Cette hypothèse est devenue le modèle physiopathogénique principal de la maladie bien qu'elle puisse être discutée (Hardy and Selkoe, 2002; Selkoe and Hardy, 2016). Elle place l'accumulation des plaques amyloïdes comme l'événement causal de la pathologie, responsable de la formation des autres éléments neuropathologiques de la Maladie d'Alzheimer comme les dégénérescences neurofibrillaires de la protéine tau, la perte de

neurones et de synapses, les dommages vasculaires, l'inflammation et enfin la démence (Fig. 8).

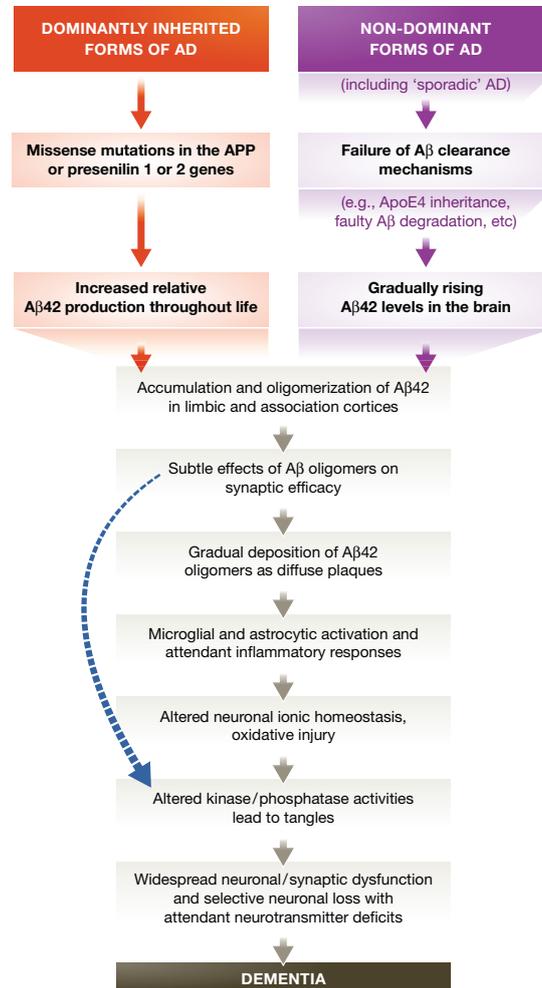


Figure 8. L'hypothèse de la cascade amyloïde

L'hypothèse de la cascade amyloïde émise initialement par Hardy et Higgins en 1992 (Hardy and Higgins, 1992) place l'accumulation des plaques amyloïdes comme l'événement initiateur de la pathologie, induisant notamment l'apparition d'une inflammation, de dégénérescences neurofibrillaires et d'une perte de neurones responsable du développement d'une démence (d'après Hardy and Selkoe, 2002; Selkoe and Hardy, 2016).

La toxicité des plaques amyloïdes a été discutée dans plusieurs études. Giannakopoulos et al. a observé que les plaques ne corrèlent pas avec la durée de la maladie ni avec la perte de neurones ou les dégénérescences neurofibrillaires (Giannakopoulos et al., 2003). Une forte densité de plaques est même retrouvée chez des personnes saines présentant des fonctions

cognitives normales (Delaère et al., 1993; Mintun et al., 2006). Dans les patients, la distribution des plaques corrèle peu avec les symptômes puisqu'elles s'accumulent d'abord dans l'isocortex et seulement ensuite dans les aires cérébrales impliquées dans la mémoire comme l'hippocampe (Serrano-Pozo et al., 2011; Thal et al., 2002). Le niveau du peptide A β pourrait atteindre un plateau au cours de la maladie, alors que les dégénérescences neurofibrillaires et les pertes de synapses continuent d'augmenter à mesure que la pathologie évolue (Ingelsson et al., 2004). La progression des dégénérescences neurofibrillaires est quant à elle corrélée à la séquence d'apparition des troubles cliniques (Braak and Braak, 1991b; Duyckaerts et al., 2009; Serrano-Pozo et al., 2011). Les DNFs s'accumulent en premier dans le lobe temporal médian, impliqué dans la mémoire, puis progressent vers les aires du néocortex responsables des fonctions exécutives, visuospatiales ou du langage (Nelson et al., 2012). La pathologie tau est ainsi considérée comme la lésion responsable de l'apparition des symptômes. Les dégénérescences neurofibrillaires corrèlent mieux avec les symptômes et le déclin cognitifs que les plaques amyloïdes (Arriagada et al., 1992; Bierer et al., 1995; Giannakopoulos et al., 2003) et leur distribution est associée à la localisation de la mort des neurones (Bobinski et al., 1997; Gómez-Isla et al., 1997).

La faible pathogénicité des plaques pourrait s'expliquer par leur composition en A β fibrillaire très insoluble, qui interagit donc probablement très peu avec les cellules voisines (Duyckaerts et al., 2009). Les espèces solubles d'A β , identifiées dans les cerveaux de patients atteints de Maladie d'Alzheimer (McLean et al., 1999), corrèlent mieux avec les symptômes et les déficits cognitifs que les plaques chez les patients (Lue et al., 1999; Näslund et al., 2000). La concentration d'A β soluble corrèle également avec le nombre de synapses chez ces patients (Lue et al., 1999). Dans certains modèles transgéniques, les anomalies cognitives apparaissent avant même la formation des plaques et sont liées à l'accumulation de formes intermédiaires solubles d'A β (oligomères) (Hsia et al., 1999; Lesné et al., 2006). L'injection aigue d'un anticorps ciblant l'A β dans un modèle transgénique permet d'améliorer la mémoire de ces souris sans modifier le nombre de plaques (Dodart et al., 2002). Par leur caractère soluble, les oligomères pourraient se lier à la surface des dendrites, voire au niveau des synapses (Gong et al., 2003; Lacor, 2007), afin d'induire leurs effets toxiques (Ferreira and Klein, 2011; Wilcox et al., 2011). En effet, l'application d'oligomères d'A β sur des cultures de neurones hippocampiques ou de tranches organotypiques de cerveaux induit une diminution du nombre d'épine dendritique (Calabrese et al., 2007; Lacor, 2007; Shankar et al., 2007). Cette diminution est associée à une modification de leur morphologie et de la transmission

synaptique (Calabrese et al., 2007). Les oligomères altèrent également la plasticité synaptique impliquée dans les processus de mémorisation notamment en bloquant les processus de potentialisation à long terme (Klyubin et al., 2008, 2012; Selkoe, 2008; Walsh, 2005; Walsh et al., 2002a). L'injection d'oligomères d'A β dans le cerveau de souris ou rats contrôle perturbent les processus d'apprentissage et la mémoire et induisent des troubles cognitifs (Cleary et al., 2005; Epelbaum et al., 2015; Lesné et al., 2006).

En plus de sa forme, la topographie du peptide A β semble également jouer un rôle dans sa toxicité. Le peptide A β se trouve majoritairement sous forme de plaque dans l'espace extracellulaire mais il s'accumule également dans les neurones dans des cerveaux de patients et dans des modèles murins de Maladie d'Alzheimer (Fig. 9A, B) (Gouras et al., 2000; Grundke-Iqbal et al., 1989; LaFerla et al., 2007; Takahashi et al., 2002; Wirths et al., 2002). Il s'accumule très précocement dans les neurones, dès le stade MCI chez l'homme, dans des régions classiquement touchées très tôt dans la Maladie d'Alzheimer (hippocampe et cortex entorhinal) et avant l'apparition des plaques chez des patients atteints de trisomie 21 (Gouras et al., 2000; Gyure et al., 2001). L'accumulation d'A β intracellulaire semble précéder la formation des plaques puisque la densité d'A β intracellulaire diminue quand les dépôts extracellulaires augmentent (Oddo et al., 2006a; Wirths et al., 2001). L'accumulation d'A β intracellulaire pourrait alors constituer un événement précoce initiant la pathologie (Fig. 9C) (Gouras et al., 2000). Dans un modèle triple transgénique (APP, PS1 et Tau), des déficits dans la plasticité synaptique à long terme sont observés avant l'apparition de plaques et de DNFs, et ces déficits corrèlent avec l'accumulation intraneuronale d'A β (Oddo et al., 2003). Dans ce modèle, l'apparition des premiers troubles de l'apprentissage et de la mémoire coïncide avec l'apparition d'une accumulation d'A β intracellulaire, en l'absence de plaques ou de DNFs (Billings et al., 2005). De plus, l'élimination de ce pool d'A β intracellulaire par immunothérapie prévient les déficits cognitifs. Certains modèles transgéniques développent des pertes de neurones dans le CA1 ou dans la couche V du cortex, des régions accumulant de l'A β intracellulaire (Breyhan et al., 2009; Casas et al., 2004; Jawhar et al., 2012; Oakley et al., 2006). Christensen et al. suggèrent que l'accumulation d'A β intracellulaire est d'avantage associée à la perte de neurones que les plaques extracellulaires (Christensen et al., 2008).

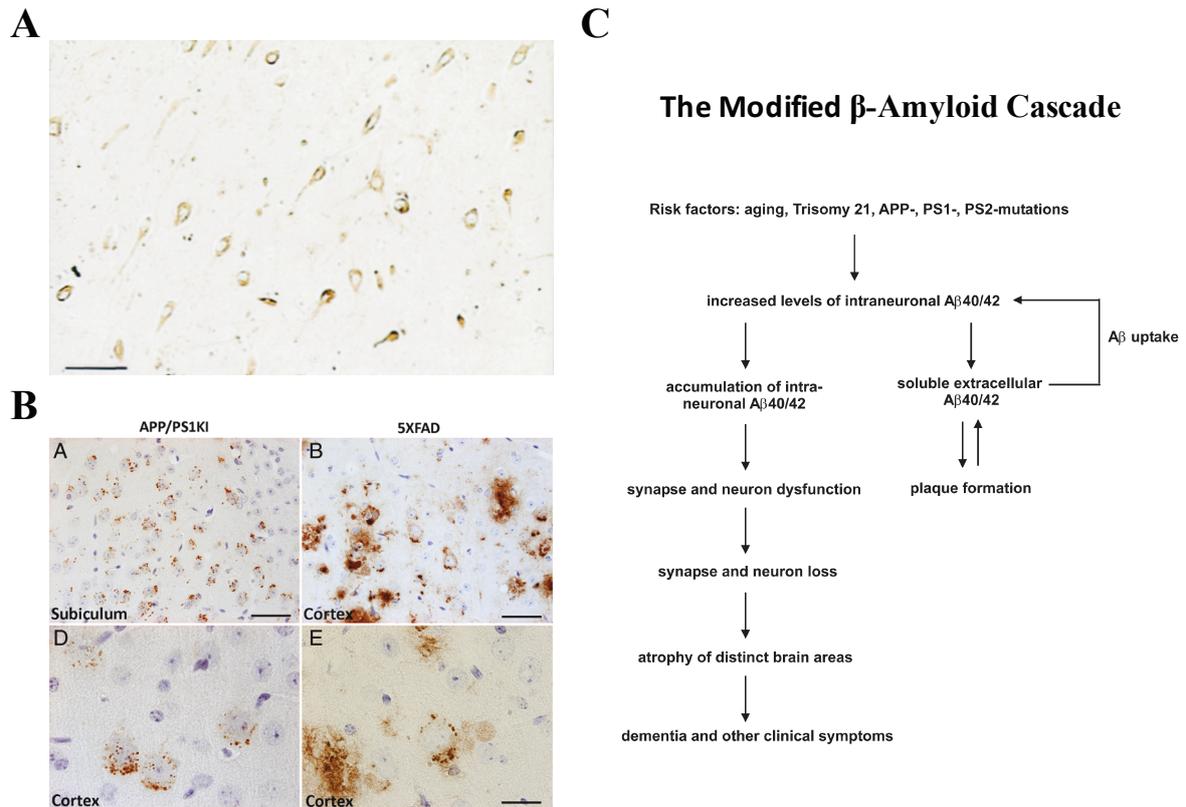


Figure 9. Une autre topographie du peptide amyloïde : l'accumulation intracellulaire d'A β

A, B. Mise en évidence d'une accumulation d'A β intraneuronale dans les neurones du CA1 de patients atteints de Maladie d'Alzheimer (A) et dans les neurones du cortex et du subiculum dans des souris modèles de MA (APP/PS1KI et 5XFAD) (B) (d'après Gouras et al., 2000; Wirths and Bayer, 2012).

C. Cascade amyloïde modifiée, proposée par Wirths et al. en 2004, qui place l'accumulation intraneuronale d'A β comme un événement précoce initiant la pathologie (d'après Wirths et al., 2004). Barre d'échelle en A: 60 μ m, B haut : 50 μ m ; B bas : 20 μ m.

I. 2. 2. Les lésions par perte

a. L'atrophie cérébrale

L'atrophie cérébrale est caractéristique de la Maladie d'Alzheimer et se définit par un amincissement du cortex et un élargissement des ventricules (Duyckaerts et al., 2009; Serrano-Pozo et al., 2011). L'atrophie a pu être mise en évidence dans l'hippocampe et par

des études longitudinales montrant notamment une atrophie progressive du lobe temporal médian (Jobst et al., 1992; de Leon et al., 1989). Le volume des sous divisions de la formation hippocampique (CA1, CA2-3, hile, subiculum) est même réduit chez les patients (Simić et al., 1997). L'atrophie augmente avec la durée de la maladie et touche de façon plus importante l'hippocampe (Kril et al., 2004). Le cortex entorhinal et l'amygdale sont également touchés et l'atrophie peut s'étendre au cortex temporal et frontal (Duyckaerts et al., 2009; Halliday, 2003; Serrano-Pozo et al., 2011). Elle épargne généralement les régions du cortex moteur primaire, somatosensoriel et visuel (Serrano-Pozo et al., 2011).

L'atrophie peut également être observée grâce à des mesures volumétriques et structurales par IRM (Dickerson et al., 2009; Whitwell, 2010). En IRM, une atrophie importante est surtout observée au niveau de l'hippocampe, associée à une diminution du volume cérébral global et une expansion des ventricules (Whitwell, 2010). L'atrophie s'accélère et devient plus importante avec l'évolution de la maladie. Les données en IRM confirment qu'elle débute au niveau du lobe temporal médian avant de s'étendre au lobe pariétal et frontal (Whitwell, 2010).

Une forte corrélation est retrouvée entre la perte de neurone et l'atrophie dans la Maladie d'Alzheimer (Kril et al., 2004). En effet, le nombre de neurones et le volume de l'hippocampe et du cerveau sont corrélés à la fois chez les sujets contrôles et les patients.

L'atrophie corrèle avec les mesures de certains tests cognitifs ce qui en fait un bon marqueur du déclin cognitif (Whitwell, 2010). La vitesse de l'atrophie corrèle avec le changement cognitif des patients puisque l'atrophie s'accélère chez les patients contrôles et MCI dont le statut cognitif se détériore par rapport aux patients qui restent cliniquement stable (Jack et al., 2000).

L'atrophie se développe dans des régions présentant une forte accumulation de tau. En effet, des données en IRM ont montré que les régions présentant une atrophie étaient associées à la présence de dégénérescences neurofibrillaires visualisées sur les coupes des cerveaux de ces patients après leur décès (Whitwell et al., 2008). Ainsi, le profil de l'atrophie corrèle fortement avec la distribution et la progression des dégénérescences neurofibrillaires définies dans les stades de Braak (Whitwell et al., 2008). A l'inverse, l'atrophie ne corrèle pas avec la charge amyloïde ni les plaques, suggérant que la pathologie tau est davantage liée aux pertes de neurones et à l'atrophie (Josephs et al., 2008; Whitwell, 2010).

b. La perte de neurone

Une perte importante de neurones est retrouvée dans l'hippocampe, notamment au niveau du champ CA1 où elle est la plus importante (West et al., 1994). Des pertes de neurones sont également observées au niveau du cortex entorhinal, de l'amygdale, et du noyau basal de Meynert (Arendt et al., 1983; Duyckaerts et al., 2009; Gómez-Isla et al., 1996; Vereecken et al., 1994; Whitehouse et al., 1981). Dans ce noyau, la perte de neurones cholinergiques induit des perturbations des niveaux d'acétylcholine, ce qui pourrait être à l'origine de certains symptômes cognitifs (Schliebs and Arendt, 2011; Whitehouse et al., 1981). C'est pourquoi le traitement visant à normaliser les niveaux d'acétylcholine est l'une des rares stratégies thérapeutiques dans le traitement symptomatique de la maladie.

La perte de neurones, dans le champ CA1 notamment, augmente avec la durée de la maladie et avec la gravité des symptômes cliniques (Bobinski et al., 1997; Kril et al., 2004). La présence de « ghost tangles » (dégénérescences neurofibrillaires qui restent dans le milieu extracellulaire après la mort du neurone) indique que la perte de neurones est associée à la présence de dégénérescences neurofibrillaires (Braak and Braak, 1991b; Cras et al., 1995; Duyckaerts et al., 2009). En effet, Cras et al. ont montré que le nombre de neurones perdus était proche du nombre de « ghost tangles » (Cras et al., 1995). De façon similaire, une corrélation forte a pu être établie entre la perte de neurones et la formation des dégénérescences neurofibrillaires (Fukutani et al., 2000). Cependant, bien que la perte de neurone et les DNFs soient corrélées car elles augmentent avec la durée et la sévérité de la maladie, la perte de neurones excède le nombre de DNFs (Gómez-Isla et al., 1997). Cette observation est confirmée dans une autre étude qui suggère que les DNFs ne sont responsables que d'une petite proportion de la perte de neurones dans l'hippocampe (Kril et al., 2002). A l'inverse de la corrélation observée entre la perte de neurones et les dégénérescences neurofibrillaires le nombre de plaques n'est pas corrélé à la perte de neurones (Gómez-Isla et al., 1997).

c. La perte de synapses

Une perte de synapses est observée dans beaucoup de régions du cerveau de patients atteints de la Maladie d'Alzheimer (MA) (Scheff, 2003; Scheff and Price, 1993; Scheff et al., 1990, 1993). Observée par microscopie électronique (ME), cette perte touche la stratum radiatum du CA1 de l'hippocampe, dont le volume est également diminué, chez des patients atteints de MA modérée (Scheff et al., 2007). Les patients MCI présentent quant à eux un nombre de synapse intermédiaire entre les patients contrôles et les patients atteints de MA à un stade modéré (Scheff et al., 2007). Une perte de synapses est également observée dans la couche moléculaire externe du gyrus denté dans les stades précoces et dans le cortex frontal de patients atteints de MA (DeKosky and Scheff, 1990; Scheff et al., 2006). En outre, la perte de synapses peut également être observée par différents marquages de protéines synaptiques sur les tissus de patients atteints de Maladie d'Alzheimer. En effet, le marquage d'une protéine des vésicules présynaptiques (synaptophysine) est diminué chez les patients atteints de MA dans le cortex pariétal, temporal et préfrontal, synonyme d'une perte de synapse (Masliah et al., 1989; Terry et al., 1991).

La perte de synapses s'accompagne d'une augmentation de la surface d'apposition des synapses restantes (DeKosky and Scheff, 1990; Scheff et al., 2007). L'élargissement des synapses corrèle avec le degré de la perte de synapses, c'est-à-dire que plus le nombre de synapses diminue, plus la taille des synapses restantes et de leur densité post-synaptique augmente (DeKosky and Scheff, 1990). Cette augmentation de la taille des synapses pourrait constituer un phénomène de compensation face aux pertes de synapses.

La perte de synapses est supérieure à la perte de neurones dans le cortex frontal et temporal de patients de Maladie d'Alzheimer (Davies et al., 1987). Afin de ne pas être biaisé par l'atrophie du cerveau, Davies et al. ont estimé le nombre de synapse en fonction du nombre de neurones. Cette étude montre que moins de synapses sont associées avec chaque neurone survivant dans les régions analysées. La perte de synapses est probablement un événement précoce dans la physiopathologie de la maladie, avant la perte de neurones (Davies et al., 1987).

La perte de synapses observée sur des biopsies de patients corrèle avec certains tests cognitifs (DeKosky and Scheff, 1990). Cette observation est confirmée par la mise en évidence d'une corrélation entre la perte de synapses observée sur des tissus de patients et des tests cognitifs

et de mémoire réalisés avant leur décès (Scheff et al., 2007). La perte de synapses semble être impliquée dans le déclin cognitif des patients (DeKosky and Scheff, 1990; Scheff et al., 2007). La diminution de synaptophysine corrèle également avec le déclin des fonctions cognitives dans la maladie, de façon plus importante que les plaques ou les dégénérescences neurofibrillaires (Sze et al., 1997; Terry et al., 1991). Par contre, la baisse d'immunoréactivité de la synaptophysine dans le cortex entorhinal et l'hippocampe est un phénomène précoce dans la maladie qui ne corrèle pas avec les plaques (Heinonen et al., 1995). La perte de synapse semble être le marqueur neuropathologique qui corrèle le mieux avec les déficits cognitifs (Terry et al., 1991).

En définitive, une perte importante de synapses est observée chez les patients atteints de Maladie d'Alzheimer. Cette perte de synapse est visible de façon précoce et semble précéder la perte de neurones chez ces patients. Elle devient de plus en plus importante avec l'évolution de la maladie et corrèle avec différents tests de mémoire et de cognition. La perte de synapses est en effet le marqueur neuropathologique qui corrèle le mieux avec les déficits cognitifs. Le mécanisme responsable de la perte de synapses et de neurones n'est pas encore bien défini, mais semble impliquer d'avantage les oligomères d'A β et la pathologie tau que les plaques amyloïdes. Face à l'absence de traitements curatifs, l'identification du mécanisme responsable de ces pertes pourrait permettre le développement de nouveaux traitements, ciblant l'origine de la pathologie. C'est pourquoi l'objectif de cette thèse a été d'étudier différents mécanismes qui pourraient être responsables des pertes de neurones et de synapses dans la Maladie d'Alzheimer.

II. Rôle des altérations du fonctionnement synaptique dans les pertes de synapses

La Maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par des troubles cognitifs et des pertes de mémoire. Alors qu'une perte de neurones se produit dans les stades tardifs de la maladie, une perte de synapses est observée dès les stades précoces. Cette perte de synapses semble être le marqueur neuropathologique qui corrèle le mieux avec les déficits cognitifs (Terry et al., 1991). C'est pourquoi l'identification du mécanisme sous-tendant cette perte semble essentiel dans le but de développer un traitement. Alors que l'hypothèse de la cascade amyloïde place l'accumulation de plaques amyloïdes comme l'événement initiateur de la maladie, d'autres espèces intermédiaires solubles d'A β appelées oligomères semblent davantage toxiques. L'étude de modèles *in vitro* et de modèles animaux *in vivo* développant une perte de synapses ont permis de proposer divers mécanismes impliqués dans cette perte. Une perte de synapses est observée dans des cultures de neurones hippocampiques traitées avec des oligomères d'A β (Calabrese et al., 2007; Lacor et al., 2007). Les mêmes altérations sont retrouvées dans des tranches de tissus incubées avec des oligomères (Hsieh et al., 2006; Shankar et al., 2007; Shrestha et al., 2006) ou transfectées avec un virus surexprimant l'APP (Hsieh et al., 2006). D'autre part, des modèles transgéniques exprimant des mutations dans le gène de l'APP développent également des pertes de synapses (Jacobsen et al., 2006; Lanz et al., 2003; Spire et al., 2005). Les pertes de synapses peuvent être précédées d'un changement de la forme des synapses (Pozueta et al., 2013a; Tackenberg and Brandt, 2009; Zou et al., 2015). Enfin, certaines études ont montré que l'injection d'oligomères dans des rats induisait des troubles cognitifs (Cleary et al., 2005) et des altérations de certaines formes de plasticité synaptique (Shankar et al., 2008; Walsh et al., 2002a). Le peptide amyloïde pourrait ainsi modifier la forme, la fonction et le maintien des synapses.

II. 1. La synapse

La transmission de l'information d'un neurone à l'autre est médiée par une jonction spécialisée appelée synapse. Deux types de synapses composent le système nerveux : les synapses

électriques et chimiques. Ces dernières, majoritaires dans le système nerveux central, sous-tendent la communication entre deux neurones par le biais de neurotransmetteurs. Elles se composent d'un élément présynaptique, contenant des vésicules remplies de neurotransmetteurs, d'une fente synaptique et d'un élément post-synaptique (Fig. 10A). Le neurotransmetteur est libéré dans la fente synaptique avant de se fixer sur des récepteurs présents à la surface de l'élément post synaptique (Purves et al., 2004).

Les synapses peuvent être excitatrices ou inhibitrices suivant le type de neurotransmetteur libéré, avec des caractéristiques morphologiques bien définies (Fig. 10A). La synapse excitatrice présente une morphologie asymétrique, avec une densité post-synaptique épaisse (Gray, 1959). Les synapses excitatrices entre cellules pyramidales sont pour la plupart établies sur une protrusion du dendrite appelée épine dendritique et faisant face à un bouton présynaptique contenant des vésicules claires et rondes (Fig. 10B) (Peters et al., 1991). Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur. Du fait qu'il existe une relation directe entre le nombre d'épine dendritique et le nombre de synapses excitatrices, des mesures de la densité d'épines fournissent une estimation de la densité de synapses excitatrices (Alvarez and Sabatini, 2007). A l'inverse, les synapses inhibitrices présentent une morphologie symétrique, avec peu ou pas de densités post-synaptiques, et des vésicules présynaptiques rondes et aplaties (Gray, 1959; Harris and Kater, 1994; Peters et al., 1991). Contrairement aux synapses excitatrices présentes généralement sur des épines dendritiques, les synapses inhibitrices se trouvent directement sur les troncs dendritiques ou les corps cellulaires (Fig. 10C). L'acide gamma-aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur.

II. 2. L'épine dendritique

II. 2. 1. La structure de l'épine dendritique

L'épine dendritique est une petite protrusion du dendrite qui se compose d'une tête reliée au tronc dendritique par un cou. Au niveau de la tête de l'épine se trouve une structure appelée Densité Post Synaptique (DPS) faisant face à l'élément présynaptique. Les épines sont très dynamiques et peuvent prendre des morphologies très variées sous-tendues par un cytosquelette d'actine.

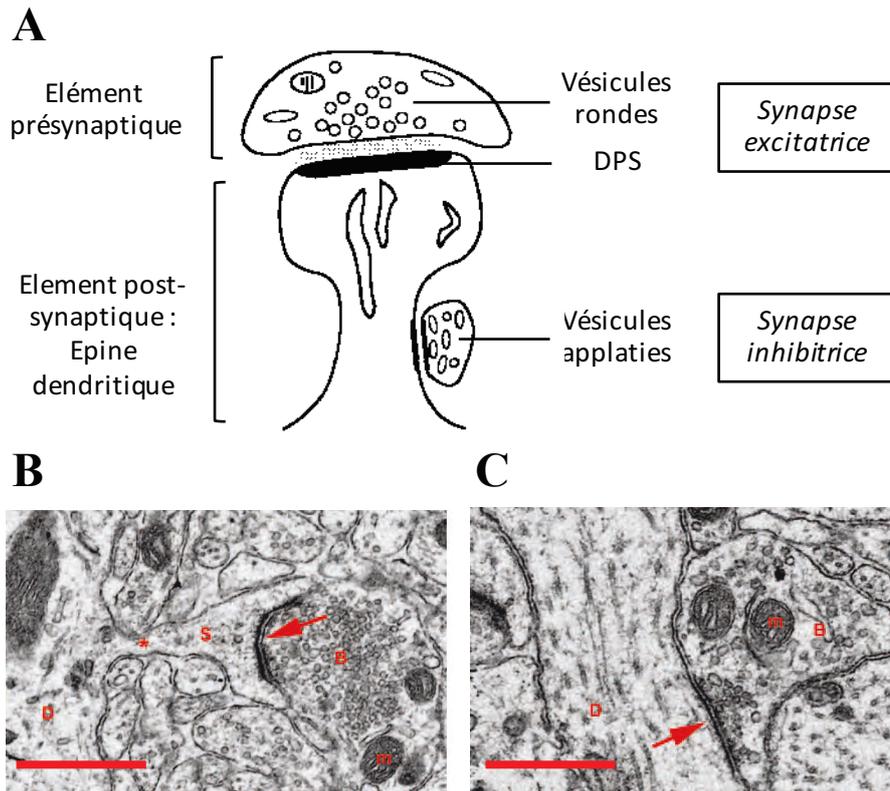


Figure 10. La composition de la synapse chimique excitatrice et inhibitrice

A. Schéma de la structure d'une synapse chimique composée d'un élément présynaptique contenant des vésicules remplies de neurotransmetteurs, d'une fente synaptique et d'un élément post-synaptique. Les synapses excitatrices présentent une morphologie asymétrique, avec une densité post-synaptique (DPS) épaisse. Elles sont établies sur une épine dendritique faisant face à un bouton présynaptique contenant des vésicules claires et rondes. Les synapses inhibitrices présentent une morphologie symétrique, avec peu de DPS et des vésicules rondes et aplaties. Elles se trouvent le plus souvent sur les troncs dendritiques et les corps cellulaires (d'après Harris and Kater, 1994).

B, C. Observation en microscopie électronique de l'ultrastructure d'une synapse présentant les caractéristiques d'une synapse excitatrice (B) et inhibitrice (C). A noter la présence d'une épine dendritique au niveau de la synapse excitatrice (B) alors que la synapse chimique est en contact direct avec le tronc dendritique. Barre d'échelle en B : 1 μm et C : 0,6 μm (d'après Squire et al., 2008).

a. La Densité Post-Synaptique

La densité post-synaptique (DPS) est une structure d'une cinquantaine de nanomètres d'épaisseur apposée au côté cytoplasmique de la membrane post-synaptique et alignée avec la

zone active (site de libération du neurotransmetteur) de l'élément présynaptique (Harris and Kater, 1994). Elle est très dense aux électrons et facilement identifiable en microscopie électronique (Peters et al., 1991). La DPS peut se présenter sous différentes tailles et formes : maculaire (comme une plaque ininterrompue) ou irrégulière (perforée) (Harris and Kater, 1994; Nimchinsky et al., 2002). La taille de la DPS est corrélée au volume de la tête de l'épine dendritique et au nombre de vésicules présynaptiques apposées à la zone active et donc prêtes à libérer leur contenu en neurotransmetteur (Harris and Stevens, 1989; Schikorski and Stevens, 2001). Elle contient beaucoup de protéines, notamment des récepteurs aux neurotransmetteurs, des protéines d'échafaudage, des protéines du cytosquelette et des protéines impliquées dans la signalisation (Harris and Kater, 1994; Nimchinsky et al., 2002; Okabe, 2007). Les récepteurs au glutamate, présents dans la DPS, peuvent être de 2 types : ionotropiques (récepteurs *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA) et acide α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique (AMPA)) ou métabotropiques (mGluR). Les mGluRs s'accumulent essentiellement en bordure de la DPS. La densité de récepteurs AMPA est constante dans la DPS, ainsi le nombre de récepteurs par synapse est proportionnel à l'aire de la DPS et au volume de l'épine (Nimchinsky et al., 2002; Takumi et al., 1999). Il y a ainsi une bonne corrélation entre la taille de la synapse excitatrice et son efficacité.

b. Les différentes morphologies de l'épine

Les épines dendritiques vont présenter des morphologies différentes, suivant les formes que peuvent prendre le cou et la tête (Fig. 11A). Une classification des épines a été établie suivant leur morphologie, en 4 catégories (Fig. 11B) (Harris and Kater, 1994; Harris et al., 1992) :

- Epines dites « thin » : correspond à des épines dont la longueur excède la largeur du cou et dont les diamètres de la tête et du cou sont similaires (Fig. 11C).
- Epines dites « mushroom » : correspond à des épines dont le diamètre de la tête est supérieur à celui du cou (Fig. 11D).
- Epines dites « stubby » : correspond à des épines dont le diamètre du cou est égal à la longueur totale de l'épine (Fig. 11E).
- Epines dites « branched » : correspond à des épines ayant plus d'une tête (Fig. 11F).

Par exemple, au niveau des dendrites des neurones du champ CA1, les épines dites « thin » représentent environ 60% des épines totales alors que les épines dites « mushroom » représentent environ 20% et les « stubby » moins de 10% (Harris et al., 1992)

Une classification plus simple des épines a été décrite, séparant les épines dites « pédonculées », quand elles possèdent une tête, des épines dites « sessiles », quand leur largeur est homogène tout au long de l'épine (Fiala et al., 2008).

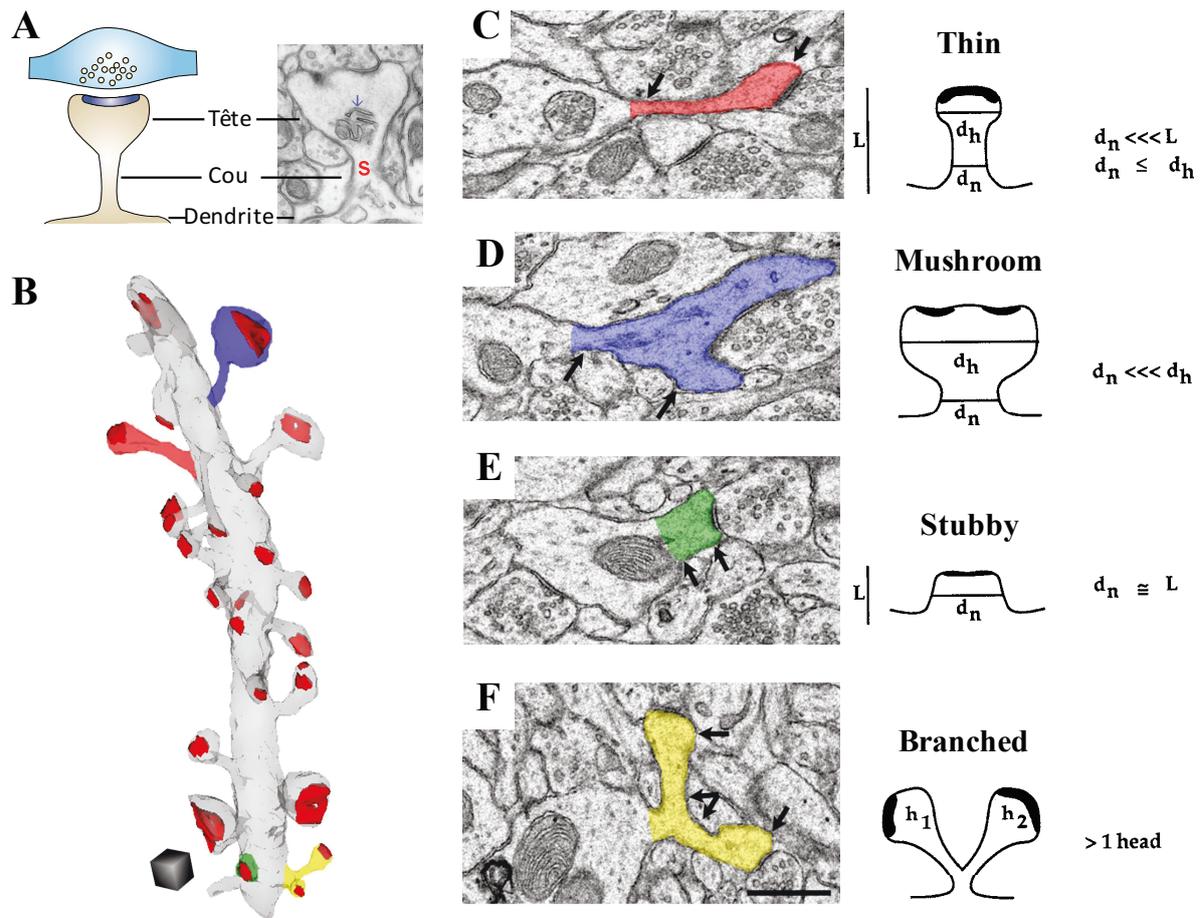


Figure 11. Les différentes morphologies de l'épine dendritique

A. Structure d'une épine dendritique. Elle se compose d'une tête reliée au dendrite par un cou (images issues de Hering and Sheng, 2001 et synapseweb.clm.utexas.edu).

B. Reconstruction 3D d'un dendrite au niveau de l'hippocampe présentant des épines de morphologies différentes : « thin » (rouge), « mushroom » (bleu), « stubby » (vert) et « branched » (jaune).

C-F. Ultrastructure en microscopie électronique et caractéristiques morphologiques d'épines « thin » (C), « mushroom » (D), « stubby » (E) et « branched » (F). Les épines sont classées selon leur morphologie définie par le diamètre de leur tête (d_h), le diamètre de leur cou (d_n) et leur longueur (L). Les flèches indiquent où sont mesurés le diamètre du cou et de la tête pour chaque épine. Cube d'échelle en B : $0,5 \mu\text{m}^3$. Barre d'échelle en C-F : $0,5 \mu\text{m}$ (adaptée de Bourne and Harris, 2008).

c. Rôle de l'actine et ses partenaires dans la forme des épines

Le cytosquelette de l'épine est essentiellement composé d'actine (Fig. 12A) (Fifková and Delay, 1982; Harris and Kater, 1994; Matus et al., 1982). La forme de l'épine va dépendre de l'organisation du cytosquelette d'actine et de sa régulation par les protéines régulatrices de l'actine. Le cou est composé d'un réseau de filaments d'actine linéaires et branchés tandis que la tête se compose davantage de filaments branchés (Fig. 12B) (Hotulainen and Hoogenraad, 2010; Korobova and Svitkina, 2010). Des protéines régulatrices de l'actine sont présentes dans l'épine, dont la concentration et la localisation contrôlent la morphologie et la plasticité de l'épine (Hotulainen and Hoogenraad, 2010; Korobova and Svitkina, 2010). Notons par exemple quelques protéines régulatrices contrôlant la forme de l'épine (Fig. 12C) (Hotulainen and Hoogenraad, 2010) :

- profiline : favorise la polymérisation de l'actine
- cofiline et le facteur de dépolymérisation de l'actine (« Actin depolymerizing factor » ou ADF) : induit une dépolymérisation de l'actine
- famille des petites Rho GTPase : cdc42 et rac1 favorisent la polymérisation de l'actine en inhibant la cofiline
- protéine appelée « capping protein » : permet aux filaments de garder une taille courte en restreignant la polymérisation de l'actine
- myosine IIb : régule la contractibilité des filaments d'actine (Ryu et al., 2006)
- complexe Arp2/3 : permet la nucléation. Le complexe se lie à un filament d'actine existant afin de créer un nouveau branchement à partir duquel un nouveau filament d'actine se développe (Goley and Welch, 2006). Il existe également des activateurs de ce complexe qui vont réguler la morphologie des épines (contractine, WAVE-1, N-WASP, Abi2, Abp1).

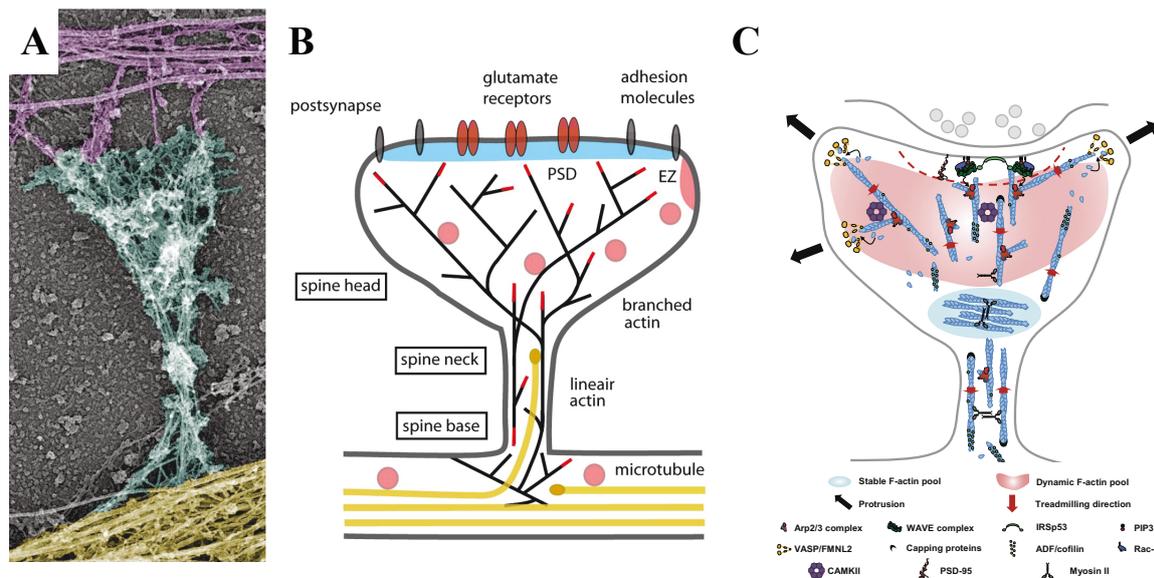


Figure 12. Le cytosquelette d'actine définit la morphologie des épines

A, B. Observation du cytosquelette d'actine dans une épine dendritique par microscopie électronique (cytosquelette axonal en violet ; corps du dendrite en jaune ; épine dendritique en bleu) (A) et schéma de son organisation dans l'épine (B). La tête de l'épine contient un réseau dense de filament d'actine branchée alors que le cou de l'épine contient des filaments d'actine linéaire et branchée (d'après Hotulainen and Hoogenraad, 2010).

C. Schéma de quelques protéines régulatrices de l'actine contrôlant la forme de l'épine, comme la cofiline et le facteur de dépolymérisation de l'actine (ADF) qui induisent une dépolymérisation, rac-1 qui favorise la polymérisation, le complexe Arp2/3 impliqué dans la nucléation, la myosine II qui régule la contractibilité et la « capping protein » qui restreint la polymérisation de l'actine (d'après Chazeau and Giannone, 2016).

II. 2. 2. Les rôles de la forme de l'épine dendritique

La morphologie caractéristique de l'épine dendritique soulève la question du rôle de la forme de l'épine et de son impact sur la transmission synaptique. Comme nous l'avons indiqué plus haut, la taille de l'épine corrèle avec la force de la synapse qu'elle forme, i.e. la quantité de vésicules synaptiques à la zone active présynaptique et la quantité de récepteurs AMPA dans la densité post-synaptique (Holderith et al., 2012). Ainsi des changements de taille des épines se produisent lors de modifications de l'efficacité synaptique (Kasai et al., 2003). Le cou de l'épine pourrait aussi constituer une barrière à la diffusion de molécules et au flux de courant entre la tête de l'épine et le dendrite, respectivement appelée compartimentalisation

biochimique et électrique de l'épine (Alvarez and Sabatini, 2007). Le cou permettrait ainsi d'isoler la tête de l'épine.

a. La plasticité synaptique

Les épines dendritiques sont des structures dynamiques dont la formation, la taille et la morphologie varient au cours du temps (Alvarez and Sabatini, 2007). Le cytosquelette d'actine et son remodelage est essentiel lors des processus de plasticité synaptique. Une inhibition de la polymérisation de l'actine altère les phénomènes de plasticité synaptique comme la potentialisation à long terme (voir plus loin, Ramachandran and Frey, 2009). A l'inverse, cette potentialisation est augmentée dans des modèles transgéniques Knock-out de LIMK1 présentant une inhibition de la cofiline (Meng et al., 2002). Le degré de polymérisation de l'actine, défini selon la proportion de monomères (actine G) et de polymères filamenteux (actine F), sous-tend la modification de forme dans ces processus de plasticité synaptique (Fig. 13) (Hotulainen and Hoogenraad, 2010). La potentialisation à long terme induit une augmentation de la proportion en actine F, responsable d'une croissance des filaments d'actine et du volume de l'épine. A l'inverse, la dépression à long terme induit une augmentation de l'actine G par rapport à l'actine F, synonyme d'une perte des filaments d'actine et d'une contraction des épines (Okamoto et al., 2004).

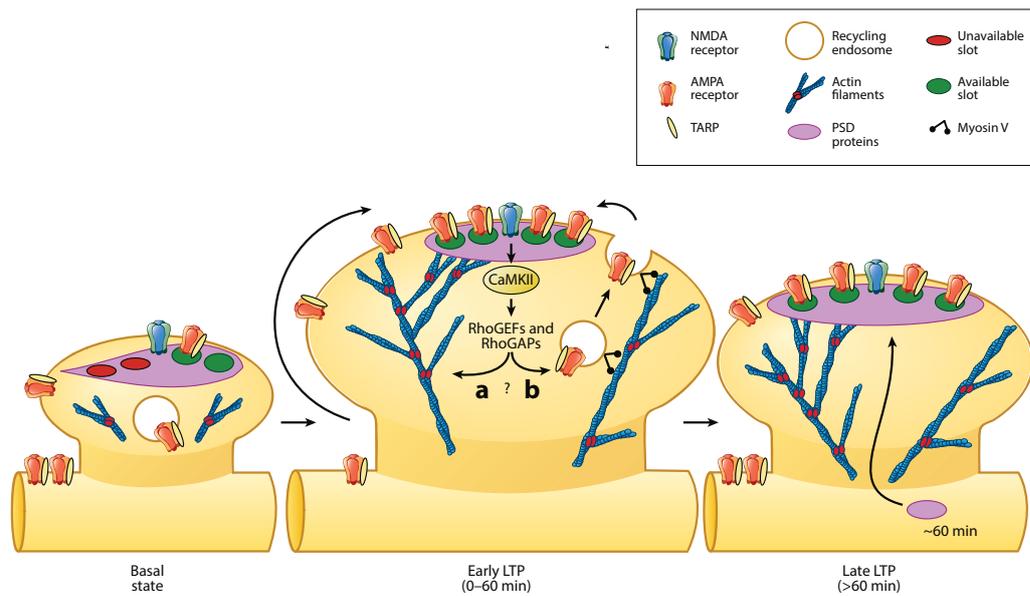


Figure 13. Le cytosquelette d'actine dans les changements de structure de l'épine dendritique pendant les processus de plasticité synaptique

La potentialisation à long terme induit une polymérisation de l'actine responsable d'une croissance des filaments d'actine qui induit une augmentation du volume de l'épine, de sa longueur et de la largeur de son cou (d'après Herring and Nicoll, 2016).

b. La compartimentalisation biochimique

La présence d'un cou plus ou moins large ou long peut modifier la diffusion de molécules entre la tête de l'épine et le dendrite. En théorie, en restreignant des molécules clés à l'intérieur de la tête de l'épine (comme des seconds messagers ou des kinases) ou en limitant le passage de molécules régulatrices (par exemple des phosphatases) du dendrite vers la tête, la constriction du cou pourrait avoir un impact dans les processus de plasticité synaptique (Alvarez and Sabatini, 2007; Tønnesen and Nägerl, 2016).

La concentration d'une molécule donnée s'équilibre le long du cou de l'épine par diffusion, selon une constante de temps τ qui reflète les propriétés de la molécule et la morphologie de l'épine. Cette constante peut être déterminée par la formule suivante (Alvarez and Sabatini, 2007; Tønnesen et al., 2014) :

$$\tau = \frac{V \times L}{D \times A}$$

dont les paramètres sont les suivants :

- V : volume de la tête de l'épine
- L : longueur du cou de l'épine
- A : aire de la section du cou de l'épine
- D : constance de diffusion de la molécule dans le cytoplasme

Suivant cette formule, le temps de diffusion τ est important pour une épine présentant un cou long et fin, synonyme d'une diffusion lente à travers le cou (Fig. 14A).

c. La compartimentalisation électrique

Le cou de l'épine peut être assimilé à un cylindre. En théorie, il oppose donc une résistance au flux de courant (Fig. 14B), qui peut être déterminée par la formule suivante (Alvarez and Sabatini, 2007; Tønnesen et al., 2014) :

$$\text{Résistance} = \frac{\rho \times L}{A}$$

dont les paramètres sont les suivants :

- L : longueur du cou de l'épine
- A : aire de la section du cou de l'épine
- ρ : résistivité du cytoplasme

Selon cette formule, un cou long et fin aura une résistance importante. Ceci aura pour conséquence d'isoler électriquement la tête du dendrite et d'augmenter les potentiels de membrane dans la tête de l'épine (Fig. 14 C) (Tønnesen and Nägerl, 2016).

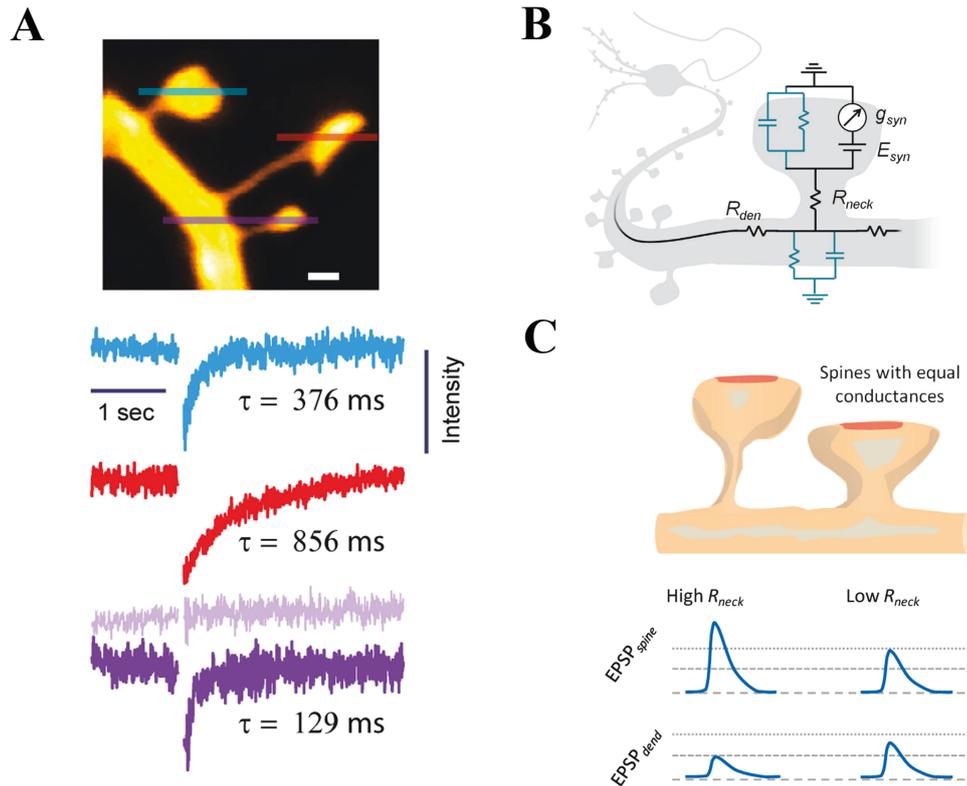


Figure 14. La compartimentalisation électrique et biochimique de l'épine

A. Effets de la morphologie de l'épine sur la compartimentalisation biochimique de l'épine. La constante de temps de diffusion (τ) est évaluée par le temps mis par une molécule pour diffuser le long du cou de l'épine et dans la tête (mesuré par recouvrement de fluorescence après « photobleaching »). Une épine avec un cou long et fin et une tête large (rouge) présente une constante de temps de diffusion importante, synonyme d'une diffusion lente à travers le cou, par rapport à une épine avec un petit cou (bleu, violet)

B. Schéma du circuit électrique dans l'épine dendritique. Un courant électrique entre dans l'épine dendritique via les récepteurs synaptiques. La résistance de la membrane est trop importante pour que le courant puisse s'échapper. Le courant va donc traverser et subir la résistance du cou (R_{neck}) puis la résistance du dendrite (R_{den}) avant d'atteindre le soma.

C. Effets de la morphologie de l'épine sur la compartimentalisation électrique et la production de potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE ou « EPSP »). Un cou long et fin aura une résistance importante (« high R_{neck} ») qui induira un PPSE élevé dans l'épine (« EPSP spine ») mais moins important dans le dendrite (« EPSP dend »). A l'inverse, un cou petit et large aura une résistance faible (« low R_{neck} ») responsable d'un PPSE moins important dans la tête de l'épine et d'une atténuation du courant électrique moins importante dans le dendrite (adaptées de Tønnesen and Nägerl, 2016).

II. 3. La transmission synaptique glutamatergique

II. 3. 1. La transmission synaptique basale

Un potentiel d'action présynaptique induit l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage. L'augmentation de la concentration calcique dans l'élément présynaptique permet la fusion des vésicules contenant le neurotransmetteur avec la membrane plasmique. L'exocytose des vésicules induit une libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique, qui va alors se lier aux récepteurs présents sur l'élément postsynaptique. Cette liaison est responsable de l'ouverture de canaux ioniques qui vont modifier le flux d'ions au niveau de l'élément post-synaptique. Le potentiel de membrane sera modifié, ayant pour conséquence une augmentation de la probabilité de génération d'un potentiel d'action par le neurone post-synaptique (Purves et al., 2004).

La transmission synaptique excitatrice est principalement médiée par le glutamate. Il existe deux types de récepteurs au glutamate : les récepteurs ionotropiques et métabotropiques.

Les récepteurs ionotropiques sont des canaux ioniques. Les récepteurs ionotropiques glutamatergiques sont de type α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), *N*-méthyl-D-aspartate (NDMA) ou kaïnate.

Les récepteurs AMPA sont composés de plusieurs sous-unités (GluA1-4) pouvant former des homo ou des hétéromères (Traynelis et al., 2010). Ils sont perméables aux cations sodiques et potassiques (Na^+ , K^+) et sous-tendent une transmission excitatrice rapide (Hunt and Castillo, 2012).

Les récepteurs NMDA sont composés de plusieurs sous-unités (GluN1, GluN2A-D, GluN3A-B). Les récepteurs NMDA fonctionnels comprennent deux sous-unités GluN1 associées soit à deux sous-unités GluN2 soit à une combinaison GluN2/GluN3. Les sous-unités GluN1 et GluN3 ont un domaine de liaison à la glycine et les sous-unités GluN2 ont un domaine de liaison au glutamate (Traynelis et al., 2010). Le canal ionique associé aux récepteurs NMDA permet l'entrée de cations calciques, sodiques et potassiques (Na^+ , K^+ et Ca^{++}). La perméabilité pour les cations est contrôlée par un bloc magnésium dépendant du voltage (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984). En effet, il faut une dépolarisation de

l'élément post-synaptique pour ôter le bloc magnésium du récepteur permettant le passage des cations (Traynelis et al., 2010). C'est pourquoi ces récepteurs sont qualifiés de détecteurs de coïncidence entre la libération de glutamate et la dépolarisation de l'élément post-synaptique. De plus, ces récepteurs nécessitent la liaison d'un co-agoniste, la glycine (Johnson and Ascher, 1987; Kleckner and Dingledine, 1988). Les courants synaptiques produits par les récepteurs NMDA sont lents et durent plus longtemps que ceux produits par les récepteurs AMPA (Purves et al., 2004). Ces récepteurs sont notamment impliqués dans le déclenchement des phénomènes de plasticité synaptique de type potentialisation ou dépression à long terme (Luscher and Malenka, 2012).

Les récepteurs kaïnate sont composés de plusieurs sous-unités (GluK1-GluK5). Les sous-unités GluK1 à GluK3 peuvent former des homo ou des hétéromères fonctionnels, et les sous-unités GluK4 et GluK5 forment des récepteurs fonctionnels seulement quand ils sont associés avec les sous-unités GluK1 à GluK3 (Lerma and Marques, 2013).

Les récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluR) sont des récepteurs couplés à des protéines G. Une fois activées, ces protéines vont agir directement au niveau des canaux ioniques ou se lier à des effecteurs modifiant des messagers intracellulaires (Conn and Pin, 1997). Ces récepteurs sont divisés en trois groupes :

- Le groupe I : formé des sous unités mGluR1 ou mGluR5. Ce groupe active généralement la phospholipase C.
- Le groupe II : formé des sous-unités mGluR2/mGluR3. Ce groupe inhibe généralement l'activité de l'adénylate cyclase.
- Le groupe III : formé des sous unité mGluR4/mGluR6/mGluR7/mGluR8. Ce groupe inhibe généralement l'activité de l'adénylate cyclase.

Afin d'évaluer la transmission synaptique basale, différents paramètres électrophysiologiques peuvent être mesurés. Parmi eux, l'enregistrement de potentiel de champ extracellulaire (« field Excitatory Post Synaptic Potential » ou « fEPSPs ») permet de mesurer la force de la transmission synaptique en mesurant la réponse d'une population de neurones à la stimulation des axones afférents. L'excitabilité des axones peut être évaluée sur ces enregistrements en mesurant l'intensité ou la pente de la « volée afférente » (« afferent volley slope »). Des mesures de la facilitation synaptique (« paired-pulse facilitation »), qui consiste à appliquer

deux stimuli rapprochés pour évaluer l'augmentation de réponse lors du second stimulus, permettent de mesurer la probabilité de libération du neurotransmetteur. L'étude de l'amplitude et de la fréquence des courants miniatures excitateurs (« miniature Excitatory Post Synaptic Currents » ou « mEPSCs ») enregistrés par des techniques de « patch clamp » permet d'évaluer les signaux produits par la libération spontanée de neurotransmetteur par le bouton présynaptique en l'absence de potentiel d'action (Henze et al., 1997). En utilisant des antagonistes des récepteurs NMDA ou AMPA, il est possible d'isoler la composante spécifique de ces récepteurs dans les signaux mesurés.

II. 3. 2. La plasticité synaptique

La plasticité synaptique recouvre différentes modifications de la transmission synaptique à court ou long terme. Nous allons présenter uniquement la potentialisation et la dépression à long terme, qui ont été très étudiées dans les modèles animaux de Maladie d'Alzheimer.

a. La potentialisation à long terme

Le phénomène de potentialisation à long terme (PLT) a été découvert dans les années 1970 par Bliss et Lomo suite à l'observation d'une augmentation de la transmission synaptique induite par de brèves stimulations à haute fréquence (Fig. 15A) (Bliss and Lomo, 1973). Différents protocoles peuvent induire une PLT, notamment des stimulations à haute fréquence, responsables d'une dépolarisation synaptique capable d'activer les récepteurs NMDA (Bliss and Collingridge, 1993; Malenka and Nicoll, 1999). Cette activation permet l'entrée de calcium à travers le canal ionique du récepteur NMDA et une augmentation de la concentration calcique dans l'épine (Malenka, 1994). Une forte concentration de calcium entraîne l'activation de kinases, notamment la kinase appelée « calcium/calmodulin-dependent protein kinase II » (CaMKII) (Lisman et al., 2012). Cette kinase phosphoryle les récepteurs AMPA (McGlade-McCulloh et al., 1993), augmentant ainsi leur trafic et leur nombre au niveau de la densité post-synaptique, ce qui renforce la transmission synaptique (Fig. 15B) (Benke et al., 1998; Herring and Nicoll, 2016; Kopec, 2006; Malinow and Malenka, 2002). Les phases plus tardives de la PLT, qui permettent de la faire perdurer

plusieurs heures voire plusieurs jours, nécessitent la synthèse de nouvelles protéines et la transcription de certains gènes (Abraham and Williams, 2003).

La potentialisation à long terme entraîne aussi des modifications au niveau de l'épine dendritique qui vont participer à l'augmentation de l'efficacité de la transmission synaptique (Fig. 15C). Matsuzaki a montré que la PLT, suite à l'activation d'épines individuelles par une libération focale de glutamate « cagé », s'accompagne d'un élargissement de l'épine (Matsuzaki et al., 2004). La tête de l'épine devient plus volumineuse et le cou plus court et plus large (Fifková and Delay, 1982; Lang et al., 2004; Yuste and Bonhoeffer, 2001). D'autre part, l'augmentation du volume de l'épine s'accompagne également d'une augmentation de la taille de leur densité post-synaptique (Yuste and Bonhoeffer, 2001). La réorganisation du cytosquelette d'actine dans les épines est essentielle dans le maintien de la PLT puisque des inhibiteurs de la polymérisation de l'actine altèrent la PLT (Kim and Lisman, 1999; Ramachandran and Frey, 2009). Le remodelage structurel de l'épine permet d'augmenter la stabilité de cette plasticité fonctionnelle dans le temps (Gruart, 2006; Whitlock et al., 2006). Enfin, la PLT permet également la création de nouvelles synapses (Engert and Bonhoeffer, 1999; Nägerl et al., 2004).

La potentialisation à long terme est souvent liée aux processus d'apprentissage et de mémoire (Escobar and Derrick, 2007; Lynch, 2004). Ce lien a été observé suite à l'altération de l'induction de la PLT et de l'apprentissage de façon dose dépendante après l'administration d'antagoniste des récepteurs NMDA. C'est-à-dire que l'antagoniste a des effets sur la mémoire uniquement aux concentrations qui bloquent la PLT (Davis et al., 1992; Morris et al., 1986). Plus récemment, il a été observé que la réalisation d'une tâche de mémoire dépendante de l'hippocampe induisait les mêmes effets chez un rat que l'induction d'une PLT (Whitlock et al., 2006).

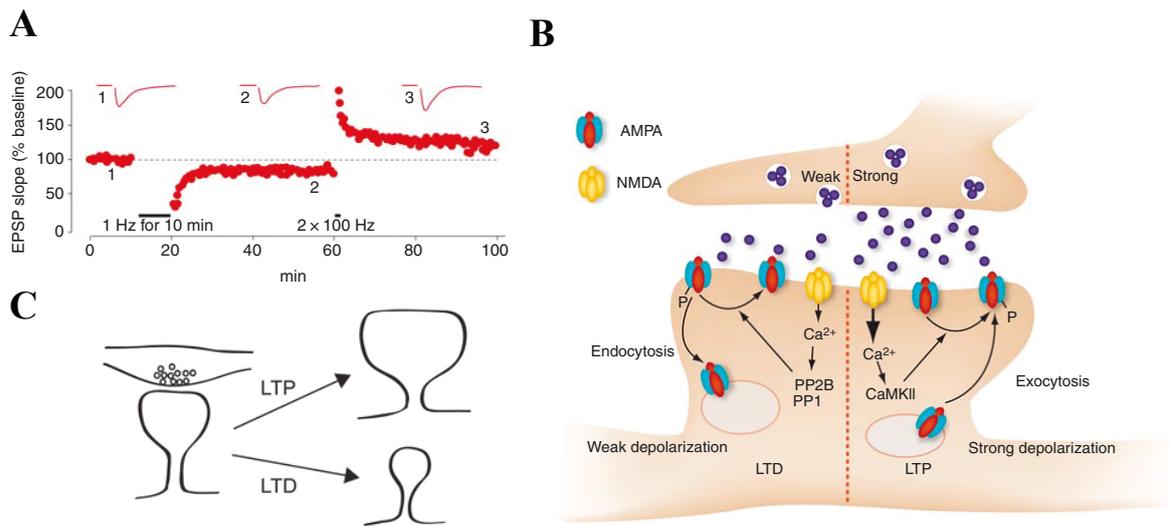


Figure 15. La plasticité synaptique

A. La plasticité synaptique se traduit par une modulation de la transmission synaptique. Une diminution de la transmission synaptique (dépression à long terme DLT – « long-term depression LTD », 2) est observée après une stimulation à faible fréquence alors que de brèves stimulations à haute fréquence induisent une augmentation de la transmission synaptique (potentialisation à long terme PLT – « long-term potentiation LTP », 3) (d'après Luscher and Malenka, 2012).

B. Mécanismes des processus de plasticité synaptique. Des stimulations à haute fréquence induisent une entrée importante de calcium qui active la kinase CaMKII responsable de la phosphorylation des récepteurs AMPA et de l'augmentation de leur nombre au niveau de la DPS, induisant une augmentation de la transmission synaptique (PLT). A l'inverse, une plus faible concentration de calcium active la phosphatase calcineurine qui va déphosphoryler les récepteurs AMPA et diminuer leur nombre à la surface, induisant une diminution de la transmission synaptique (DLT) (d'après Luscher and Malenka, 2012).

C. Changements structuraux des épines dendritiques pendant les processus de plasticité synaptique. La PLT induit un élargissement de l'épine, une augmentation du volume de la tête et un cou plus court et plus large alors que la DLT induit une diminution du volume de la tête (d'après Levy et al., 2014).

b. La dépression à long terme

La dépression à long terme (DLT) a été découverte en 1992 par Dudek et Bear qui ont utilisé des protocoles de stimulation à faible fréquence permettant une activation des récepteurs NMDA et une entrée de calcium (Fig. 15A) (Dudek and Bear, 1992). La concentration en

calcium dans l'élément post-synaptique est l'élément clé qui oriente l'épine vers une PLT ou une DLT (Lisman, 1989). Une forte concentration de calcium induit l'activation de la kinase CaMKII et une PLT. Au contraire, une faible concentration de calcium active une phosphatase appelée calcineurine sensible au calcium à faible concentration, induisant ainsi une DLT (Bear and Malenka, 1994; Mulkey and Malenka, 1992; Mulkey et al., 1994). Une fois activée, la calcineurine est responsable d'une déphosphorylation des récepteurs AMPA et d'une diminution de leur nombre à la surface (Fig. 15B) (Malinow and Malenka, 2002). D'autre part, la DLT entraîne une dépolymérisation de l'actine responsable d'une diminution du volume de la tête de l'épine (Fig. 15C) (Chen et al., 2004; Nägerl et al., 2004; Zhou et al., 2004) et d'une perte des épines (Nägerl et al., 2004; Wiegert and Oertner, 2013; Zhou et al., 2004). Il existe également une autre forme de DLT dépendante des récepteurs métabotropiques au glutamate et responsable également d'une diminution du nombre de récepteurs AMPA (Oliet et al., 1997). Toutes les modifications entraînées par la dépression à long terme ont pour conséquence de diminuer l'efficacité de la transmission synaptique.

II. 4. Altérations du fonctionnement synaptique dans les modèles de Maladie d'Alzheimer

Le peptide amyloïde β , essentiellement sous sa forme oligomérique, est responsable d'une synaptotoxicité dans plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo* (Pozueta et al., 2013b). L'application de ce peptide dans des cultures de neurones ou des tranches de cerveau induit des modifications dans la morphologie des épines dendritiques (Calabrese et al., 2007; Lacor et al., 2007), associées à des pertes d'épines (Lacor et al., 2007; Shrestha et al., 2006). Ces modifications pourraient être dûes à des changements du fonctionnement des synapses.

II. 4. 1. Effets du peptide A β sur les récepteurs au glutamate

Dans des cultures de neurones primaires traitées avec des oligomères d'A β synthétique, la quantité de récepteurs NMDA synaptiques est diminuée (Lacor et al., 2007). Une augmentation de l'endocytose de ces récepteurs, dépendante des récepteurs nicotiques $\alpha 7$, pourrait être responsable de leur diminution en surface (Snyder et al., 2005). Une réduction de la quantité de sous-unité GluR1 des récepteurs AMPA à la surface est également observée dans des cultures de neurones de souris transgéniques APP (Almeida et al., 2005). La diminution de la protéine d'échafaudage PSD95, qui joue un rôle dans la stabilisation des récepteurs aux synapses, participe à la diminution de l'expression de surface des récepteurs AMPA après incubation avec le peptide amyloïde (Roselli, 2005).

II. 4. 2. Effets du peptide A β sur la transmission synaptique

En accord avec les diminutions d'expression de surface des récepteurs, beaucoup d'études ont montré que le peptide A β , produit par différentes méthodes, pouvait induire une diminution de la transmission synaptique. Dans des tranches d'hippocampe issues de souris transgéniques APP (Hsia et al., 1999) ou dans lesquelles l'APP est surexprimée dans certains neurones (Kamenetz et al., 2003), une diminution de la transmission synaptique excitatrice est observée. Cette diminution est dépendante de l'activité des récepteurs NMDA (Kamenetz et al., 2003). D'autre part, l'application d'A β sur des cultures de neurones induit une dépression rapide et persistante des courants NMDA (Snyder et al., 2005). Dans plusieurs modèles de souris transgéniques, des modifications des courants NMDA et AMPA (Dewachter et al., 2009) ou AMPA seul (Chang et al., 2006) sont associées respectivement à une diminution du nombre de récepteurs NMDA contenant la sous-unité NR2B ou à une diminution des récepteurs AMPA.

II. 4. 3. Effets du peptide A β sur la plasticité synaptique

En plus des altérations de la transmission synaptique, le peptide amyloïde β peut perturber les phénomènes de plasticité synaptique. Une inhibition de la potentialisation à long terme a été observée dans des tranches d'hippocampe incubées avec de l'A β synthétique (Wang et al., 2002) ou produit par des cellules transfectées avec de l'APP (Townsend et al., 2006; Walsh et al., 2002a). Cette altération de la PLT est également retrouvée après injection intracérébrale d'oligomères dans des rats contrôles (Walsh et al., 2002a) ou directement observée dans des modèles transgéniques (Chapman et al., 1999). D'autres études ont montré que les oligomères pouvaient faciliter la dépression à long terme une fois incubés dans des tranches de cerveau (Li et al., 2009). Ces deux types d'altérations de la plasticité synaptique sont retrouvées dans des souris sauvages injectées avec des oligomères extraits à partir de cortex de patients atteints de Maladie d'Alzheimer où une inhibition de la PLT et une augmentation de la DLT sont observées (Shankar et al., 2008).

II. 4. 4. Hypothèse de la dépression synaptique à l'origine des pertes de synapses

Les altérations de la transmission synaptique présentes dans certains modèles ont été mises en relation avec les pertes d'épines observées. En effet, l'application d'A β dans des tranches organotypiques de cerveau de rat entraîne une perte des épines qui requiert l'activité des récepteurs NMDA (Shankar et al., 2007). Le blocage partiel des récepteurs NMDA par des agents pharmacologiques suffit à induire une perte d'épine (Shankar et al., 2007). Ainsi, selon le modèle proposé par Shankar et al., les oligomères mimeraient un blocage partiel des récepteurs NMDA. Ils pourraient diminuer l'activation des récepteurs NMDA, diminuer l'entrée de calcium via ces récepteurs, ou augmenter l'activation de la calcineurine. Ces différents effets favorisent l'induction de la dépression à long terme et inhibent l'induction de la potentialisation à long terme dépendante du NMDA (Shankar et al., 2007). La dépression synaptique induite par l'A β semble ainsi partager quelques mécanismes communs avec ceux de la dépression à long terme (Hsieh et al., 2006). En effet, l'A β utilise des voies de signalisation typiques de la DLT et pourrait induire une phosphorylation des récepteurs

AMPA, responsable d'une endocytose de ces récepteurs et donc d'une diminution de leur concentration à la surface. Cette perte de récepteurs suffit à induire une perte d'épine (Hsieh et al., 2006). Les études d'imagerie en temps réel ont montré que l'induction de la DLT induisait un rétrécissement des épines (Zhou et al., 2004), qui étaient ensuite éliminées (Wiegert and Oertner, 2013). Les oligomères d'A β pourraient donc induire une perte progressive des épines et des synapses, notamment en modifiant la balance PLT-DLT (Shankar et al., 2007).

Nous nous sommes donc demandé si des modifications de la plasticité et de la morphologie des épines ainsi que de la transmission AMPA et NMDA pouvaient être observées dans un modèle murin de Maladie d'Alzheimer présentant des pertes de synapses et de neurones (première partie des résultats).

III. Rôle du stress du réticulum endoplasmique dans les pertes de neurones et de synapses

La Maladie d'Alzheimer se caractérise par l'accumulation intracellulaire de protéine Tau formant des neurofibrilles et l'accumulation extracellulaire de peptide A β formant les plaques amyloïdes. Etant donné que ces agrégats sont formés de protéines mal repliées, cette maladie est considérée comme une pathologie de mauvais repliement des protéines (« protein misfolding »). L'accumulation de protéines mal repliées est un point commun de beaucoup de maladies, comme la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique ou encore les maladies à prions. Le réticulum endoplasmique est une organelle qui contrôle notamment le bon repliement des protéines. Un stress du réticulum endoplasmique est effectivement observé dans la Maladie d'Alzheimer. Comme des études montrent que le stress du réticulum endoplasmique est responsable des pertes de synapses et de neurones dans un modèle de maladie à prion (Moreno et al., 2012, 2013), il semble intéressant de déterminer si le stress du réticulum endoplasmique peut entraîner une perte de neurones et de synapses dans la Maladie d'Alzheimer.

III. 1. Le stress du réticulum endoplasmique

III. 1. 1. Le métabolisme des protéines

La majorité des protéines qu'une cellule sécrète ou exprime à sa surface subit des étapes de repliement et de maturation qui ont lieu dans le réticulum endoplasmique (RE), avant d'être transportée vers leur destination finale (Fig. 16) (McCaffrey and Braakman, 2016). Les polypeptides générés au niveau des ribosomes portent généralement une séquence signal permettant leur entrée dans le réticulum endoplasmique via le complexe translocon (Wang and Kaufman, 2016). Dans le RE, un système de contrôle qualité composé de chaperonnes et d'enzymes permet le bon repliement des protéines. Parmi elles se trouvent des chaperonnes de la famille HSP70 et HSP40, la calnexine, la calreticuline ; et des enzymes glucosidase, transférase et isomérase de pont disulfure (« protein disulfide isomerase » ou PDI) (Chaudhari

et al., 2014). Ce système induit des modifications co- et post-traductionnelles qui ne se déroulent pas dans le cytoplasme, notamment des glycosylations et la formation de ponts disulfures. Ces modifications sont essentielles pour le repliement correct, l'assemblage et la fonction de la majorité des protéines sécrétées (McCaffrey and Braakman, 2016). Seules les protéines correctement assemblées et repliées sortent du RE et sont transportées vers le Golgi avant d'atteindre leur destination finale (Chaudhari et al., 2014).

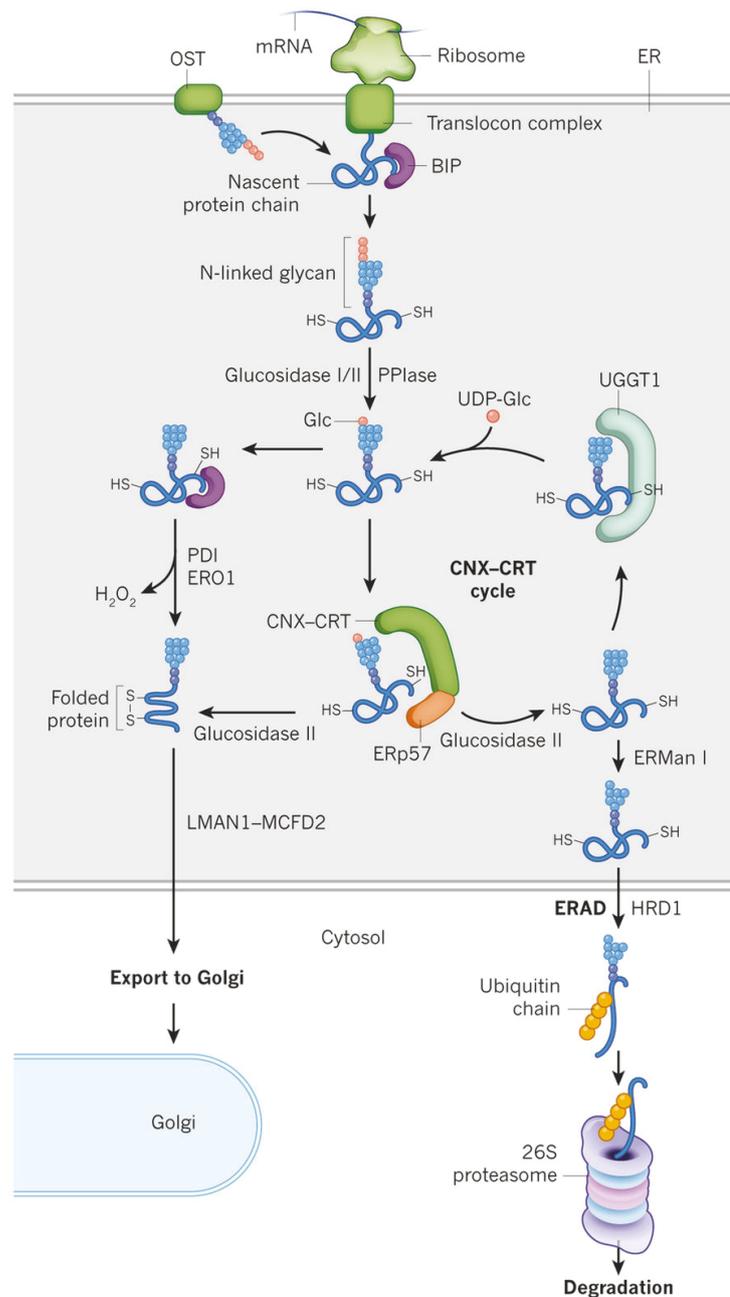


Figure 16. Le métabolisme des protéines dans le Réticulum Endoplasmique

Les protéines entrent dans le réticulum endoplasmique pour subir des étapes de repliement et de maturation. Elles sont prises en charge par des chaperones (BIP) et modifiées par des

enzymes (glucosidase, isomérase de pont disulfure (PDI) ou calnexine-calreticuline (CNX-CRT)) pour permettre un repliement correct et leur sortie du RE vers le Golgi. Si le RE n'arrive pas à replier les protéines, elles sont dirigées vers le protéasome pour être dégradées (d'après Wang and Kaufman, 2016).

Le réticulum endoplasmique sert de « check-point » pour les protéines mal repliées. Ces dernières sont retenues dans la lumière du RE pour être repliées correctement. Si malgré tout le RE n'arrive pas à les replier, des chaperonnes et des enzymes spécifiques marquent ces protéines pour faciliter leur rétro-translocation vers le cytosol où elles sont dégradées par le protéasome (« Ubiquitin Proteasome System » ou UPS). Ce processus est appelé la dégradation des protéines associée au réticulum (« Endoplasmic Reticulum Associated Degradation » ou ERAD) (Fig. 16). La dégradation d'agrégats trop larges est médiée par une autophagie associée au réticulum, où les agrégats sont acheminés vers le lysosome pour être dégradés (McCaffrey and Braakman, 2016; Smith et al., 2011).

III. 1. 2. Le stress du réticulum endoplasmique

Un déséquilibre entre une accumulation de protéines non ou mal repliées qui entrent dans le RE et la capacité de la cellule à les prendre en charge induit un stress du réticulum appelé « unfolded protein response » (UPR) (Ron and Walter, 2007; Walter and Ron, 2011).

La cellule va s'adapter en mettant en place des réactions transitoires ou prolongées pour diminuer ce stress et maintenir une homéostasie correcte dans le RE (Ron and Walter, 2007; Walter and Ron, 2011; Yamamoto et al., 2007). D'une part, la cellule va réduire le nombre de protéines entrant dans le RE en diminuant la synthèse de protéines et leur translocation dans le RE. D'autre part, elle va augmenter la capacité du RE à prendre en charge ces protéines non ou mal repliées en activant l'expression de certains gènes. Ces gènes permettent notamment l'augmentation de l'expression de protéines impliqués dans le repliement de protéines, comme les chaperonnes du RE, et de protéines impliquées dans l'ERAD ou l'autophagie pour augmenter la dégradation des protéines mal repliées (Hetz and Saxena, 2017; Meusser et al., 2005; Ron and Walter, 2007; Sitia and Braakman, 2003). D'autres gènes codent pour des protéines impliquées dans le trafic vésiculaire, le contrôle de l'oxydoréduction du RE, le métabolisme des acides aminés et la synthèse de lipides (Hetz and Saxena, 2017). Enfin, si la

cellule n'arrive pas à rétablir une homéostasie correcte, la mort de la cellule est induite pour protéger l'organisme d'une accumulation trop importante de protéines mal repliées (Ron and Walter, 2007; Shore et al., 2011).

Des stimuli autres que l'accumulation de protéines mal repliées peuvent induire un stress du RE. Une augmentation de la synthèse protéique, une diminution de la dégradation des protéines par le protéasome, une altération de l'autophagie, une carence en énergie, un excès ou une diminution de nutriments, une dérégulation de la concentration en calcium, une hypoxie ou encore une infection virale peuvent créer un stress altérant l'homéostasie et le fonctionnement du réticulum endoplasmique (Chaudhari et al., 2014; Wang and Kaufman, 2016).

III. 1. 3. Les mécanismes du stress du réticulum endoplasmique

Trois voies impliquées dans le stress du réticulum ont été identifiées. Chaque voie est définie par une protéine localisée au niveau du réticulum endoplasmique : « inositol requiring enzyme 1 » (IRE1), « activation transcription factor 6 » (ATF6) et « double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase » (PERK). Ces protéines transmembranaires sont des détecteurs de stress qui ont un domaine sensible au statut de repliement des protéines dans la lumière du RE et un effecteur cytoplasmique qui transmet l'information vers le cytosol en régulant la traduction des protéines et des facteurs de transcription (Ron and Walter, 2007).

Ces trois protéines sont liées à la chaperonne « Binding Immunoglobulin Protein » (BiP) dans leur forme inactivée. Les protéines mal repliées entrent en compétition avec ces trois protéines pour la liaison à la chaperonne BiP (Bertolotti et al., 2000; Rutkowski and Kaufman, 2004). L'accumulation de protéines mal repliées induit donc la dissociation entre BiP et les trois protéines impliquées dans le stress du RE, qui peuvent alors s'activer (Fig. 17). Les trois protéines activent des gènes responsables d'une augmentation de la capacité de repliement des protéines dans le RE tandis que d'autres voies responsables d'une diminution du nombre de protéines entrant dans le RE sont activées essentiellement par IRE1 et PERK (Walter and Ron, 2011).

a. IRE1

C'est une kinase et une endoribonucléase transmembranaire du réticulum endoplasmique (Cox et al., 1993). Une fois activée, IRE1 clive un fragment de 26 nucléotides de l'ARN messager codant pour un facteur de transcription spécifique de l'UPR appelé « X-box binding protein 1 » (XBP1). Ceci induit la formation d'un ARN messager épissé qui est traduit en facteur de transcription XBP1 (Fig. 17) (Shamu and Walter, 1996; Sidrauski and Walter, 1997; Yoshida et al., 2001).

Ce facteur de transcription va réguler l'expression de gènes impliqués dans le repliement des protéines, dans les mécanismes de contrôle qualité, dans l'expression d'enzymes de biosynthèse des lipides et de composants impliqués dans l'ERAD (Hetz and Saxena, 2017; Lee et al., 2003; Walter and Ron, 2011; Yamamoto et al., 2007).

b. ATF6

C'est une protéine transmembranaire localisée au niveau du réticulum endoplasmique (Haze et al., 1999). Suite à l'accumulation de protéines mal repliées, ce facteur est transporté dans des vésicules vers l'appareil de Golgi. Dans ce dernier, deux protéases (« site-1 protease » et « site-2 protease » ou S1P et S2P) permettent la libération d'un fragment cytosolique appelé ATF6(N) qui va activer des gènes cibles de l'UPR dans le noyau (Fig. 17) (Haze et al., 1999; Walter and Ron, 2011; Ye et al., 2000).

Les gènes cibles de la voie de l'ATF6 induisent une augmentation de l'expression de protéines du réticulum impliquées dans le repliement des protéines, comme l'isomérase de pont disulfure (PDI) et des chaperonnes, dont la chaperonne BiP de la famille des protéines de choc thermique HSP70 ou encore la chaperonne « glucose regulated protein 94 » (GRP94) de la famille HSP90 (Walter and Ron, 2011; Yamamoto et al., 2007). De plus, une augmentation de l'expression de XBP1 et de gènes impliqués dans l'ERAD est induite par cette voie (Hetz and Saxena, 2017).

c. PERK

C'est une kinase transmembranaire du réticulum endoplasmique (Harding et al., 1999). L'accumulation de protéines mal repliées induit la dissociation entre BiP et PERK qui peut alors s'activer (Bertolotti et al., 2000; Donnelly et al., 2013). Cette dernière se dimérise, s'autophosphoryle et phosphoryle un facteur d'initiation de la traduction appelé « eukaryotic initiation factor 2 α » (eIF2 α). Cette phosphorylation induit l'inactivation d'eIF2 et a pour conséquence une inhibition globale de la traduction des protéines (Fig. 17). Ainsi, le flux de protéines entrant dans le RE est diminué pour laisser du temps au RE de replier correctement les protéines et éliminer celles restant mal repliées pour rétablir l'homéostasie du RE (Donnelly et al., 2013; Harding et al., 1999; Walter and Ron, 2011).

Malgré la baisse globale de la traduction, cette voie induit la traduction sélective du facteur de transcription ATF4 (Fig. 17) (Harding et al., 2000). Ce dernier permet de surexprimer des gènes codant des protéines impliquées dans le métabolisme des acides aminés, l'autophagie, le repliement des protéines et la synthèse protéique (Harding et al., 2000; Hetz and Saxena, 2017). Enfin, ATF4 induit l'expression de la phosphatase « growth arrest and DNA damage-inducible 34 » (GADD34) qui induit une déphosphorylation d'eIF2 α (Novoa et al., 2001) permettant de rétablir la traduction des protéines (Ma and Hendershot, 2003).

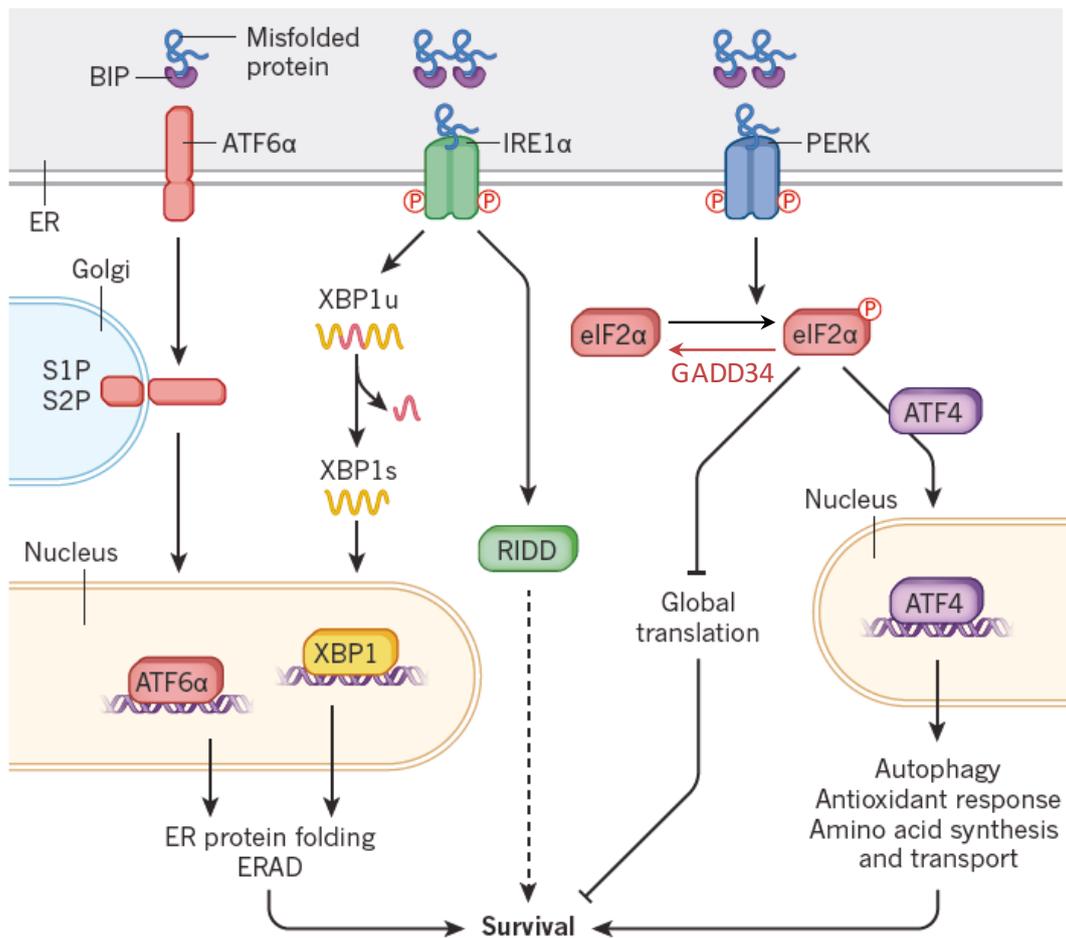


Figure 17. Les trois voies du stress du réticulum endoplasmique

Des protéines mal conformées activent trois récepteurs au niveau de la membrane du RE (ATF6, IRE1 α et PERK) responsables de la production de facteurs de transcription (ATF6(N), XBP1, ATF4) qui vont réguler l'expression de gènes impliqués dans le repliement des protéines (chaperones, ...), dans l'ERAD, dans l'autophagie ou dans la synthèse d'acides aminés dans le but de favoriser la survie cellulaire. L'activation de PERK induit également la phosphorylation d'eIF2 α responsable d'une baisse globale de la traduction des protéines. A noter que l'enzyme GADD34 induit une déphosphorylation d'eIF2 α (adaptée de Wang and Kaufman, 2016).

A noter que la protéine eIF2 α peut être phosphorylée par trois autres kinases activées par d'autres types de stress (Fig. 18) (Donnelly et al., 2013) :

- La kinase « protein kinase double-stranded RNA-dependent » (PKR) est activée suite à une infection virale, un stress oxydatif, ou par des cytokines et des facteurs de croissance.
- La kinase « general control non-derepressible-2 » (GCN2) peut être activé par une

diminution des acides aminés, une diminution du glucose, et en réponse à une infection virale, une inhibition du protéasome ou des irradiations UV.

- La kinase « heme-regulated inhibitor » (HRI) est activée par des niveaux faibles en hème ou en réponse à différents stress comme une inhibition du protéasome.

Cette réaction commune de phosphorylation d'eIF2 α par différents stimuli, qui induit une baisse de la traduction des protéines et l'expression d'ATF4 pour rétablir une homéostasie correcte, s'appelle la réponse intégrée au stress (« integrated stress response » ou ISR) (Pakos-Zebrucka et al., 2016).

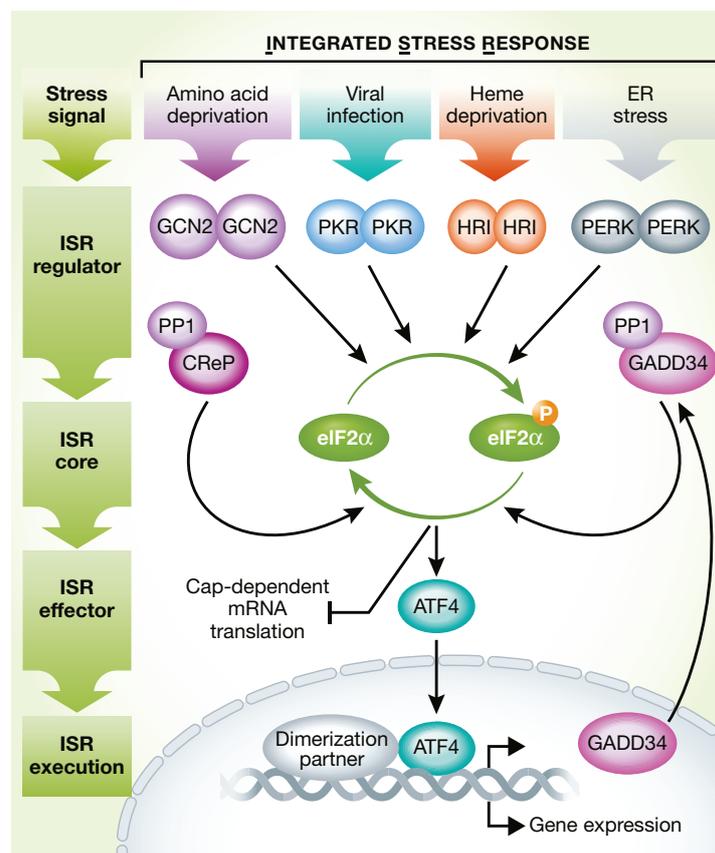


Figure 18. La réponse intégrée au stress

En plus de PERK, la protéine eIF2 α peut-être phosphorylée par trois autres kinases (GCN2, PKR, HRI) activées par des stress de natures différentes. L'activation de ces différentes kinases induit donc les mêmes effets sur la traduction des protéines (d'après Pakos-Zebrucka et al., 2016).

III. 1. 4. Le stress du réticulum endoplasmique et la mort cellulaire

En réponse à un stress du réticulum, la cellule s'adapte notamment en baissant la traduction de protéines, en augmentant la capacité de repliement par l'expression de chaperonnes ou en augmentant la dégradation des protéines, dans le but de rétablir une homéostasie correcte permettant à la cellule de survivre. Cependant, si ces processus ne suffisent plus et que le stress se prolonge dans le temps, le RE va activer des voies de mort cellulaire, notamment par l'induction de l'apoptose (Fig. 19) (Lai et al., 2007; Szegezdi et al., 2006).

Dans les cellules trop endommagées, le facteur de transcription « C/EBP homologous protein » (CHOP) est induit par les trois voies du stress du RE, et principalement par la voie PERK (Lai et al., 2007). CHOP induit l'expression de gènes proapoptotiques (comme « death receptor 5 » (DR5), « Tribbles homolog 3 » (TRB3)) et diminue l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, entraînant l'activation de l'apoptose. En effet, Bcl-2 permet la survie cellulaire en séquestrant des protéines à domaine BH3 (Bad, Bim, Noxa, Puma) nécessaires à la perméabilisation de la mitochondrie par Bax-Bak et l'apoptose (Tabas and Ron, 2011). Les protéines Bax et Bak changent de conformation et s'oligomérisent au niveau de la membrane du RE suite à un stress, augmentant le flux de calcium du RE vers le cytoplasme. Le calcium active la m-calpain (une protéase dépendante du calcium) qui clive et active la procaspase 12 (Lai et al., 2007) (Fig. 19). La pro-caspase 12 chez la souris est située sur le côté cytoplasmique du RE et peut être clivée et activée en caspase 12 par le stress du RE. Absente chez l'homme, il a été proposé que la caspase 4 soit l'homologue de la caspase 12 murine. L'implication de la caspase 12 dans l'apoptose est encore sujette à débat (Lai et al., 2007; Nakagawa et al., 2000). La caspase 12 activée cliverait et activerait la procaspase 9 qui active d'autres caspases comme la caspase 3. De plus, le calcium peut être capté par la mitochondrie ce qui crée une dépolarisation de la membrane interne de la mitochondrie et la libération de cytochrome c (Fig. 19). Ce dernier stimule l'assemblage de l'apoptosome qui active la caspase 9, qui elle-même active la caspase 4, la fragmentation de l'ADN et la mort de la cellule (Lai et al., 2007).

De plus, CHOP induit l'expression de l'oxydase 1α du réticulum endoplasmique (« ER oxidase 1α » ou ERO1 α) qui est responsable d'un transfert d'électrons vers l'oxygène pendant la formation des ponts disulfure, entraînant la production de peroxyde d'hydrogène

(Marciniak et al., 2004). Dans le cytoplasme, le peroxyde d'hydrogène induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène toxiques pour la cellule (Lai et al., 2007; Tabas and Ron, 2011; Wang and Kaufman, 2016). L'hyperoxydation induit un efflux de calcium à partir du RE, capté ensuite par la mitochondrie qui va produire à son tour différentes espèces réactives de l'oxygène. CHOP est donc responsable d'un stress oxydatif et d'une altération du fonctionnement des mitochondries contribuant à la mort des cellules (Wang and Kaufman, 2016). Enfin, la phosphatase GADD34 est une cible de CHOP. Une fois activée par CHOP, elle induit la déphosphorylation d'eif2 α , rétablissant ainsi la traduction des protéines. Le rétablissement de la synthèse de protéine peut augmenter la charge de protéines et promouvoir le stress du RE (Lai et al., 2007).

Une fois activée, IRE1 interagit avec la protéine adaptatrice « tumour necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor-2 » (TRAF2) et induit une cascade de phosphorylations qui active la voie « c-Jun NH₂-terminal kinase » (JNK), responsable de la mort des cellules (Tabas and Ron, 2011; Urano et al., 2000). Le mécanisme par lequel JNK peut induire l'apoptose pourrait faire intervenir la régulation des protéines de la famille Bcl-2 (Fig. 19).

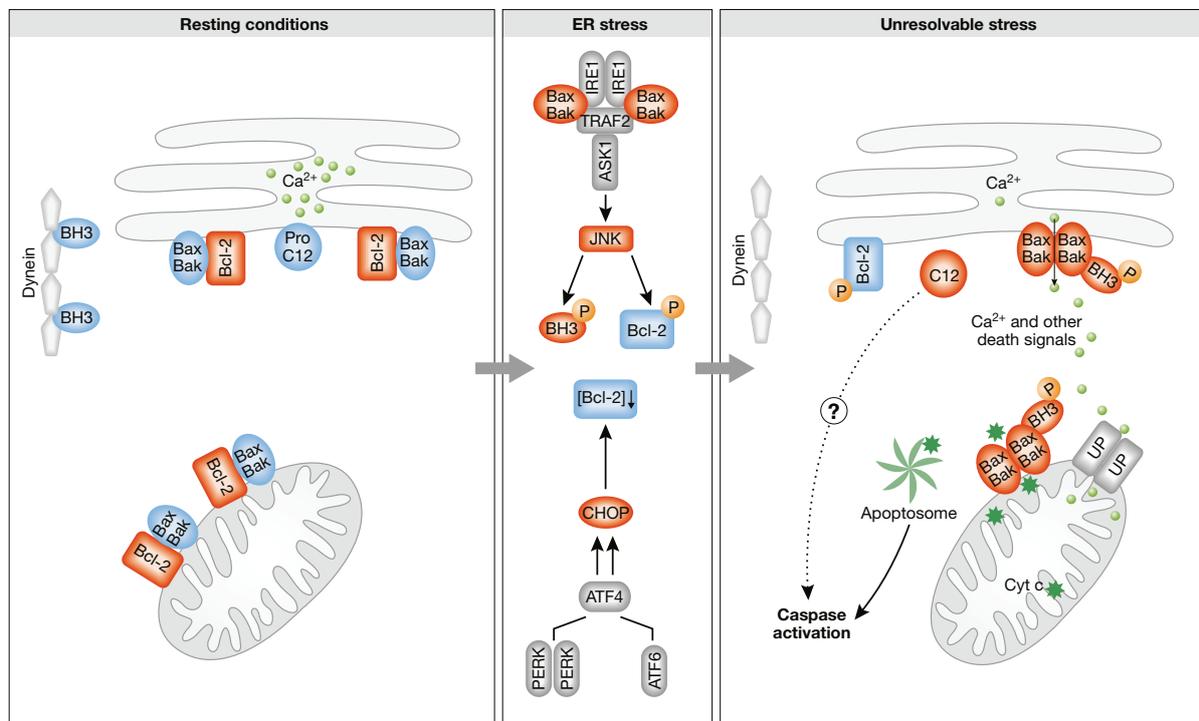


Figure 19. Stress du réticulum endoplasmique et apoptose

En situation normale, les protéines Bax-Bak sont maintenues inactives par une interaction avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au niveau de la mitochondrie et du RE. Dans les cellules trop endommagées, un stress important du RE se traduit par l'activation de

PERK/ATF6/IRE1 α qui induisent l'expression du facteur de transcription CHOP et de la voie JNK qui vont inhiber l'activité anti-apoptotique de Bcl-2. Ceci résulte en l'activation des protéines Bax-Bak qui induit une augmentation du flux de calcium du RE vers le cytoplasme responsable de l'activation des caspases et de la libération de cytochrome c par la mitochondrie. Le cytochrome c est impliqué dans l'activation de l'apoptosome (d'après Szegezdi et al., 2006).

III. 1. 5. Implication de la phosphorylation d'eIF2 α dans la plasticité synaptique et la mémoire

Le stress du réticulum endoplasmique pourrait moduler la plasticité synaptique en modulant la phosphorylation d'eIF2 α par la voie PERK. En effet, la modulation de la phosphorylation d'eIF2 α par voie génétique ou pharmacologique a permis de mettre en évidence l'impact de cette phosphorylation sur les processus de plasticité synaptique et sur la mémoire.

Un train de stimulation unique induit une potentialisation transitoire (« early long-term potentiation » ou E-LTP) alors qu'une stimulation répétée induit une potentialisation à long terme (« late long-term potentiation » ou L-LTP) qui dure plusieurs heures (Costa-Mattioli et al., 2007; Kandel, 2001). Quand la phosphorylation d'eIF2 α est augmentée suite à l'injection d'une molécule dérivée du Salubrinal bloquant sa déphosphorylation en inhibant sa phosphatase spécifique GADD34, seule la phase précoce de la PLT (E-LTP) est induite par des stimulations répétées (Costa-Mattioli et al., 2007). L'induction de la phase tardive de la PLT et la mémoire à long terme sont altérées respectivement dans des souris et rats sauvages traités par le dérivé du Salubrinal.

A l'inverse, le traitement de souris avec un composé agissant en aval d'eIF2 α , et qui empêche l'inhibition de la traduction des protéines, induit une augmentation de l'apprentissage et de la mémoire chez des souris sauvages (Sidrauski et al., 2013). En accord avec ces résultats pharmacologiques, le seuil pour induire la phase tardive de la PLT est abaissé dans des tranches d'hippocampe de souris où le site de phosphorylation d'eIF2 α est muté. Ces souris, dans lesquelles la phosphorylation d'eIF2 α est diminuée, vont présenter une augmentation de l'apprentissage et de la mémoire dans différentes tâches comportementales (Costa-Mattioli et al., 2007).

La phosphorylation d'eIF2 α est augmentée lors du stress du RE par la kinase PERK mais aussi lors d'autres stress par d'autres kinases telles que PKR (cf. ci-dessus). Les améliorations d'apprentissage et de mémoire sont également observées dans des souris transgéniques où le gène codant pour PKR est invalidé (PKR Knock-out) (Zhu et al., 2011). Dans les tranches d'hippocampe de ces souris, une augmentation de la phase tardive de la PLT (L-LTP) est observée. En outre, la suppression de PKR est responsable d'une hyperexcitabilité du réseau et l'administration d'un inhibiteur sélectif de PKR induit le même phénotype dans des souris sauvages (Zhu et al., 2011).

Enfin, différentes études ont montré que la phosphorylation d'eIF2 α pouvait moduler la dépression à long terme dépendante de mGluR. En effet, Di Prisco et al. ont observé que l'augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α augmente la dépression à long terme induite par mGluR, associée à une suppression de récepteurs AMPA à la surface (Di Prisco et al., 2014). A l'inverse, Trinh et al. ont observé que la délétion génétique de PERK augmente la dépression à long terme induite par mGluR (Trinh et al., 2014).

III. 2. Le stress du réticulum endoplasmique dans la Maladie d'Alzheimer

Un stress du réticulum endoplasmique est observé dans les cerveaux de patients atteints de Maladie d'Alzheimer (Fig. 20). En effet, une immunoréactivité importante pour les formes phosphorylées d'eIF2 α et PKR est observée dans des neurones après immunohistochimies de coupes de cerveaux de patients atteints de Maladie d'Alzheimer (Chang et al., 2002a). L'observation d'un stress du réticulum est confirmé par la présence d'autres marqueurs comme PERK phosphorylé dans l'hippocampe de patients (Hoozemans et al., 2005). D'autres études ont confirmés ces observations (Stutzbach et al., 2013; Unterberger et al., 2006) et une augmentation de l'expression de la chaperonne BiP dans le cortex temporal et l'hippocampe des patients a également été observée par western blot et immunohistochimie (Hoozemans et al., 2005).

La forme phosphorylée de PERK est observée dans les neurones présentant un marquage diffus de la protéine tau phosphorylée, en l'absence de dégénérescences neurofibrillaires.

Ainsi, en étudiant ces marqueurs en fonction de la neuropathologie (c'est-à-dire en fonction des stades de Braak), Hoozemans et al. ont conclu que l'activation du stress du réticulum est présente dès les stades précoces de la maladie (Hoozemans et al., 2005, 2009). En outre, une corrélation linéaire est également retrouvée dans les cerveaux de patients Alzheimer entre les stades de Braak et la phosphorylation d'IRE1 (Duran-Aniotz et al., 2017). De façon intéressante, un polymorphisme dans le promoteur du gène de XBP1 a été proposé comme un facteur de risque pour développer la Maladie d'Alzheimer (Liu et al., 2013b).

A noter que différents marqueurs du stress du réticulum endoplasmique sont également observés dans les cerveaux de patients atteints d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, la maladie à prion, la maladie d'Huntington, la démence frontotemporale ou encore la sclérose latérale amyotrophique (Fig. 20) (Scheper and Hoozemans, 2015).

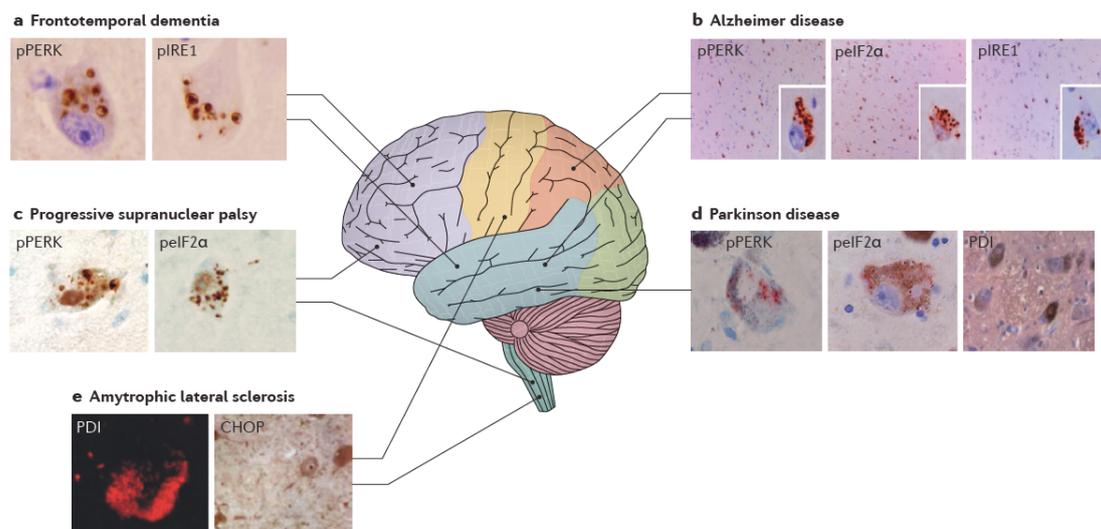


Figure 20. Stress du réticulum endoplasmique dans la Maladie d'Alzheimer et dans d'autres maladies neurodégénératives

Mise en évidence d'un stress du réticulum endoplasmique dans des cerveaux de patients atteints de démence frontotemporale (a), de Maladie d'Alzheimer (b), de paralysie supranucléaire progressive (c), de maladie de Parkinson (d) et de sclérose latérale amyotrophique (e) par l'observation d'une augmentation de l'immunomarquage dirigé contre des marqueurs du stress du RE comme phospho-PERK ou phospho-eIF2α (d'après Hetz and Saxena, 2017).

III. 3. Implication du stress du réticulum endoplasmique dans les pertes de neurones et de synapses dans des modèles de maladies neurodégénératives

III. 3. 1. Un stress du réticulum endoplasmique est observé dans des modèles de maladie d'Alzheimer

Différentes études dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de la Maladie d'Alzheimer ont permis d'étudier l'implication de l'A β dans l'induction d'un stress du réticulum.

Dans des cultures cellulaires de neuroblastome murin et humain ou de neurones primaires de rat, une augmentation de l'activation de PKR et de la phosphorylation d'eIF2 α est observée après un traitement avec des espèces d'A β (A β 25-35 et A β 1-42) (Chang et al., 2002b). L'application d'oligomères d'A β sur des cultures cellulaires induit l'UPR mesuré par un indicateur fluorescent du stress du RE (Chafekar et al., 2007). Ces observations sont confirmées par la mise en évidence d'une augmentation de la phosphorylation d'IRE1 α , d'eIF2 α et de PKR, ainsi que d'une augmentation de Xbp1 et de la chaperonne Bip dans des cultures de neurones primaires d'hippocampe de rat traitées avec des oligomères d'A β (Lourenco et al., 2013). Enfin, l'application d'A β sur des cultures de neurones primaires issus de souris dont le gène codant pour PKR est supprimé entraîne moins d'apoptose que lors d'une exposition sur des cultures issues de souris sauvages (Chang et al., 2002b). Les auteurs suggèrent que l'expression de PKR rend les neurones plus sensibles à la toxicité de l'A β , même si l'absence d'expression de PKR n'offre pas une neuroprotection complète (Chang et al., 2002b).

Un stress du réticulum endoplasmique peut également être observé *in vivo* dans différents modèles animaux de la Maladie d'Alzheimer par la mise en évidence d'une augmentation des marqueurs de l'UPR. Page et al. ont observé une augmentation par western blot des kinases PKR et PERK dans le cerveau d'une souris modèle de la Maladie d'Alzheimer (APPxPS1-KI) qui développe des pertes de neurones (Page et al., 2006). Un autre modèle (5XFAD) présente une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α qui est responsable d'une augmentation de la traduction de BACE1, une enzyme clivant l'APP, induisant une surproduction d'A β

(O'Connor et al., 2008). L'injection intracérébroventriculaire d'oligomères d'A β dans des singes induit une activation de PKR et la phosphorylation d'eIF2 α dans l'hippocampe et le cortex entorhinal (Lourenco et al., 2013). Enfin, dans une souris modèle de la Maladie d'Alzheimer (APP^{swe}/PS1^{deltaE9}), Ma et al. ont observé une augmentation de phospho-eIF2 α et d'ATF4 dans l'hippocampe et le cortex préfrontal par western blot (Ma et al., 2013). La suppression génétique de la kinase PERK dans ce modèle prévient l'augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α et réduit les niveaux d'A β , les déficits de synthèse protéique, les déficits de PLT et de mémoire spatiale (Ma et al., 2013).

A noter que l'augmentation du stress du réticulum n'est pas spécifique aux modèles de maladie d'Alzheimer. D'autres modèles de maladies neurodégénératives présentent une augmentation du stress du réticulum endoplasmique, notamment des modèles de maladie à prions (Moreno et al., 2012) ou encore des modèles de démence frontotemporale (Radford et al., 2015).

III. 3. 2. Le stress du réticulum endoplasmique module la plasticité synaptique et la mémoire dans des modèles de Maladie d'Alzheimer

Puisque des altérations de la plasticité synaptique, observées dans beaucoup de souris modèles de la Maladie d'Alzheimer, peuvent être responsables de pertes de synapses (voir chapitre précédent), l'étude des effets du stress du RE sur la plasticité synaptique dans les modèles de maladie d'Alzheimer semble intéressante.

La phosphorylation d'eIF2 α pourrait avoir un impact sur la plasticité synaptique dans la Maladie d'Alzheimer. Ma et al. ont réduit la phosphorylation d'eIF2 α et prévenu la baisse de la traduction des protéines en supprimant le gène PERK dans une souris modèle de la Maladie d'Alzheimer (APP^{swe}PS1^{deltaE9}) présentant une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α (Ma et al., 2013). La diminution de la potentialisation à long terme, les altérations d'apprentissage et les déficits de mémoire dans différents tests initialement observés dans le modèle ne sont plus retrouvés après suppression du gène PERK (Ma et al., 2013). En outre, alors que l'application d'A β sur des tranches de souris sauvage induit une inhibition de la potentialisation à long terme, elle n'a aucun effet une fois appliquée sur des tranches de souris

déficientes en PERK (PERK cKO). La délétion de PERK suffit ainsi à bloquer les effets de l'A β sur la plasticité synaptique et les déficits de mémoire (Ma et al., 2013). Dans ce même modèle (APPswePS1deltaE9), une inhibition de la dépression à long terme dépendante de mGluR a été observée (Yang et al., 2016). La suppression génétique (PERK cKO) ou pharmacologique (inhibiteur de PERK) de l'activité de PERK dans ce modèle permet de retrouver un niveau de dépression à long terme dépendante de mGluR semblable aux souris sauvages (Yang et al., 2016).

Récemment, une étude a montré que la suppression d'IRE1 dans une souris modèle de Maladie d'Alzheimer (5xFAD) par un knock-out conditionnel du gène *Ern1* permettait d'améliorer l'apprentissage et la mémoire dans la tâche de la piscine de Morris par rapport aux souris modèles de Maladie d'Alzheimer sans knock-out (Duran-Aniotz et al., 2017). La suppression d'IRE1 permet également de restaurer la potentialisation à long terme qui était altérée. Ainsi, l'inhibition de la signalisation d'IRE1 suffit à prévenir les déficits cognitifs et synaptiques dans une souris modèle de la Maladie d'Alzheimer (Duran-Aniotz et al., 2017).

III. 3. 3. Le stress du réticulum endoplasmique induit une perte de neurones et de synapses dans des modèles de maladies neurodégénératives

L'implication du stress du RE dans les pertes de neurones et de synapses a été étudiée dans plusieurs modèles de maladies neurodégénératives (Freeman and Mallucci, 2016).

L'injection de prion dans une souris modèle induit une accumulation de la protéine prion, qui entraîne une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α (Moreno et al., 2012). Dans ce modèle, des pertes de synapses et de neurones sont observées. L'administration de salubrinal, un inhibiteur de la déphosphorylation d'eIF2 α , augmente les niveaux d'eIF2 α phosphorylé ce qui accélère la pathologie, en induisant une perte neuronale plus précoce et une diminution de la survie des souris (Moreno et al., 2012). A l'inverse, stimuler la déphosphorylation d'eIF2 α par l'injection d'un lentivirus qui surexprime GADD34, la phosphatase spécifique d'eIF2 α , restaure la traduction des protéines et prévient les pertes de synapses et de neurones. Cette stratégie permet d'augmenter la survie des souris (Moreno et al., 2012). Des effets similaires ont été observés avec un traitement pharmacologique de ces souris avec un inhibiteur sélectif

de la kinase PERK (GSK2606414) (Moreno et al., 2013). Ce traitement diminue la phosphorylation de PERK et d'eIF2 α dans les cerveaux de ces souris, ce qui prévient l'inhibition de la traduction des protéines. Il empêche l'apparition des signes cliniques de la maladie à prion (comme des paralysies), la progression de la dégénérescence spongiforme caractéristique du modèle dans différentes régions du cerveau et prévient la perte de neurones dans le champ CA1 de l'hippocampe (Moreno et al., 2013). Selon cette équipe de recherche, l'induction de l'UPR dans ce modèle de maladie à prions induit une baisse de la traduction de protéines pré- et post-synaptiques clés (SNAP25 et PSD95), dont les niveaux vitaux sont maintenus grâce au traitement oral (Moreno et al., 2013).

En outre, l'administration de ce même inhibiteur de PERK (GSK2606414) a des effets bénéfiques dans un modèle de démence frontotemporale où la protéine mal repliée est une forme mutante de tau (Radford et al., 2015). Ce modèle développe des déficits de mémoire et d'activité motrice ainsi qu'une perte de neurones. Il présente une augmentation de la forme phosphorylée d'eIF2 α et d'ATF4 à 6 mois, qui coïncident avec la perte de neurone et les déficits de mémoire. L'administration de l'inhibiteur réduit la phosphorylation d'eIF2 α , restaure les niveaux de synthèse protéique et inhibe la perte de neurones et l'apparition des signes cliniques (Radford et al., 2015).

Le composé GSK2606414 présente néanmoins des effets secondaires systémiques non négligeables, avec une perte de poids et une hyperglycémie modérée chez les souris traitées. Il présente en effet une toxicité pancréatique importante puisqu'il inhibe également l'activité de PERK dans le pancréas (Moreno et al., 2013; Radford et al., 2015). Le pancréas est un organe présentant une importante fonction de sécrétion de protéines, dont la régulation de la traduction par la phosphorylation d'eIF2 α est très importante. D'autres composés qui n'induisent pas de toxicité pancréatique ont été développés (Halliday et al., 2015). Une petite molécule appelée ISRIB (N,N'-trans-(cyclohexane-1,4-diyl)-bis-(2-(4-chlorophenoxy) acetamide) prévient l'inhibition de la traduction des protéines médiée par la réponse intégrée au stress en aval de la phosphorylation d'eIF2 α . Dans un modèle de maladie à prions, ce composé permet de réduire ATF4 et de restaurer la synthèse protéique, sans toxicité pour le pancréas. Les souris ainsi traitées présentent une dégénérescence spongiforme diminuée sans pertes de neurones dans l'hippocampe et ne développent pas de signes cliniques de la maladie à prions (Halliday et al., 2015). La restauration de la synthèse protéique est moins forte que pour les composés inhibant directement PERK ce qui permet d'éviter l'apparition d'effets secondaires sur le pancréas (Halliday et al., 2015).

En 2017, deux molécules qui atténuent l'inhibition de la traduction des protéines induite par la phosphorylation d'eIF2 α ont été identifiées par le criblage d'une banque de molécules (Halliday et al., 2017). Ces deux molécules sont le dibenzoylmethane et la trazodone. Ce dernier est un antidépresseur de la famille des antagonistes de la sérotonine et des inhibiteurs de sa recapture, déjà autorisé par la « Food and Drug Administration » (FDA, l'équivalent de l'Agence National de Sécurité des Médicaments ANSM en France). Ces molécules préviennent la perte de neurones dans des modèles de maladie à prion et de démence frontotemporale sans toxicité systémique (Halliday et al., 2017). De plus, elles préviennent les déficits de mémoire, le développement de signes cliniques et neurologiques et permettent une augmentation de la survie dans le modèle de maladie à prions. Elles préviennent également les déficits de mémoire et réduisent l'atrophie hippocampique dans le modèle de démence frontotemporale (Halliday et al., 2017).

Enfin, quelques études sur le rôle du stress du réticulum ont été réalisées dans des modèles de Maladie d'Alzheimer. Dans un modèle murin (5XFAD), une production accélérée de peptide A β 42 est responsable de l'accumulation de dépôts précoces. Ce modèle présente une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α plus tardive et une perte de neurones cholinergiques (Devi and Ohno, 2014). La diminution génétique de PERK (haploinsuffisance), entraînant une réduction des formes phosphorylées de PERK et d'eIF2 α , est suffisante pour prévenir les déficits de mémoire et la perte de neurones cholinergiques dans ce modèle (Devi and Ohno, 2014). De plus, elle prévient l'augmentation de BACE1, entraînant ainsi une diminution de production du peptide A β et des plaques (Devi and Ohno, 2014). D'autre part, dans des cultures de neurones d'hippocampe, l'ajout d'oligomères d'A β induit une diminution de l'immunoréactivité de marqueurs synaptiques (synaptophysine et PSD95) qui est prévenue par un traitement avec un inhibiteur de PKR (Lourenco et al., 2013). Lourenco et al. proposent que les oligomères d'A β induisent une augmentation de TNF α responsable de l'activation de PKR et d'une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α (Lourenco et al., 2013).

En définitive, des marqueurs du stress du réticulum sont observés à la fois dans le cerveau de patients atteints de la Maladie d'Alzheimer et dans des modèles de la maladie. L'implication de ce stress dans les pertes de neurones et de synapses a été étudié dans plusieurs modèles de maladies neurodégénératives. La démonstration la plus importante de l'impact du stress du

RE provient des études faites dans un modèle de maladie à prions dans lequel l'inhibition génétique ou pharmacologique du stress du RE suffit à prévenir la perte de neurone et de synapse. Nous avons donc utilisé une stratégie similaire à celle utilisée dans le modèle de maladie à prions (Moreno et al., 2012), pour étudier son implication dans les pertes de neurones et de synapses observées dans un modèle murin de maladie d'Alzheimer (première partie des résultats).

IV. Rôle des altérations du système lysosomal dans les pertes de neurones et de synapses

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'accumulation anormale de protéines comme le peptide amyloïde dans la Maladie d'Alzheimer. Cette accumulation pourrait être la conséquence d'un déséquilibre entre sa production et son élimination. Par exemple, les formes familiales de Maladie d'Alzheimer présentent des mutations dans les gènes de l'APP et des présénilines responsables d'une augmentation de production du peptide amyloïde (Scheuner et al., 1996). D'autre part, les taux de clairance de l'A β peuvent être diminués chez certains patients atteints de Maladie d'Alzheimer sporadique, sans modification de la production de ce peptide, créant ainsi un déséquilibre (Mawuenyega et al., 2010). Beaucoup de maladies neurodégénératives se caractérisent par une accumulation de protéines. C'est pourquoi une anomalie de la clairance des protéines pourrait constituer un point commun à ces pathologies. Les lysosomes sont des organelles dont la fonction principale est la dégradation de substrats dans la cellule. Des pathologies du lysosome (« Lysosomal Storage Disease » ou LSD), comme la maladie de Niemann-Pick type C (Platt et al., 2012; Schultz et al., 2011), caractérisées par une accumulation de lysosomes avec des contenus non digérés, présentent des similitudes avec la Maladie d'Alzheimer. En particulier, des dépôts d'A β ainsi qu'une perte de neurones peuvent être observés dans ces pathologies (Jin et al., 2004). Ces données suggèrent qu'une altération du système lysosomal pourrait entraîner une perte de neurones et de synapses dans la Maladie d'Alzheimer.

IV. 1. La physiologie des lysosomes

IV. 1. 1. La structure des lysosomes

Les lysosomes ont été décrit pour la première fois en 1955 par Christian de Duve (De Duve, 2005; De Duve et al., 1955). Ce sont des organelles formés d'une membrane lipidique qui entoure une lumière contenant des hydrolases (Fig. 21).

La membrane des lysosomes permet d'isoler l'environnement luminal acide du reste de la cellule, notamment grâce à la présence d'un glycocalyx sous la membrane qui la protège d'une dégradation par les hydrolases (Settembre et al., 2013). La membrane contient des protéines impliquées dans le transport de composés à travers la membrane, dans l'acidification de la lumière ou encore dans la fusion des lysosomes avec d'autres structures cellulaires (comme les endosomes tardifs, les autophagosomes ou la membrane de la cellule) (Saftig and Klumperman, 2009). L'acidification des lysosomes est médiée notamment par la présence de différents canaux ioniques et d'un canal « vacuolar ATPase » (v-ATPase) permettant le transport de protons dans le lysosome (Nishi and Forgac, 2002; Ohkuma et al., 1982). La présence de Rab GTPases et de protéines SNARE sur la membrane intervient dans le trafic et la fusion des lysosomes (Jahn and Scheller, 2006; Zerial and McBride, 2001). D'autres éléments sont présents au niveau de la membrane des lysosomes comme des protéines impliquées dans l'évaluation du contenu des lysosomes et de sa régulation, des transporteurs, des enzymes ou encore des canaux ioniques (Fig. 21) (Settembre et al., 2013).

La lumière des lysosomes contient une soixantaine d'hydrolases différentes (sulphatases, glycosidases, peptidases, phosphatases, lipases ...), actives à pH acide et impliquées dans le catabolisme de nombreux substrats (Sleat et al., 2007). L'import de ces enzymes dans les lysosomes implique la présence d'un domaine mannose-6-phosphate (Ghosh et al., 2003).

Il existe différents marqueurs des lysosomes permettant leur mise en évidence, comme par exemple des protéines de structure (« Lysosome-associated membrane protein 1 » ou Lamp-1) ou encore des hydrolases (cathepsines B, D, L).

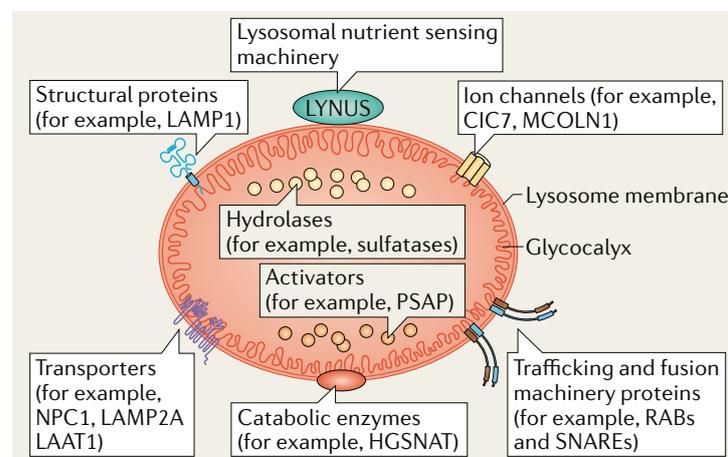


Figure 21. Structure d'un lysosome

Schéma décrivant la composition de la membrane et de la lumière des lysosomes (d'après Settembre et al., 2013).

IV. 1. 2. Les fonctions des lysosomes

La principale fonction des lysosomes est la dégradation de substrats, médiée grâce à la présence de différents types d'hydrolases et d'un pH acide dans leur lumière. Généralement, les substrats extracellulaires ou associés à la membrane plasmique destinés à être dégradés atteignent les lysosomes par la voie de l'endocytose (Fig. 22) (Luzio et al., 2009). Les substrats intracellulaires sont quant à eux transportés vers les lysosomes par la voie de l'autophagie (Fig. 22) (Mizushima et al., 2008; Settembre et al., 2013). Il existe trois types d'autophagie qui permettent notamment la dégradation d'agrégats protéiques, de lipides oxydés ou encore d'organelles altérées (Settembre et al., 2013) :

- La microautophagie, dans laquelle les substrats sont directement pris en charge dans les lysosomes par une invagination de la membrane des lysosomes ou des endosomes.
- L'autophagie médiée par les chaperones, où le transport des substrats implique la présence de chaperones.
- La macroautophagie (appelée généralement autophagie), dans laquelle des vésicules à double membrane (autophagosomes) séquestrent les substrats cytoplasmiques avant de fusionner avec les lysosomes. La formation des autophagosomes commence par la formation d'un phagophore, qui sera suivie d'une nucléation et d'une élongation. La fusion des autophagosomes avec les lysosomes induit la formation d'autolysosomes dans lesquels le contenu des autophagosomes est dégradé par les hydrolases lysosomales (Kaur and Debnath, 2015; Shen and Mizushima, 2014).

De plus, le lysosome joue également un rôle dans l'évaluation du niveau en nutriment et l'induction d'une signalisation en fonction de ce niveau. Cette fonction est essentiellement médiée via la kinase « mammalian target of rapamycin complex 1 » (mTORC1) présente sur la surface des lysosomes (Settembre et al., 2013; Zoncu et al., 2011). Cette dernière est activée par des facteurs de croissance, des hormones, des acides aminés, du glucose, de l'oxygène et un stress. Par exemple, la présence de nutriments active mTORC1 qui phosphoryle et supprime l'activité d'un complexe de kinases impliqué dans la biogénèse des autophagosomes. Une fois activée, mTORC1 régule la synthèse de protéines, d'ARN messagers, de lipides ou encore d'ATP. A l'inverse, l'inhibition de mTORC1 par certaines molécules ou encore par l'absence de nutriments induit l'activation du complexe de kinases et

donc l'autophagie (Perluigi et al., 2015; Settembre et al., 2013). mTORC1 régule ainsi la balance entre la biosynthèse et le catabolisme.

Les lysosomes sont également capables d'exocytoser leur contenu à l'extérieur de la cellule et peuvent être impliqués dans la réparation de la membrane plasmique (Settembre et al., 2013).

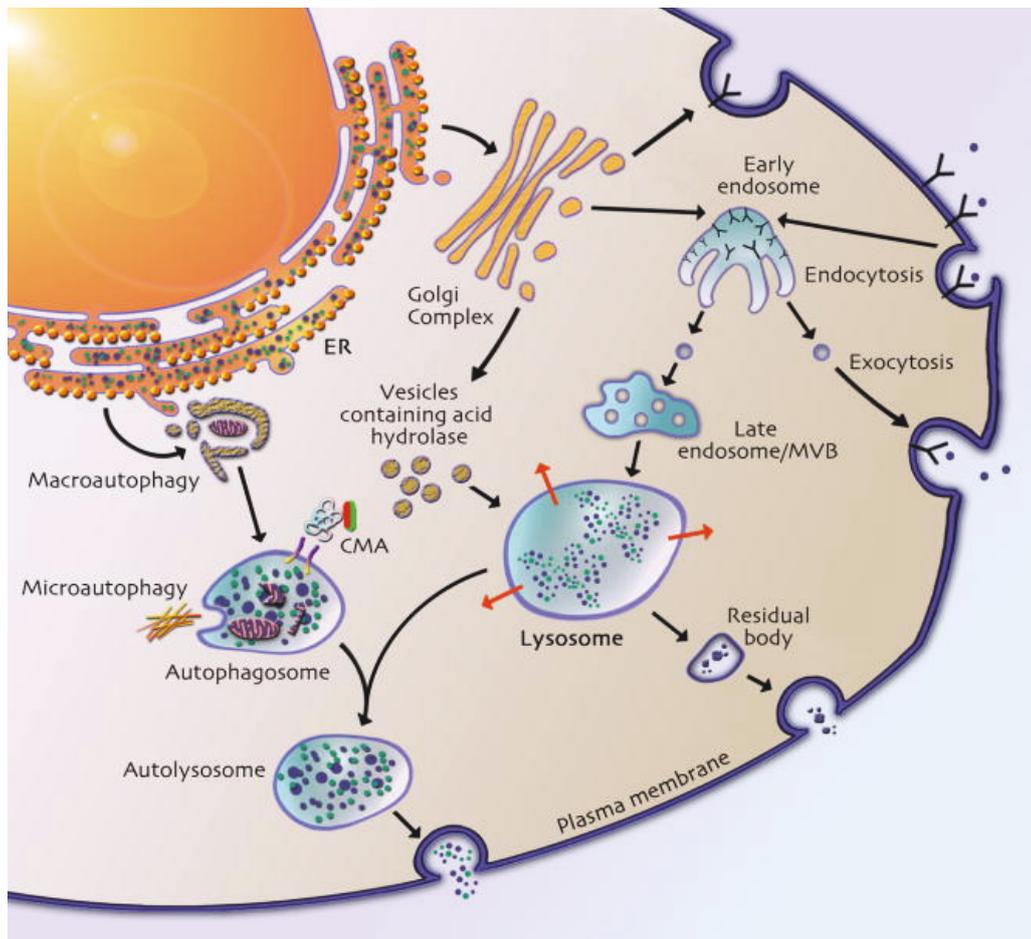


Figure 22. La fonction de dégradation des lysosomes

Les substrats extracellulaires ou associés à la membrane sont internalisés dans des endosomes dit précoces (« early endosome ») puis vont être conduits aux endosomes dits tardifs (« late endosome ») ou corps multivésiculaires (« multivesicular bodies » MVB) qui vont fusionner avec les lysosomes pour dégrader leur contenu. Les substrats intracellulaires sont transportés vers les lysosomes par la voie de l'autophagie (microautophagie, autophagie médiée par les chaperones (CMA) ou macroautophagie) (d'après Schultz et al., 2011).

IV. 1. 3. La régulation des lysosomes

Le principal facteur impliqué dans la régulation du nombre de lysosomes et de leur fonction est un facteur de transcription appelé « Transcription Factor EB » (TFEB) (Sardiello et al., 2009). Ce dernier modifie l'expression de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la clairance cellulaire (Shen and Mizushima, 2014). Il régule notamment la fonction lysosomale en activant la biogénèse des lysosomes et en contrôlant le niveau des enzymes lysosomales et l'acidification des lysosomes (Palmieri et al., 2011; Sardiello et al., 2009). De plus, il régule l'autophagie en augmentant le nombre d'autophagosomes et la fusion entre les lysosomes et les autophagosomes pour stimuler la dégradation (Fig. 23) (Palmieri et al., 2011; Settembre et al., 2011).

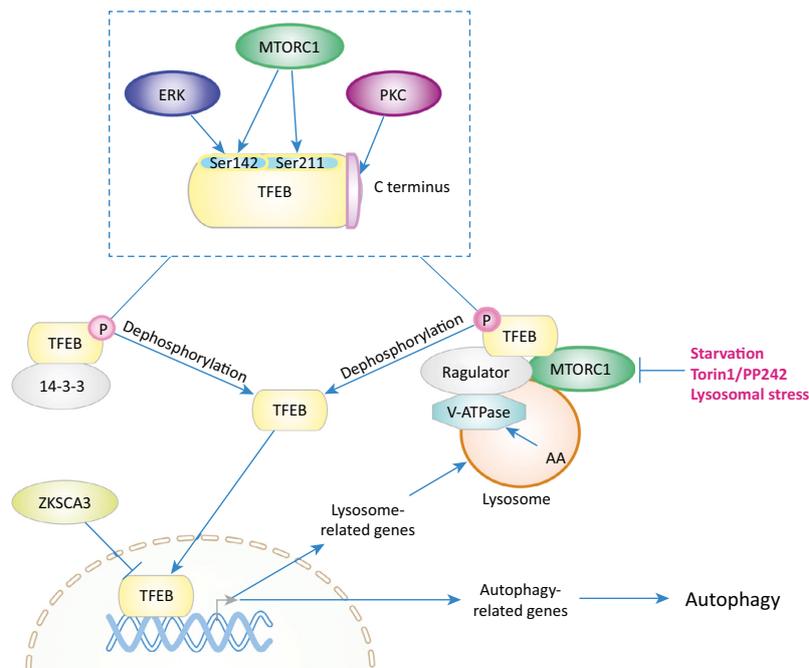


Figure 23. La régulation des lysosomes par TFEB

En condition basale, le facteur de transcription TFEB phosphorylé est retenu dans le cytosol par la kinase mTORC1 à la surface des lysosomes ou par liaison à des protéines 14-3-3 dans le cytosol. En condition de stress ou de manque de nutriments, mTORC1 est inhibée ce qui entraîne la déphosphorylation de TFEB qui peut alors activer des gènes en relation avec les lysosomes (biogénèse des lysosomes, enzymes lysosomales, acidification) et l'autophagie pour augmenter la capacité de dégradation (d'après Shen and Mizushima, 2014).

L'activité de TFEB dépend de sa phosphorylation (Settembre et al., 2012). En condition basale, TFEB est retenu dans le cytosol et sur la surface des lysosomes après une

phosphorylation par la kinase mTORC1 et une liaison à des isoformes de la famille des protéines 14-3-3. En condition de stress, de manque de nutriments ou de dysfonctionnement des lysosomes, mTORC1 est inhibée ce qui entraîne la déphosphorylation de TFEB et sa translocation dans le noyau où il peut activer ses gènes cibles (Fig. 23). Le lysosome régule ainsi sa propre biogénèse par le biais de TFEB (Martina et al., 2012; Rocznik-Ferguson et al., 2012; Zhou et al., 2013).

IV. 2. Rôle du système endo-lysosomal dans la dégradation de l'APP et la production d'A β

Le système endo-lysosomal est impliqué dans la dégradation de la protéine précurseur de l'Amyloïde (« Amyloid Precursor Protein » ou APP) et dans la production d'A β (Peric and Annaert, 2015; Rajendran and Annaert, 2012; Whyte et al., 2017).

L'APP est synthétisée dans le réticulum endoplasmique et transportée vers la surface de la cellule par la voie de sécrétion. Des modifications post-traductionnelles se produisent pendant son transport à travers l'appareil de Golgi puis l'APP produit arrive à la surface de la cellule (Wang et al., 2017). Une fois au niveau de la membrane plasmique, l'APP peut suivre deux voies :

- D'une part, l'APP peut être clivée par l' α -sécrétase, libérant ainsi le sAPP α et le C83 (Fig. 24) (Wang et al., 2017). Ce clivage correspond à la voie non-amyloïdogénique (Esch et al., 1990; Haass et al., 2012; Sisodia, 1992).
- D'autre part, l'APP peut être internalisée dans la cellule dans des endosomes dits précoces (Fig. 24). L'internalisation de l'APP serait médiée par un motif spécifique présent au niveau de son domaine cytosolique (Wang et al., 2017) et nécessiterait son regroupement dans des domaines rafts au niveau de la membrane, via le cholestérol (Cossec et al., 2010; Marquer et al., 2011; Rajendran and Annaert, 2012)

Une fois endocytosée, différentes voies peuvent être empruntées par l'APP :

- L'APP peut être reconduite directement vers l'appareil de Golgi via les retromères (Fig. 24) (Andersen et al., 2005; Whyte et al., 2017).
- L'APP peut subir un clivage séquentiel par les β - et γ -sécrétases dans le système endo-lysosomal, responsable de la production d'A β dans la voie amyloïdogénique (Fig. 24) (Koo et al., 1996; Soriano et al., 1999). L'action des sécrétases est favorisée par le pH acide dans les vésicules du système endo-lysosomal, bien que la localisation subcellulaire précise du clivage de l'APP ne soit pas encore bien définie (Koo and Squazzo, 1994; Wang et al., 2017; Yamazaki et al., 1996).

La β -sécrétase (« Beta-Site APP Cleaving Enzyme 1 » ou BACE1) possède une activité maximale à pH acide (Vassar et al., 1999) et est localisée dans les endosomes, les lysosomes, le transgolgi et la membrane plasmique (Rajendran and Annaert, 2012; Wang et al., 2017). Elle entraîne la production de sAPP β et du fragment β -CTF (« C-Terminal Fragment »). Ce dernier peut alors être clivé par le complexe γ -sécrétase (contenant la préséniline 1 ou 2 (PS1 ou PS2)), entraînant la production de l'AICD et de l'A β . Le complexe γ -sécrétase est localisé à la surface de la cellule, dans les endosomes précoces à tardifs et dans les lysosomes (Rajendran and Annaert, 2012).

L'A β produit est alors conduit dans les corps multivésiculaires, qui peuvent fusionner avec la membrane plasmique et libérer leurs vésicules en tant qu'exosomes dans le milieu extracellulaire (Fig. 24) (Rajendran et al., 2006). Les corps multivésiculaires sont considérés comme des endosomes tardifs, formés à partir d'une invagination de la membrane et de bourgeons des endosomes précoces qui constituent les vésicules internes des corps multivésiculaires. Ils sont impliqués dans le trafic de récepteurs membranaires et leur dégradation dans les vésicules internes acides et dans les lysosomes (Gruenberg and Stenmark, 2004; Takahashi et al., 2017). Edgar et al. a observé que l'APP localisé dans les corps multivésiculaires pouvait être conduit aux lysosomes pour dégradation (Edgar et al., 2015).

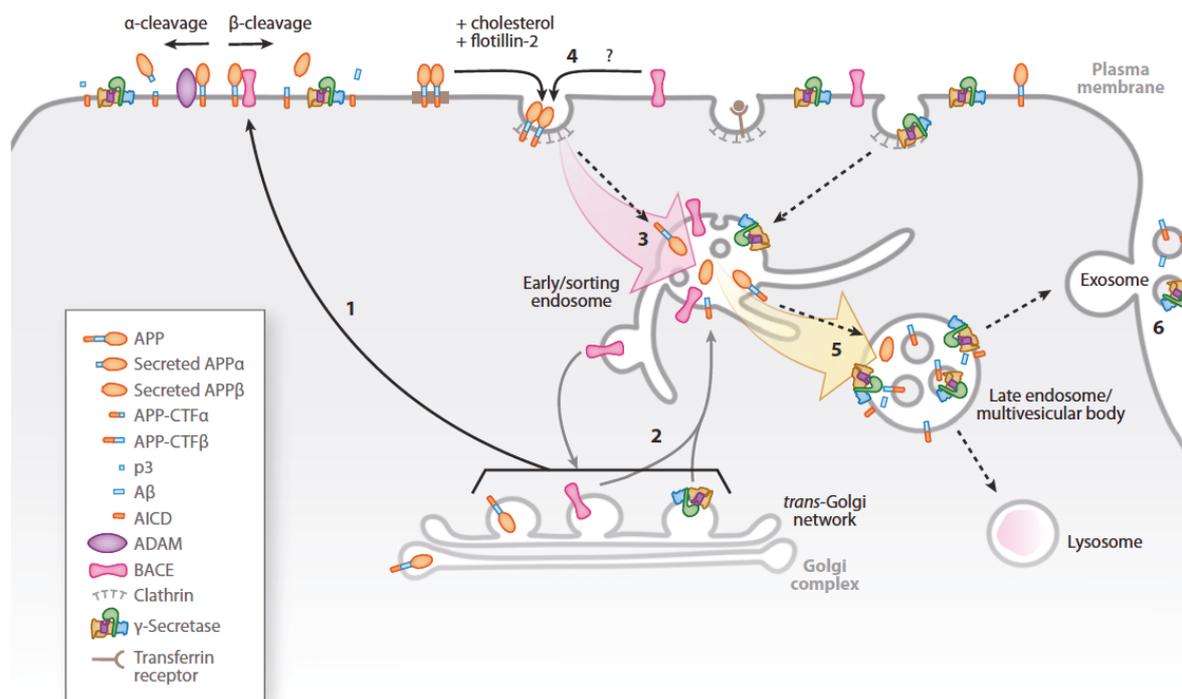


Figure 24. Le système endo-lysosomal dans la dégradation de l'APP et la production d'Aβ

Au niveau de la surface de la cellule, l'APP peut être clivé par l' α -sécrétase dans la voie non-amyloïdogénique ou internalisé dans des endosomes précoces. Une fois internalisé, l'APP peut être reconduite vers l'appareil de Golgi ou subir un clivage séquentiel par les β - et γ -sécrétases dans le système endo-lysosomal. La localisation subcellulaire précise du clivage n'est pas bien définie. L'A β produit est conduit dans les corps multivesiculaires qui peuvent fusionner avec la membrane plasmique pour libérer des exosomes ou fusionner avec des lysosomes pour dégrader leur contenu (d'après de De Strooper and Annaert, 2010).

- Une grande partie de l'APP peut être conduite directement vers les lysosomes pour être dégradée (Caporaso et al., 1992, 1994; Golde et al., 1992; Haass et al., 1992). L'APP et des produits de sa protéolyse sont en effet observés dans les lysosomes (Haass et al., 1992). De plus, l'inhibition de l'acidification des lysosomes induit une augmentation de l'APP (Caporaso et al., 1992; Golde et al., 1992) et son accumulation dans les lysosomes (Caporaso et al., 1994). Des expériences de fractionnement subcellulaire ont montré que l'APP pouvait être localisée dans la membrane des lysosomes, associée à la présence de γ -sécrétase (Pasternak et al., 2003). La localisation subcellulaire des présénilines du complexe γ -sécrétase pourrait déterminer les sites de production d'A β intracellulaire (Sannerud et al., 2016). Contrairement à la

préséniline 1 qui est plus largement distribuée dans la cellule et la membrane plasmique, un motif dans la préséniline 2 permet de la diriger vers les endosomes tardifs et les lysosomes par une interaction sélective avec le complexe adaptateur AP-1 (Sannerud et al., 2016). La localisation restreinte de la préséniline 2 dans les endosomes tardifs et les lysosomes permet alors un clivage des substrats localisés dans ces organelles et la génération d'un pool important d'A β intracellulaire (Fig. 25) (Sannerud et al., 2016).

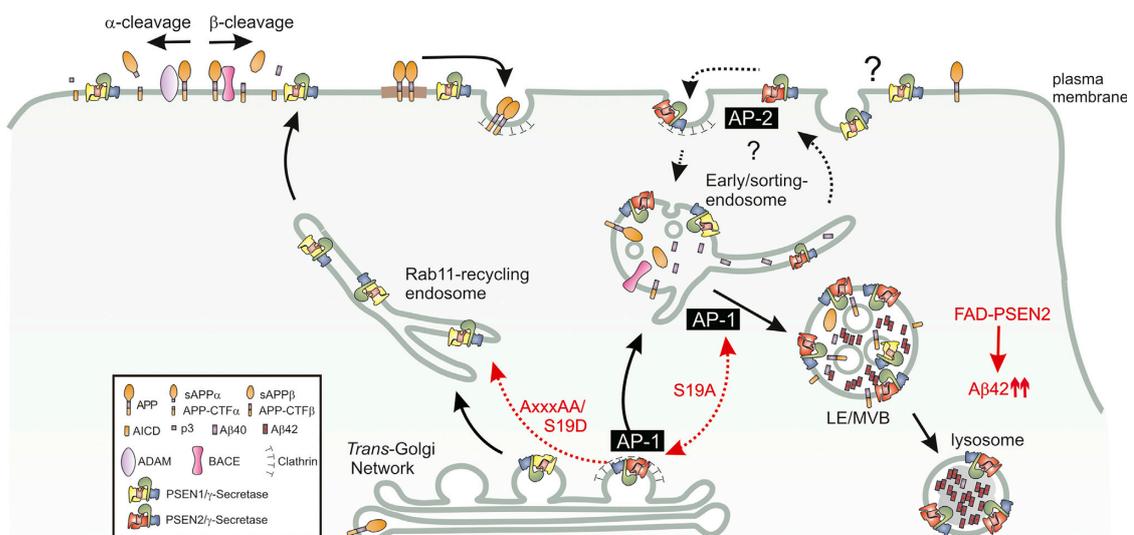


Figure 25. La localisation subcellulaire des présénilines pourrait déterminer les sites de production d'A β intracellulaire

Contrairement à la préséniline 1 qui est localisée essentiellement au niveau de la membrane plasmique, la préséniline 2 semblerait avoir une localisation restreinte aux endosomes tardifs et aux lysosomes. Ceci permettrait un clivage important des substrats présents dans ces organelles, comme l'APP ou des fragments de l'APP, et ainsi serait à l'origine d'une production importante d'A β intracellulaire (d'après Sannerud et al., 2016).

IV. 3. Les altérations du système lysosomal dans la Maladie d'Alzheimer

Le système endo-lysosomal joue un rôle essentiel dans la dégradation de l'APP et dans la production de l'A β (Fig. 26A). Différentes altérations de ce système ont été observées dans la Maladie d'Alzheimer.

Tout d'abord, des altérations du système endosomal ont été rapportées par l'observation d'endosomes anormalement élargis dans des neurones pyramidaux de cerveaux de patients atteints de Maladie d'Alzheimer sporadique, avant l'apparition des plaques (Cataldo et al., 1997, 2000). Ils sont visibles dans les stades précoces de la maladie et associés à la présence de cathepsine B et D dans leur lumière. Ces endosomes élargis contiennent des accumulations de peptide A β (Fig. 26B) (Cataldo et al., 2004). Des accumulations de peptide A β intracellulaire peuvent également être observées (Gouras et al., 2000), dans les corps multivésiculaires après un immunomarquage en microscopie électronique (Fig. 26C) (Takahashi et al., 2002). Bancher et al. ont même observé après un immunomarquage en microscopie électronique une accumulation de l'APP et de l'A β dans des granules de lipofuscine, correspondant à des dérivés des lysosomes (Fig. 26D) (Bancher et al., 1989). Les accumulations de peptide A β dans ces organelles pourraient indiquer une altération du système lysosomal.

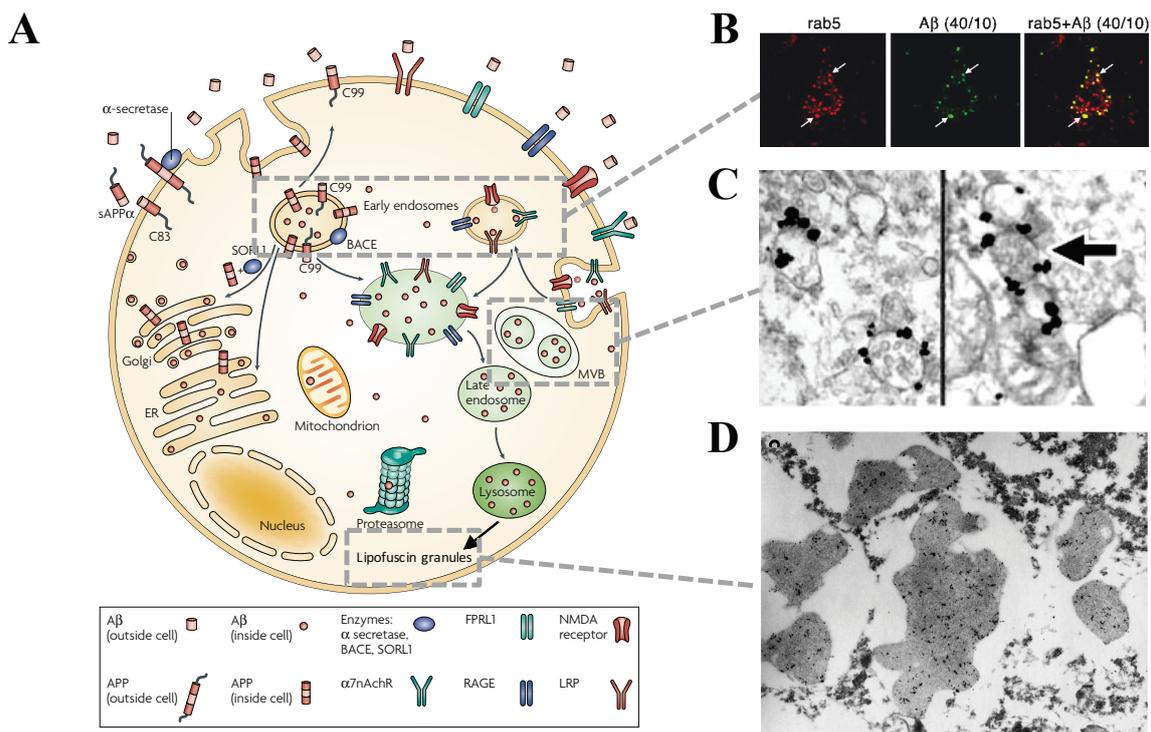


Figure 26. Sites d'accumulation intracellulaire d'A β dans la Maladie d'Alzheimer

A. Schéma représentant les sites de production et d'accumulation d'A β intracellulaire (adapté de LaFerla et al., 2007). B. Colocalisation de l'immunomarquage A β avec un marqueur des endosomes précoces (rab 5) montre une accumulation d'A β dans les endosomes précoces de patients atteints de MA (d'après Cataldo et al., 2004). C, D. Immunocytochimie dirigée contre le peptide A β en microscopie électronique montrant une accumulation d'A β dans les corps multivésiculaires (C) et les granules de lipofuscine (des dérivés des lysosomes, D) dans des tissus de patients atteints de MA (d'après Bancher et al., 1989; Takahashi et al., 2002).

Des altérations du système lysosomal ont également été mises en évidence dans la Maladie d'Alzheimer par l'observations d'altérations des hydrolases lysosomales. En effet, des augmentations de l'activité de certaines hydrolases (glycohydrolase, β -galactosidase, ...) et des niveaux de cathepsine D et β -hexosaminidase sont observées respectivement dans des fibroblastes (Emiliani et al., 2003; Pitto et al., 2005) et des neurones de patients (Cataldo et al., 1996). A l'inverse, d'autres études ont plutôt observé une diminution de certaines enzymes lysosomales comme la cathepsine D dans des fibroblastes de patients (Urbanelli et al., 2008) et la glucocerebrosidase dans des tissus hippocampiques de patients (Choi et al., 2015). Enfin, des hydrolases lysosomales sont également retrouvées extracellulairement, colocalisant avec les plaques amyloïdes (Cataldo and Nixon, 1990; Cataldo et al., 1996). Il semble que dans tous les cas certaines enzymes lysosomales soient dérégulées dans la Maladie d'Alzheimer, ce qui pourrait altérer le système lysosomal.

Les altérations de certaines enzymes (beta-hexosaminidase, beta galactosidase, beta galactosylcerebrosidase, cathepsine B et S) sont également observées dans des échantillons de sang périphérique de patient, où leur concentration est modifiée en fonction du stade de la maladie (Morena et al., 2017). La combinaison des différents niveaux d'enzymes permet de discriminer le stade pathologique du patient. Les enzymes lysosomales ne sont pas les seules biomarqueurs étudiés puisqu'une modification des niveaux des protéines lysosomales (Lamp-1, Lamp-2) a également été observé dans le liquide céphalorachidien de patients (Armstrong et al., 2014). Enfin, un polymorphisme du gène de la cystatine, un inhibiteur des protéases comme la cathepsine B, est associé à un risque plus élevé de développer une Maladie d'Alzheimer sporadique (Bertram et al., 2007; Crawford et al., 2000).

En plus du système endo-lysosomal, des atteintes au niveau de l'autophagie ont également été notées dans la Maladie d'Alzheimer. Généralement rares dans les cerveaux de patients sains, des vacuoles d'autophagie apparaissent dans les neurones de l'hippocampe et du néocortex de patients atteints de la Maladie d'Alzheimer (Nixon et al., 2005). L'autophagie semble augmentée dans les cerveaux de patients de façon précoce (Yu et al., 2005).

A noter enfin que des points communs entre la Maladie d'Alzheimer (MA) et certaines pathologies lysosomales, comme la maladie de Niemann-Pick type C, constituent des arguments supplémentaires en faveur d'un rôle des altérations du système lysosomal dans la MA. Les pathologies lysosomales sont le plus souvent caractérisées par des mutations dans les gènes codant les hydrolases lysosomales, entraînant une augmentation du nombre de

lysosomes présentant des contenus non digérés (Platt et al., 2012; Schultz et al., 2011). Elles se caractérisent par des déficits cognitifs et une accumulation neuronale de lysosomes. Comme dans la MA, une accumulation de peptide A β et des pertes de neurones sont également observées dans ces pathologies lysosomales (Jin et al., 2004; Platt et al., 2012), suggérant une implication des altérations des lysosomes dans la Maladie d'Alzheimer.

IV. 4. Implication des altérations du système lysosomal dans les pertes de neurones et de synapses dans des modèles de maladies neurodégénératives

IV. 4. 1. Les altérations du système lysosomal dans des modèles de Maladie d'Alzheimer

Des altérations du système lysosomal sont retrouvées dans plusieurs modèles de Maladie d'Alzheimer, de façon similaire à ce qui peut être observé dans la pathologie humaine, notamment au niveau de certaines hydrolases. La densité d'organelles immunoréactifs pour la cathepsine B ou D est diminuée (Tammineni et al., 2017; Yang et al., 2011) et l'activité de ces protéases est diminuée (Torres et al., 2012) dans différents modèles de souris transgéniques. La diminution de ces hydrolases est responsable d'une altération de la dégradation par les lysosomes, mise en évidence par l'augmentation du récepteur à l'EGF (« Epidermal Growth Factor Receptor »), normalement éliminé par les lysosomes dans des neurones en culture (Tammineni et al., 2017).

De plus, un élargissement des lysosomes immunomarqués pour la cathepsine B, D et L, est observé, associé à une diminution du nombre de lysosomes de taille normale (Yang et al., 2011). Ces lysosomes de taille importante augmentent en nombre et en taille avec l'âge de la souris dans les cellules pyramidales du CA1, et sont absents des souris sauvages contrôles. Des immunomarquages mettent en évidence la présence d'A β et de métabolites de l'APP dans ces lysosomes (Yang et al., 2011).

En outre, une accumulation intracellulaire de peptide A β précédant la formation des plaques est observée dans plusieurs modèles de la Maladie d'Alzheimer, de façon similaire à la pathologie humaine (Casas et al., 2004; Oakley et al., 2006; Oddo et al., 2003; Takahashi et al., 2002; Wirths et al., 2001). En effet, cette accumulation d'A β peut être observée dans les corps multivésiculaires (Langui et al., 2004; Takahashi et al., 2002) et colocalise avec certains marqueurs de lysosomes (Lamp-2) et d'hydrolase (Cathepsine D) (Langui et al., 2004). L'accumulation d'A β est par ailleurs corrélée avec une augmentation du volume des lysosomes (Langui et al., 2004). Oddo et al. ont suggéré que l'A β intracellulaire pourrait constituer une source pour certains dépôts extracellulaires d'A β (Oddo et al., 2006b).

D'autres espèces dérivées de l'APP ont également été identifiées dans le système endo-lysosomal dans différents modèles, induisant une altération de ce système. Notamment, Kaur et al. ont identifié une accumulation intraneuronale d'APP CTF et d'oligomères d'A β dans les lysosomes (Kaur et al., 2017) et Lauritzen et al. ont observé que les accumulations intraneuronales étaient plutôt constituées de fragment C99 (Lauritzen et al., 2016). Ces accumulations de C99 dans des structures élargies immunomarquées avec des anticorps dirigés contre la cathepsine B et Lamp-1 suggèrent un lien entre l'accumulation de C99 et l'altération de la clairance des lysosomes. De fait, une augmentation de C99 peut entraîner un déficit de fonction lysosomale (Lauritzen et al., 2016). Ces auteurs ont donc proposé que l'accumulation d'espèces dérivées de l'APP comme le C99 pourrait être à la fois la cause et l'effet d'une fonction altérée du système lysosomal-autophagique.

Enfin, de façon similaire aux pathologies lysosomales humaines, une souris modèle de la maladie de Niemann-Pick présente une augmentation de l'APP, des fragments CTF et de l'A β (Kodam et al., 2010). Ce modèle de pathologie lysosomale présente donc des similitudes avec les modèles classiques de Maladie d'Alzheimer, suggérant un rôle de l'altération des lysosomes dans la pathogénicité de la Maladie d'Alzheimer.

IV. 4. 2. Implication des altérations du système lysosomal dans la pathogénicité de modèles de la Maladie d'Alzheimer

Nous avons vu précédemment que le lysosome était impliqué dans la dégradation de l'APP. Le rôle d'altérations des lysosomes dans la pathogénicité de la Maladie d'Alzheimer a été étudié par le développement de différentes stratégies visant à augmenter la fonction lysosomale dans des modèles de Maladie d'Alzheimer.

L'une des principales stratégies est la modulation de l'activité de la cathepsine B. L'injection d'un lentivirus exprimant la cathepsine B dans une souris transgénique âgée surexprimant l'APP humain avec des mutations familiales (hAPP) permet de réduire l'A β et les dépôts amyloïdes (Mueller-Steiner et al., 2006). De même, l'application d'un lentivirus exprimant la cathepsine B dans des neuroblastomes surexprimant une mutation de l'APP induit une dégradation de C99 par la cathepsine B (Lauritzen et al., 2016). Des effets similaires ont été observés suite à l'injection d'un AAV exprimant la cathepsine B dans l'hippocampe de souris transgéniques APP/PS1, avec une réduction de la charge en A β dans l'hippocampe et des niveaux d'A β intra et extracellulaire (Embury et al., 2017). Dans ce modèle, la surexpression de cathepsine B permet également d'améliorer l'apprentissage et la mémoire dans une tâche mnésique.

Une autre stratégie visant à augmenter l'activité des cathepsines est de supprimer le gène de la cystatine C, un inhibiteur de cathepsines. Dans un modèle de souris transgénique (hAPP), cela induit une diminution de l'A β soluble et des plaques (Sun et al., 2008). La suppression de ce gène permet de prévenir les déficits de plasticité synaptique dans certaines régions de l'hippocampe ainsi que les déficits cognitifs et les altérations du comportement. De façon similaire dans un autre modèle de souris, la suppression du gène de la cystatine B permet de prévenir l'élargissement des autolysosomes (Yang et al., 2011). De plus, l'A β et les plaques sont réduits et l'apprentissage et la mémoire sont maintenus.

A l'inverse, l'inactivation génétique de la cathepsine B entraîne une augmentation de l'A β et des plaques (Mueller-Steiner et al., 2006). La cathepsine B permettrait ainsi de cliver l'A β et générer des espèces moins amyloïdogéniques. L'activité de la cathepsine B est stimulée par de fort taux d'A β dans les âges précoces mais pas dans les âges plus avancés d'un modèle de

souris transgénique. Les auteurs suggèrent que la sur-activation de la cathepsine B pourrait représenter un mécanisme protecteur s'altérant avec l'âge (Mueller-Steiner et al., 2006).

Une autre méthode pour augmenter la fonction lysosomale a été d'augmenter l'expression du facteur de transcription TFEB. L'injection stéréotaxique d'un AAV exprimant TFEB dans l'hippocampe de souris transgéniques induit une augmentation de la biogénèse des lysosomes (Xiao et al., 2015). Une diminution de l'APP, de l' α - et du β -CTF, de l'A β et de la charge en plaques est observée dans l'hippocampe injecté. Ces données suggèrent que la correction des troubles des lysosomes par le TFEB stimule le flux endosome-lysosome pour augmenter la dégradation de l'APP et réduire la production d'A β et de plaques (Xiao et al., 2015).

L'administration de rapamycine, un inhibiteur de mTORC1, pourrait moduler la fonction lysosomale puisque mTORC1 inhibe le facteur de transcription TFEB (Martina et al., 2012; Roczniak-Ferguson et al., 2012; Zhou et al., 2013). L'administration de rapamycine à long terme induit une augmentation de l'autophagie, diminue les niveaux d'A β 42 et prévient les déficits cognitifs dans un modèle transgénique (Spilman et al., 2010). L'autophagie induite par TFEB pourrait jouer un rôle puisque la suppression génétique de Beclin 1 dans des souris transgéniques altère l'autophagie, augmente de façon importante les niveaux d'A β et accélère sa déposition (Pickford et al., 2008). En définitive, la modulation de la voie lysosomale par différentes stratégies (modulation de la cathepsine B ou du TFEB) est responsable d'une diminution de l'accumulation d'A β et des plaques, suggérant un rôle des altérations de la fonction lysosomale dans la pathogénicité de la Maladie d'Alzheimer.

A noter que certaines mutations dans les présénilines associées à la Maladie d'Alzheimer peuvent également contribuer à la progression de la pathologie en induisant des altérations du système lysosomal. En effet, des mutations dans la préséniline 1 sont responsables d'une altération de la maturation et de l'assemblage du complexe v-ATPase impliqué dans l'acidification des lysosomes (Lee et al., 2010, 2015) ou d'une altération du stockage et de la libération de calcium impliqué dans la capacité de fusion des lysosomes (Coen et al., 2012).

IV. 4. 3. Implication des altérations du système lysosomal dans les pertes de neurones et de synapses dans des modèles de maladies neurodégénératives

Différents arguments permettent d'associer les altérations du système lysosomal avec des pertes de neurones. En effet, nous avons vu précédemment que plusieurs modèles de souris pouvaient présenter des accumulations intracellulaires d'A β . Ces modèles peuvent en outre développer des pertes de neurones caractéristiques, généralement absentes des autres modèles sans accumulation d'A β intracellulaire (Casas et al., 2004; Oakley et al., 2006). Christensen et al. suggèrent que l'accumulation d'A β intracellulaire est davantage associée aux pertes de neurones que son accumulation en dépôt extracellulaire (Christensen et al., 2008). En effet, l'apparition d'une perte de neurones coïncide avec la diminution d'immunoréactivité intraneuronale d'A β , suggérant que ce sont les neurones présentant une accumulation intracellulaire d'A β qui sont perdus. De plus, aucune perte de neurones n'est observée dans des régions qui accumulent uniquement les plaques (Christensen et al., 2008). Or, il semblerait que le peptide A β s'accumule dans les corps multivésiculaires (Takahashi et al., 2002) et colocalise avec des marqueurs des lysosomes (Langui et al., 2004). De plus, une accumulation d'APP CTF et d'oligomères d'A β dans les lysosomes est observée dans un autre modèle de souris transgénique (Kaur et al., 2017). Celui-ci développe une perte de neurones cholinergiques dans le noyau septal médian présentant des lysosomes de taille augmentée (Kaur et al., 2017). Ces observations suggèrent une association entre une altération de la fonction lysosomale, associée à une accumulation intracellulaire d'A β ou d'espèces dérivées de l'APP dans le système lysosomal, et une perte de neurones.

L'implication des altérations du système lysosomal dans les pertes de neurones et de synapses a été étudiée par la modulation des fonctions lysosomales dans des modèles de pathologies présentant ces pertes.

Dans des cultures primaires de neurones hippocampiques, l'application d'un lentivirus surexprimant une enzyme lysosomale (glucocérébrosidase) permet de réduire la perte de neurones induites par les oligomères d'A β (Choi et al., 2015).

Une perte importante de neurones est observée dans une souris transgénique modèle de tauopathie (Polito et al., 2014). La modulation de la fonction lysosomale par l'injection

intraventriculaire d'un AAV exprimant le TFEB induit une réduction de la phosphorylation de Tau, des dégénérescences neurofibrillaires et des déficits de comportement et de plasticité synaptique. Le TFEB est responsable à la fois d'une activation de la voie lysosomale, mise en évidence par l'augmentation de l'immunomarquage dirigé contre la protéine Lamp-1, et de l'autophagie. La surexpression de TFEB permet d'augmenter la survie neuronale dans ce modèle (Polito et al., 2014).

En outre, le TFEB peut être activé par le tréhalose, un disaccharide qui diminue l'activité de la kinase Akt impliquée dans la phosphorylation de TFEB et dans l'inhibition de sa translocation nucléaire de façon indépendante de mTORC1 (Palmieri et al., 2017). Utilisé dans une souris modèle de la maladie de Batten, une maladie neurodégénérative de la famille des pathologies de stockage du lysosome, ce sucre permet d'augmenter la clairance d'agrégats protéolipidiques, de réduire la neuropathologie et de prolonger la survie des souris (Palmieri et al., 2017). L'administration de tréhalose dans un modèle de tauopathie permet de prévenir la perte de neurones (Schaeffer et al., 2012).

Enfin, une hyperphosphorylation de tau est spécifiquement induite dans la couche II du cortex entorhinal latéral d'une souris suite à l'injection dans cette région d'un AAV exprimant la protéine tau humaine mutée (Siman et al., 2015). Ce modèle présente une perte de neurones dans la couche II du cortex entorhinal latéral associée à une perte de leurs synapses dans la couche moléculaire externe du gyrus denté. L'administration chronique de rapamycine, qui inhibe l'activité de mTOR et stimule l'autophagie, permet de protéger ce modèle de la perte de neurones et de synapses induites par tau (Siman et al., 2015). A noter qu'en plus d'une induction de l'autophagie, la rapamycine active le facteur de transcription TFEB, bien que cet effet soit discuté (Thoreen and Sabatini, 2009; Thoreen et al., 2009).

En définitive, des altérations du système lysosomal ont été observées dans la Maladie d'Alzheimer et dans certains modèles. Ces altérations peuvent participer à la pathogénicité de la maladie puisque des modulations de cette voie permettent de réduire la production d'A β et de plaques. Ces modulations préviennent également la perte de neurones et de synapses observée dans certains modèles de tauopathie. Nous avons donc commencé une étude des altérations lysosomales dans un modèle murin de Maladie d'Alzheimer et dans des biopsies issues de patients (deuxième partie des résultats).

RESULTATS

RESULTATS

Au cours de la Maladie d'Alzheimer, une perte de synapses se développe, qui précède la perte de neurones. La perte de synapses est le marqueur qui corrèle le plus avec les pertes de mémoire dans la pathologie. Les principaux traitements actuels ne sont que symptomatiques et ne ciblent pas les causes de la maladie. L'identification du mécanisme responsable des pertes de synapses et de neurones est donc indispensable au développement de traitements efficaces.

L'objectif de cette thèse est d'identifier le mécanisme responsable des pertes de synapses et de neurones dans un modèle murin de Maladie d'Alzheimer. Le développement de souris transgéniques présentant des mutations dans les gènes de l'APP et de la PS1, responsables de formes familiales de la Maladie d'Alzheimer, ont permis de mimer certains aspects de la pathologie. Les souris APPxPS1-KI portent des mutations dans le gène de l'APP et des mutations knock-in dans le gène de la PS1 (Casas et al., 2004). Ces souris présentent une production d'A β importante et accélérée, avec un développement très précoce d'accumulations intracellulaires et de plaques extracellulaires de peptide A β . Les souris APPxPS1-KI présentent la particularité de développer des pertes de neurones à 6 mois et constituent donc un bon modèle d'étude de la neurodégénérescence (Casas et al., 2004).

Dans le but d'identifier le mécanisme responsable des altérations observées dans les souris APPxPS1-KI, nous avons réalisé des études qui allient l'utilisation de plusieurs techniques (microscopie électronique (immunocytochimie, morphologie et reconstruction 3D), injections stéréotaxiques de lentivirus, électrophysiologie, immunohistochimies, simulations mathématiques). Les souris PS1-KI, ne développant pas d'accumulation d'A β , de perte de neurones ou de défaut de comportement et de mémoire ont été utilisées comme souris contrôles. Afin d'identifier des altérations spécifiques qui pourraient être responsable de ces pertes, nous avons aussi comparé les souris APPxPS1-KI aux souris transgéniques APP qui ne présentent pas de pertes de neurones ou de synapses. De plus, l'utilisation de biopsies de patients atteints de Maladie d'Alzheimer, dont la morphologie des neurones est bien conservée, a permis d'étudier la pertinence chez les patients des altérations retrouvées dans les modèles murins.

La première partie des résultats est présentée sous la forme d'un article en anglais qui sera soumis après la soutenance de la thèse. Elle a eu pour objectif dans un premier temps d'identifier les altérations présentes dans les souris APPxPS1-KI, puis dans un second temps d'étudier le mécanisme qui pourrait être responsable de ces altérations. Tout d'abord, nous avons pu observer qu'une perte de synapses à 4 mois dans la stratum radiatum du champ CA1 de l'hippocampe précède la perte de neurones à 6 mois dans la couche pyramidale du champ CA1 de l'hippocampe dans les souris APPxPS1-KI. Cette perte de synapses s'accompagne d'une augmentation de la longueur des densités post-synaptiques, de façon similaire à ce qui est observée dans la pathologie humaine. Ces pertes ne sont pas observées dans les souris transgéniques APP.

Au cours de cette première partie, nous avons testé l'implication de plusieurs mécanismes décrits dans la littérature comme étant responsables de la perte de neurones et de synapses dans des modèles de maladies neurodégénératives.

Une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α est observée dans les souris APPxPS1-KI, synonyme d'un stress du réticulum endoplasmique (RE) (Page et al., 2006). Le stress du RE est impliqué dans le processus neurodégénératif observé dans un modèle murin de maladie à prions (Moreno et al., 2012, 2013). En effet, la diminution de la phosphorylation d'eIF2 α par l'injection d'un lentivirus exprimant la phosphatase spécifique d'eIF2 α prévient les pertes de neurones et de synapses dans ce modèle. En utilisant la même stratégie dans les souris APPxPS1-KI, la diminution de la phosphorylation d'eIF2 α ne suffit pas à prévenir la perte de neurones et de synapses.

Beaucoup d'études ont montré que l'A β pouvait perturber le fonctionnement synaptique en induisant une dépression de la transmission synaptique basale et une augmentation de la dépression à long terme (DLT), responsables d'une perte de synapse (Hsieh et al., 2006; Shankar et al., 2007). Il était proposé que ces effets se produisent par une modulation de la transmission NMDA. Au contraire, dans les souris APPxPS1-KI, aucune altération de la transmission synaptique de base, y compris NMDA, ni de la DLT n'est observée. En revanche, une diminution de la potentialisation à long terme (PLT) est observée, avant la perte de synapses et de neurones, et associée à un déficit de la mémoire spatiale dans un test de localisation d'objet.

Des reconstructions 3D en microscopie électronique ont montré que l'altération de la PLT s'accompagne d'une modification de la forme des épines dendritiques. En effet, une augmentation de la proportion d'épines sans tête est observée. Les épines présentent une diminution de leur longueur associée à une augmentation de la largeur de leur cou. Nous avons vérifié la pertinence de ces altérations de forme des épines dans des biopsies de patients dans lesquelles une corrélation inverse est observée entre la largeur du cou des épines et le nombre de synapses.

Une telle altération de la morphologie des épines modifie la compartimentalisation électrique de l'épine. Des simulations mathématiques ont permis de mesurer l'effet de la modification de la forme des épines sur les potentiels post-synaptiques excitateurs. Il semblerait que les potentiels soient modifiés uniquement pour des épines possédant initialement une résistance électrique du cou importante. Or, seulement une faible proportion d'épines possède une résistance du cou suffisamment importante pour être touchée. En outre, l'altération de la morphologie des épines modifie la compartimentalisation biochimique de l'épine et potentiellement la diffusion de molécules impliquées dans la cascade de signalisation sous-tendant le processus de PLT. Les modifications de la forme des épines pourraient donc être responsables d'une altération de la PLT. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour comprendre comment l'A β peut altérer la morphologie des épines et si cette altération induit une perte de synapses et de neurones.

Des pertes de neurones sont également observées dans d'autres souris modèles de la Maladie d'Alzheimer qui développent des accumulations intracellulaires d'A β , de façon similaire à ce qui est observée dans les souris APPxPS1-KI (Casas et al., 2004; Jawhar et al., 2012; Oakley et al., 2006). Dans ces modèles murins, la perte de neurones ne corrèle pas avec les dépôts extracellulaires d'A β (Schmitz et al., 2004) mais est associée à l'accumulation d'A β intracellulaire (Christensen et al., 2008). Afin de tester l'implication de l'accumulation intracellulaire d'A β dans les pertes de neurones et de synapses dans les souris APPxPS1-KI, des stratégies visant à son élimination doivent être développées. L'identification du site d'accumulation d'A β à l'intérieur des neurones des souris APPxPS1-KI est primordiale au développement de telles stratégies et constitue l'objectif de la deuxième partie des résultats de cette thèse. Par des observations croisées en microscopie électronique, nous avons pu observer que l'A β s'accumule sous forme de fibrilles dans les lysosomes qui sont élargis, de façon spécifique dans les souris APPxPS1-KI. Une accumulation de granules de lipofuscine,

qui correspondent à des dérivés des lysosomes, est également observée dans les neurones des biopsies de patients atteints de Maladie d'Alzheimer, associée à une augmentation de leur surface. De telles observations suggèrent un dysfonctionnement du système lysosomal qui est spécifiquement observé dans les souris APPxPS1-KI et absent des souris transgéniques APP qui ne développent pas de pertes de synapses et de neurones. Des études plus poussées sont nécessaires pour déterminer si les modifications des lysosomes sont responsables des pertes de synapses et de neurones.

I. Altérations précoces des épines dendritiques chez les souris APPxPS1-KI

Early dendritic spine alterations in the APPxPS1-KI mouse model of Alzheimer's Disease

Alexandre Androuin^{1,7}, Brigitte Potier^{2,7}, U Valentin Nägerl³, Daniel Cattaert⁴, Lydia Danglot², Manon Thierry¹, Ihsen Youssef¹, Antoine Triller⁵, Marie-Claude Potier¹, Charles Duyckaerts¹, Khalid Hamid El Hachimi^{1,6}, Patrick Dutar², Benoît Delatour^{1,8}, Serge Marty^{1,8,9}

¹Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, INSERM U1127, CNRS UMR7225, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

²Centre de Psychiatrie et Neurosciences, INSERM UMR 894, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

³Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, CNRS UMR 5297, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.

⁴Centre de Neurosciences Intégratives et Cognitives, CNRS UMR 5228, Bordeaux, France

⁵École Normale Supérieure, Institut de Biologie de l'ENS, INSERM, CNRS, PSL Research University, Paris, France

⁶Laboratoire de Neurogénétique, EPHE, PSL Research University, Paris, France

⁷Co-first authors

⁸Co-last authors

⁹Correspondance: serge.marty@icm-institute.org, telephone: 33 1 57 27 45 25.

Abstract

Alzheimer's Disease (AD) is characterized by a progressive loss of synapses and neurons. How the Amyloid Protein Precursor (APP) cleavage product Amyloid β ($A\beta$) can trigger synapse and neuron loss remains debated. We investigated this mechanism in APP x presenilin 1 knock-in mice that were previously shown to present with a loss of pyramidal neurons in the CA1 hippocampus. We observed that the reduction in the density of neurons in the stratum pyramidale was preceded by a reduction in the density of synapses in the stratum radiatum of CA1, which was accompanied by an enlargement of the remaining postsynaptic structures like the postsynaptic densities (PSDs). There was an increased phosphorylation of the elongation initiation factor eIF2 α in CA1 pyramidal neurons, but decreasing its phosphorylation did not prevent synapse and neuron losses. Moreover, there was no synaptic depression nor increase of LTD, but a deficit of LTP that preceded the loss of synapses and neurons. Serial sectioning electron microscopy indicated that there was also an early reduction of spine length and an enlargement of spine necks. An inverse correlation between the width of spine necks and the number of synapses was observed in cortical biopsies from AD and non-AD patients. In mice, mathematical modeling indicated that the widening of spine necks alters electrical and biochemical compartmentalization of the spines. Further experiments are needed to understand how $A\beta$ could alter spine morphology, and determine whether this shortening leads to the loss of synapses and neurons.

Introduction

Alzheimer's Disease (AD) is the most frequent neurodegenerative disorder. Neuronal loss occurs in specific cortical areas and subcortical nuclei (Duyckaerts et al., 2009). For instance, a massive loss of neurons is observed in the CA1 subfield of the hippocampus (West et al., 1994). Neuronal loss in CA1 increases progressively with the duration of disease (Kril et al., 2002). A substantial loss of synapses has been documented in the CA1 stratum radiatum of patients with mild AD, together with an enlargement of the remaining synapses (Scheff et al., 2007). Loss of synapses in cortical areas correlates with cognitive deficits (DeKosky and Scheff, 1990; Scheff and Price, 2003; Scheff et al., 2007; Terry et al., 1991). Thus, AD was proposed to be primarily a synaptopathy (Selkoe, 2002).

AD is characterized by an accumulation of the Amyloid Protein Precursor (APP) cleavage product Amyloid β ($A\beta$). Duplication of the APP gene, mutations in the APP gene, or mutations in the genes of its cleaving enzymes presenilins (PS) 1 or 2 lead to early-onset familial AD (FAD; reviewed in (Selkoe and Hardy, 2016). In all those cases, there is an increase in the relative level of $A\beta$ or in its aggregation. A mutation in APP that reduces $A\beta$ production/aggregation protects against sporadic AD (Jonsson et al., 2012). Thus, genetic studies point to $A\beta$ peptide as a causal factor in AD. However, the mechanism by which $A\beta$ induces the loss of neuron and synapse remains debated.

To address this question, transgenic mice overexpressing APP with FAD mutations have been generated. These mice display a reduction in the density of spines on dendritic branches (Jacobsen et al., 2006; Lanz et al., 2003; Moolman et al., 2004; Spires et al., 2005). The loss of dendritic spines is preceded by alterations of their morphology. Spines usually have a rather thin neck and a bulbous head, although a small proportion of spines have wider necks and lack a clear head region (Harris et al., 1992). In AD transgenic mice, increased proportion of “headless spines” and shortening of spines have concurrently been reported (Merino-Serrais et al., 2011; Pozueta et al., 2013; Tackenberg and Brandt, 2009; Zou et al., 2015). It is not known if similar alterations of spine shape are present in AD, and what their impact on synapse function might be. However, several mechanisms have been proposed to underlie the loss of synapses and neurons, including depression of synaptic transmission (Hsieh et al., 2006; Shankar et al., 2007) or reduction in protein synthesis mediated by endoplasmic reticulum (ER) stress and phosphorylation of the elongation initiation factor eIF2 α (Gerakis and Hetz, 2017). We evaluated these hypotheses in a transgenic APPxPS1-Ki

mouse model that present with a progressive and massive loss of pyramidal neurons in the CA1 area of the hippocampus (Breyhan et al., 2009; Casas et al., 2004; Faure et al., 2011). APPxPS1-KI mice overexpress a human APP transgene with two FAD mutations. These mice have two additional FAD mutations knocked-in into the endogenous presenilin-1 gene leading to an accelerated A β accumulation (Casas et al., 2004). No loss of neurons is observed in APP transgenic mice with no PS1-KI (Casas et al., 2004). Well conserved biopsies from AD patients also enabled us to study the relevance of the alterations found in transgenic mice to the human pathology.

We found that, contrary to APP transgenic mice, APPxPS1-KI mice displayed a loss of synapses that precedes the neuronal loss. There was an increased eIF2 α phosphorylation observed in CA1 pyramidal neurons, but decreasing it did not prevent the losses. APPxPS1-KI mice displayed an early alteration in a memory task before the loss of synapses and neurons, but there was no synaptic depression nor alteration of LTD. Rather, an alteration of LTP was observed, together with an alteration of spine morphology that was also observed in human biopsies. Thus, an early alteration of the actin cytoskeleton could compromise synaptic plasticity and maintenance.

Methods

Animals

Three different mouse models were used. Single APP transgenic mice express the human APP bearing the Swedish K670N/M671L and London V717I APP mutations under the control of a Thy1 promoter (Blanchard et al., 2003). Presenilin 1 knock-in (PS1-KI) mice have the M233T and L235P mutations knocked-in into the endogenous presenilin-1 gene (Casas et al., 2004). Finally, APP transgenic x PS1-KI (APPxPS1-KI) mice contain both the APP transgene and the PS1-KI mutations described above (Casas et al., 2004). Compared to the single APP transgenic or PS1-KI mice, the APPxPS1-KI line develops an early-onset neuropathological phenotype, including an accelerated formation of intracellular A β inclusions, extracellular amyloid deposits and a specific neuronal loss (Casas et al., 2004). PS1-KI littermates or WT mice (C57Bl/6), which do not develop behavioral-cognitive deficits and in which no loss of hippocampal neurons has been detected, were used as controls as in previous studies (Casas et al., 2004; Faure et al., 2011; Wirths et al., 2008). A total of 81 APPxPS1-KI and PS1-KI mice, aged between three and six months, were used for this study. Behavioral and electrophysiological analyses were performed at the age of three months +/- 1 week. Electron microscopy (EM) studies were carried out in three, four and six months-old mice. A total of six WT and six single APP transgenic mice were used at the age of six months for this study.

The general health of the mice was regularly checked during the course of experimentation. All experiments on animals were conducted in accordance with the ethical standards of French and European laws (European Communities Council Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes). The project was approved by the local ethics Committee (Charles Darwin Committee; projects N° 643.01 and 8761).

Aldehyde fixation and embedding of mice tissue

Mice were analyzed with electron microscopy (EM) either at the age of 3, 4 and 6 months (n=4 animals for each genotype and age conditions) for PS1-KI and APPxPS1-KI mice, or at the age of 6 months for WT and APP transgenic mice (n=3 animals for each genotype).

All mice received an overdose of sodium pentobarbital (120 mg/kg) and were perfused transcardially with PB containing either 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde (EM) or 4% paraformaldehyde (EM and immunohistochemistry). After 1 hour at 4°C, the brain was extracted from the skull and postfixed in the same fixative for 4 h at 4°C. Two hundred μ m

thick sections of the right hemisphere were cut in PBS with a Vibratome. Two frontal sections located in the middle part of the dorsal hippocampus were collected in PBS.

For EM morphological analysis, the sections were transferred into an osmium solution for 1 hour. After several washes, they were stained “en bloc” with an uranyl acetate solution for 1 hour. After several washes, the samples were dehydrated in graded ethanol followed by acetone. They were incubated in progressive concentrated epoxy resin (araldite or epon), before being embedded.

Biopsies from AD and non-AD patients

A series of brain cortical biopsies collected between 1974 and 1986 were used. Biopsies were taken with a sharp n°4 curette from the middle frontal gyrus of the right hemisphere of non-AD patients (n=5 cases; 4 had normal pressure hydrocephalus and 1 had a brain hemorrhage; gender: 4M/1F; age (mean +/-SD): 56+/-11 years), and AD patients (n=3; gender: M; age (mean +/-SD): 60+/-5 years). Amongst the 3 AD patients, one had a familial form of AD (M146L mutation of the presenilin 1 gene; (Sherrington et al., 1995)). The biopsies were immediately fixed in Karnovsky’s solution, postfixed in osmium and embedded in Araldite (el Hachimi and Foncin, 1990; el Hachimi et al., 1991).

Sectioning

For the analysis of synapses and neurons in mice hippocampus, frontal sections were cut using a Leica EM UC6 (Leica, Vienna, Austria). For light microscopy, 0.5 μm -thick semithin sections were collected on glass slides. For EM, 70 nm-thick ultrathin sections were collected on 400 mesh copper grids.

For the 3D reconstruction of dendritic spines, serial sections were collected perpendicular to the apical dendrites of CA1 pyramidal neurons. Horizontal sections were cut to reach a distance of 50-100 μm from the pyramidal cell layer. Thirty microns height pyramids were then prepared in the middle of the CA1 area using a Diatome Trim 45 knife (Diatome, Bienne, Swizerland) to collect a 200x35 μm first section. Seventy nm-thick serial sections (33-65 sections) were collected on formvar-coated nickel slots grids.

For the analysis of cortical biopsies from patients, 0.5 μm -thick semithin sections were collected on glass slides to locate layers II-III. Seventy nm-thick ultrathin sections were collected on copper grids for EM analysis.

Counterstaining and examination of the sections

Semithin sections were stained with 0.5% toluidine blue. Ultrathin sections were contrasted by incubation with 5% uranyl acetate in 70% methanol for 5 min and then with lead citrate (0.08 M lead nitrate, 0.12 M sodium citrate in CO₂-free dH₂O) for 5 min, or only with 3% lead citrate for 10 min.

Semithin sections were analyzed with a Leica DMRD upright microscope and a Princeton Instruments CCD camera (RTECCD-1300Y/ES; Princeton Instruments, New Jersey, USA). Ultrathin sections were analyzed either with a Philips TECNAI 12 electron microscope (FEI, Eindhoven, the Netherlands) and a 4008 x 2672 Orius SC1000A1 CCD camera (Gatan, Evry, France), or with a Hitachi HT 7700 electron microscope (Elexience, Verrieres le Buisson, France) and a 2048 x 2048 AMT XR41-B CCD camera (Elexience).

Quantifications

Quantifications were performed blind to genotype. Quantifications of neuronal nuclei and height of the stratum radiatum were performed on 3 semithin sections per mouse, separated by 15 μ m. The sections (0.5 μ m) were too thin to include the whole volume of a nucleus; therefore sections of nuclei (“nuclear profiles”) were counted. In each semithin section, neuronal nuclear profiles in the pyramidal cell layer were manually counted in a 220 x 158 μ m rectangle centered on the pyramidal cell layer in the middle of the CA1 area. The profiles crossing one side of the counting rectangle were excluded, while those intersecting the other side were included. On one of the semithin sections, the surface area of the neuronal nuclear profiles in the counting rectangle was measured using the Image J software (Rasband, 1997). The height of the stratum radiatum was measured using the Image J software in the middle part of the CA1 area on the 3 semithin sections collected per animal. Averages were calculated for each mouse.

The density of synaptic profiles was evaluated on ultrathin sections of the stratum radiatum in the middle part of the CA1 area, at 50-100 μ m from the pyramidal cell bodies. The analysis was focused on asymmetric synapses, i.e. synapses with a postsynaptic density, established on dendritic spines (Peters et al., 1991). Small size of the post-synaptic compartment and lack of mitochondria and microtubules were considered specific of spine synapses to be distinguished from shaft synapses. For each PS1-KI and APPxPS1-KI mouse, photomicrographs of 29.22 μ m² were taken at 20,500-fold magnification and for WT and APP mouse photomicrographs of 34 μ m² were taken at 44,000-fold magnification every two fields in two squares of the 400-mesh grid. Synaptic profiles were counted in 35

photomicrographs per mouse as a mean (29-42 photomicrographs). The profiles crossing two sides of a picture were excluded, while those intersecting the two other sides were included (Gundersen et al., 1988). On the same photomicrographs, the length of 100 postsynaptic densities (PSDs) for PS1-KI and APPxPS1-KI mice and the neck diameter for each genotype were measured using the Image J software. The neck diameter was measured for the spines in the plane of the section from their emergence from the dendritic trunk up to their PSD. The mean density of synaptic profiles, PSD length and neck diameter were calculated for each mouse.

For 3D reconstruction of dendritic spines, photomicrographs were taken at 16,500-fold magnification on the serial sections. Dendrites running perpendicular to the plane of section were randomly selected and all their spines were reconstructed using the Reconstruct software (Fiala, 2005). A total of 50 spines were reconstructed per mouse. The mean spine and spine head volume, spine length, and spine neck length and diameter were calculated for each animal.

The density of synaptic profiles in biopsies of the right middle frontal gyrus from patients was assessed in ultrathin sections through the layers II-III. For each biopsy, photomicrographs of 52.7 μm^2 were taken at 35,000-fold magnification. Synaptic profiles were counted in a total of 80 photomicrographs per biopsy. To count the density of synaptic profiles, the profiles crossing two sides of a picture were excluded, while those intersecting the two other sides were included. The mean density of synaptic profiles was calculated for each biopsy. In addition, the width of the neck was calculated for all the spines having their neck and their PSD in the plane of the section. The linear regression of the number of synapses on neck diameter was then evaluated. In addition, to account for the effect of intra-individual sample variation that could possibly affect the predicted correlation, a resampling approach was adopted. The 95% confidence interval was computed by Bca bootstrapping (Efron, 1987) with 10 000 replicas using the boot.ci function of the R package 'boot'.

Immunohistochemistry for phospho-eIF2 α

Immunostainings were performed on 40 or 50 μm thick free floating sections of PS1-KI and APPxPS1-KI mice at 6 months (n=4 per genotype for basal p-eIF2 α immunohistochemistry (IHC), n=5 PS1-KI and n=8 APPxPS1-KI mice for p-eIF2 α IHC after lentivirus injection) and on 50 μm thick free floating sections of WT and APP mice at 6 months (n=6 per genotype for basal p-eIF2 α). Antibodies used against p-eIF2 α were Enzo Life Sciences BML-SA405, 1:500 and 1:2000 or Cell Signaling 119A11, 1:1000.

The mean gray value of p-eIF2 α staining was evaluated in the CA1 pyramidal layer using the ImageJ software after scanning the sections with a NanoZoomer 2.0-RS slide scanner (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). The optical density (OD) was calculated using the formula: $OD = \log_{10}(256/\text{mean gray value})$. The OD of the CA1 was normalized by the OD obtained in the corpus callosum.

Stereotactic injection of lentivirus

In order to decrease p-eIF2 α level, a lentivirus expressing both the specific eIF2 α phosphatase “growth arrest and DNA damage 34” (GADD34) (Novoa et al., 2001) and the “green fluorescent protein” (GFP) (LV-GADD34-GFP) under the control of the neuron specific promoter synapsin was injected (n=4 APPxPS1-KI mice). As a control, a lentivirus expressing GFP alone (LV-GFP) was injected (n=5 PS1-KI and n=4 APPxPS1-KI mice). Stereotactic injections were made unilaterally in the pyramidal layer of the CA1 subfield (x: -1.3; y: +2.2; z: -1.3) at 4 months when no neuronal loss is observed. Effects were evaluated at 6 months when the synaptic and neuronal loss are significant.

Tissue processing following stereotactic injection of lentivirus

The mice were perfused transcardially with 4% paraformaldehyde at 6 months. After 24H of 4% paraformaldehyde post-fixation, alternates 40 or 50 μm thick sections for optical microscopy (p-eIF2 α staining, see above) and 200 μm thick sections for electron microscopy were made with a vibratome.

For electron and light microscopy, we selected the CA1 area where GFP was expressed (lentivirus side) and compared it to the corresponding CA1 area in the opposite side without injection (control side). Electron microscopy and neuronal and synaptic quantifications were then performed as previously described, respectively per 318 μm -long portion in the CA1 for neuronal density and per 52,9 μm^2 (35,000-fold magnification) in the middle of the stratum radiatum for synaptic density.

Cognitive evaluation

The apparatus consisted of a square open field (50 x 50 cm) placed in a room with weak controlled luminosity (8 Lux) and constant 60 dB white noise. Visual inserts with distinct features were placed on the internal walls of the arena to provide cues allowing definition of a spatial context.

Nine PS1 KI and 11 APPxPS1 KI mice were evaluated. All the animals were three months old. The first two days (D1-2), they were handled by the experimenter. On the two

subsequent days (D3-4), mice were habituated for 10 min to the empty arena. On Day 5 (D5), four identical objects were placed symmetrically 10 cm away from the arena corners. Mice were free to explore the objects and to habituate to their presence in the arena for 10 min. On the following test day (D6), the mice were placed in the arena containing three never-experienced identical objects distributed in all corners except the south-east one (Fig. 8); the mice were allowed to explore the objects for two 10 min sessions inter-spaced by a 5 min delay. The mice were then left in their home cage for a 5 min retention interval. To test short-term spatial recognition memory, one of the three familiar objects was displaced to the south east corner location. Mice were free to explore the new configuration for a 10 min period. Detection of spatial change (object displacement) in the environment is classically demonstrated by a spatial bias of mice while exploring objects (increased exploration of the displaced object).

Between each trial the arena and objects were cleaned with 70° ethanol to reduce olfactory cues. During all sessions mice were monitored using the Any-Maze video-tracking software (Stoelting, Wood Dale, USA). An object was automatically considered to be explored when the distance between the nose of the mouse and the object was shorter than 2 cm. Pilot studies indicated that this automatic measure was strongly correlated with the manual scoring of exploratory bouts. The ratio time exploring the displaced object versus total exploring time of objects was calculated and used as a memory index (I; chance level at 33%):

$$I = \frac{O_d}{O_d + O_{nd1} + O_{nd2}} \quad 100$$

O_d : time spent exploring the displaced object

$O_{nd1,nd2}$: time spent exploring the two non-displaced objects

Ex vivo electrophysiology

Electrophysiological experiments were performed in PS1-KI (n=8) and APPxPS1-KI (n=8) mice at the age of 3 months. PS1-KI and APPxPS1-KI mice were deeply anesthetized with isoflurane and sacrificed alternately one per day. The brain was rapidly removed from the skull and placed in a chilled (0-3°C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (mM) NaCl 124, KCl 3.5, MgSO4 1.5, CaCl2 2.5, NaHCO3 26.2, NaH2PO4 1.2, glucose 11. Transverse slices (300-400 μ m thick) were cut using a vibratome (Leica VT1200S), and placed in a holding chamber (at 27°C) containing the ACSF solution for at least one hour

before recording. Each slice was individually transferred to a recording chamber and submerged with ACSF continuously superfused and equilibrated with 95% O₂, 5% CO₂ at room temperature. Experiments were performed in the dendritic field of the CA1 area following the stimulation of Schaffer collaterals/commissural pathway located in the stratum radiatum. Recordings of presynaptic fiber volley (PFV) and field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs), mostly resulting from the activation of AMPA receptors, construction of Input/Output (I/O) curves assessing the responsiveness of AMPA/Kainate glutamate receptor (A/K), and measure of paired-pulse facilitation (PPF) induced by paired-pulse stimulation with inter-stimulus intervals of 40 ms have been previously detailed (Potier et al., 2010). Long-term potentiation (LTP) was induced by theta-burst stimulation, consisting of five trains of four 100 Hz pulses each, separated by 200 ms and delivered at test intensity (repeated four times with an interburst interval of 10 s). Testing with a single pulse was then resumed at 0.33 Hz for 60 min. Long-term depression (LTD) was induced by applying a low frequency stimulation at 2 Hz (1200 pulses for 10 min) after collecting 15 min of stable baseline responses at 0.33 Hz, and recorded for 60 min after stimulation.

In order to assess synaptic potentials specifically mediated by NMDAR, I/O curves were constructed from recordings obtained in slices perfused with low-Mg²⁺ (0.1 mM) aCSF supplemented with the non-NMDAR antagonist 2,3-dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzoquinoxaline-7-sulfonamide (NBQX, 10 μ M).

Whole-cell patch-clamp recordings of CA1 pyramidal neurones were performed at room temperature, using borosilicate patch pipettes (5 M Ω) filled with CsCH₃SO₃ 140 mM, CsCl 6 mM, MgCl₂ 2mM, HEPES 10 mM, EGTA 1,1 mM, QX-314 5 mM, ATP 4 mM, (pH 7.3; 300 mosm). Transmembrane currents were acquired and filtered by an amplifier (AxoPatch 1-D, Axon Instruments), stored on a computer and digitalized using the WinLTP software (Anderson and Collingridge, 2001) for on-line and off-line analysis. Miniature spontaneous excitatory post-synaptic currents (mEPSCs) were recorded from CA1 pyramidal neurons in APPxPS1 KI (n = 15 from 8 mice) and PS1 KI mice (n = 18 from 8 mice) in the continuous mode at holding potential (hp) = -60 mV. Recordings were in the presence of tetrodotoxin (TTX; 1 μ M) to abolish action potentials and hence inhibit synaptic transmission, and bicuculline (10 μ M) to selectively antagonize GABA transmission through GABA_A receptors. Frequency and amplitude of mEPSCs occurrence were measured using Spike 2 (CED, Cambridge). Membrane resistance was recorded from CA1 neurons in APPxPS1 KI (n

= 15 from 8 mice) and PS1 KI mice (n = 21 from 8 mice) and calculated at the steady-state of a -10 mV step (70 msec) from $h_p = -60$ mV.

Numerical simulations

The simulation environment NEURON (version 7.4) (Hines and Carnevale, 1997) was used to build a compartmental model consisting of a soma (diameter: 15 μm , length: 42 μm), an apical dendrite (length: 500 μm ; proximal diameter: 4 μm ; distal diameter: 0.4 μm), on which a spine (diameter of spherical head: 0.564 μm ; length of spine neck: 0.8 μm ; diameter of spine neck: 0.098 - 0.27 μm ; R_{neck} : 10 - 640 $\text{M}\Omega$) was inserted at a distance of 50 μm from the soma. In each section, the number of segments was an odd number calculated according to the d-lambda rule, with a frequency of 1000 Hz and a d-lambda of 0.03.

All compartments had the same specific membrane resistance (R_m) set to 13600 $\Omega \times \text{cm}^2$ (specific leak conductance: 73.53 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$). All computations were carried out assuming a specific capacitance, C_m , of 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ and a specific cytoplasmic resistance, R_a , of 150 $\Omega \times \text{cm}$. Excitatory synaptic currents were simulated using exponential functions (rise time constant $\tau_1 = 0.2$ ms and decay time constant $\tau_2 = 3$ ms), with a maximal synaptic conductance of 1 nS and a reversal potential of 0 mV. The resting potential was set to $V_{\text{rest}} = -80$ mV by adjusting the reversal potential of the leak conductance.

The temporal integration step was 20 μs . In series of simulations, the electrical resistance imposed by the spine neck was set to 10, 20, 40, 80, 160, 320, and 640 $\text{M}\Omega$ by adjusting the diameter of the spine neck. The resulting simulated EPSPs were measured in the spine head and in the soma.

Statistical analysis

Between-groups comparisons were performed using two-tailed, paired or unpaired Student's t-tests and statistical significance was set to a p value <0.05 . For the analysis of spine shape, the arcsin function was applied to the fraction of spines with head and headless spines for each animal, followed by comparison with two-tailed, unpaired Student's t-test. For analyses of lentivirus effects, measurements in the lentivirus side were compared with those in the control side using a two-tailed, paired-t-test. Analyses were performed with Statistica v9 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) or GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) statistical packages.

Results

Specific decrease of neuronal and synaptic density in APPxPS1-Ki

Previous studies indicated a 20-30% neuronal loss at 6 months, and a 50% neuronal loss at 10 months in the CA1 stratum pyramidale of APPxPS1-KI mice (Breyhan et al., 2009; Casas et al., 2004; Faure et al., 2011). To determine how early a decrease of neuronal density could be detected, the numerical density of neuronal nuclear profiles was quantified on semithin sections in PS1-KI and APPxPS1-KI mice at 3, 4 and 6 months. The quantification was performed in the middle part of the dorsal hippocampus, in the pyramidal cell layer in the middle of the CA1 subfield (Fig. 1A, B). The numerical density of neuronal nuclear profiles was unchanged at 3 and 4 months, but as expected significantly reduced at 6 months in APPxPS1-KI mice (-19%, unpaired Student's t-test: $t(6) = 2.89$, $P = 0.028$; Fig. 1A-C). Because changes in the size of neuronal nuclei could have induced a stereological bias in the neuron count, we verified that the surface area of nuclear profiles was not different between genotypes (data not shown). Contrary to APPxPS1-KI mice, and in agreement with a previously published study (Casas et al., 2004), no reduction of neuronal density was observed in APP transgenic mice at 6 months (Fig. 1D).

To determine if synaptic alterations in the stratum radiatum could precede the neuronal loss, we first measured the width of the stratum radiatum (Double arrows in Fig. 1A, B). There was no change in the width of the stratum radiatum at 3 or 4 months, but a significant 27% reduction at 6 months in APPxPS1-KI mice (unpaired Student's t-test: $t(6) = 6.89$, $P = 0.0005$; Fig. 1E). The density of excitatory, asymmetric synaptic profiles on dendritic spines was then quantified using EM in the stratum radiatum at 50-100 μm from the pyramidal cell layer (Fig. 1F, G). There was no change at 3 months, but significant reductions at 4 months (-14%, unpaired Student's t-test: $t(6) = 2.83$, $P = 0.030$), and at 6 months (-42%, unpaired Student's t-test: $t(6) = 4.11$, $P = 0.006$; Fig. 1H). Contrary to APPxPS1-KI mice, no reduction of synaptic density was observed in APP transgenic mice at 6 months (Fig. 1I). In AD, the reduction in the density of synaptic profiles is accompanied by an increase in the length of PSD profiles (Scheff and Price, 2003). Accordingly, the PSD length was unchanged at 3 months, when there was no reduction of synaptic density. It was increased in APPxPS1-KI mice by 10% at 4 months (unpaired Student's t-test: $t(6) = 2.48$, $P = 0.048$), and by 16% at 6 months (unpaired Student's t-test: $t(6) = 5.54$, $P = 0.002$; Fig. 1J).

Thus, APPxPS1-Ki mice show a specific decrease in synaptic density at 4 months in the stratum radiatum, preceding the neuronal loss at 6 months. This reduction in the density of

synapses was paralleled by a progressive increase in the apposition length of surviving synapses, similarly to what is observed in AD.

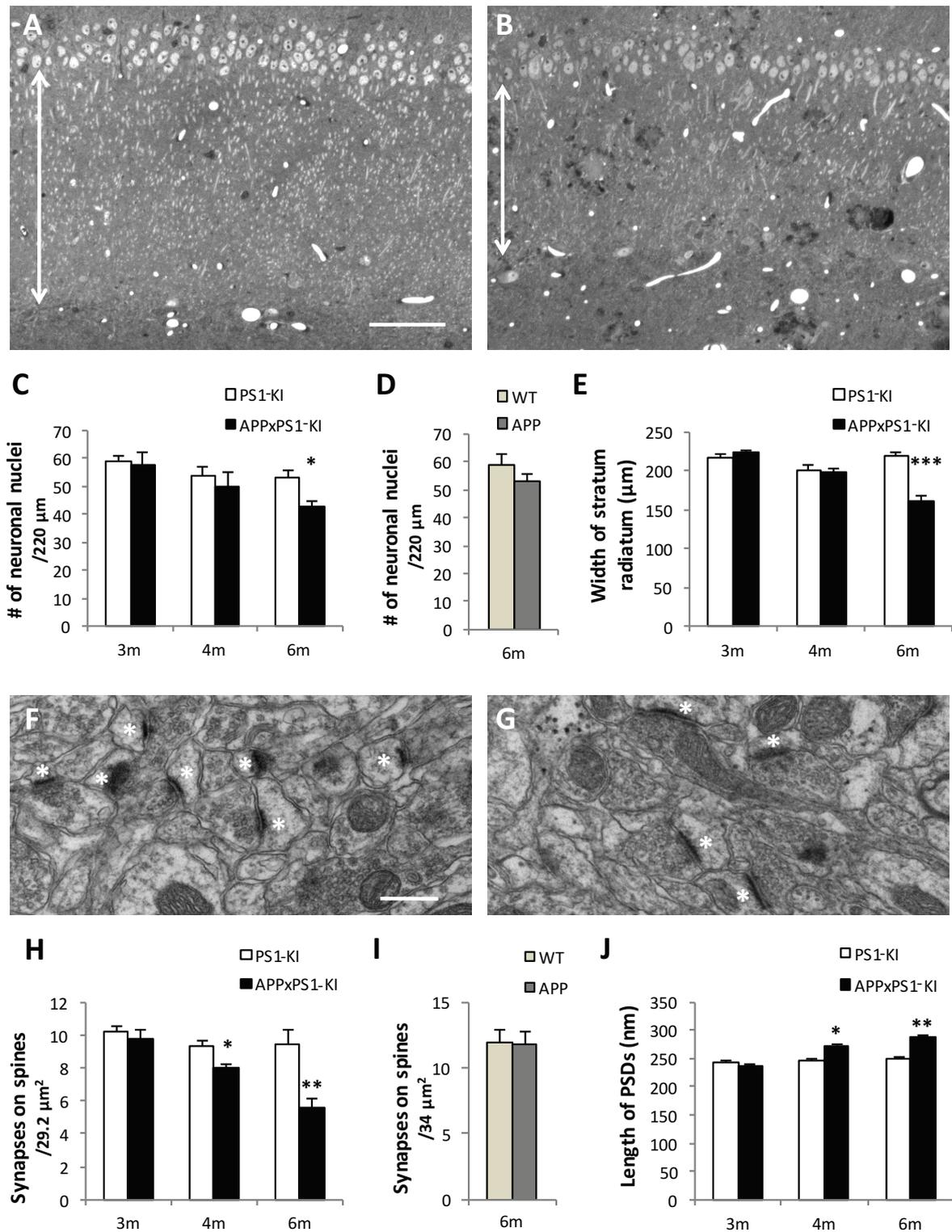


Figure 1. Decrease of neuronal and synaptic density specifically in APPxPS1-KI mice

A, B. Semithin sections through the CA1 pyramidal layer at 6 months in PS1-KI (A) and APPxPS1-KI (B) mice. C, D. Quantification (mean+SEM) of the number of neuronal nuclei profiles per 220 μm -long portion of the pyramidal cell layer in PS1-KI and APPxPS1-KI mice (C)

and in WT and APP mice (D). E. Quantification (mean+SEM) of the width of the stratum radiatum. The width of the stratum radiatum is indicated by the double arrow in A and B. Note the reduced density of neuronal nuclei profiles and the atrophy at 6 months of age in APPxPS1-KI mice. F, G. Ultrathin sections in the middle of the CA1 stratum radiatum at 6 months in PS1-KI (F) and APPxPS1-KI (G) mice. Asterisks indicate synaptic profiles. H, I. Quantification (mean+SEM) of the number of synaptic profiles on spines per 29.2 μm^2 in PS1-KI and APPxPS1-KI mice (H) and per 34 μm^2 in WT and APP mice (I). J. Quantification (mean+SEM) of the length of PSDs. Note that the progressive reduction of synaptic density, preceding the neuronal loss, is accompanied by a concomitant increase of the length of PSDs in APPxPS1-KI mice. Scale bar in A: 100 μm in A and B. Scale bar in F: 400 nm in F and G. Difference between genotypes, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Decreasing eIF2 α phosphorylation did not prevent neuronal and synaptic loss

An endoplasmic reticulum stress was detected in whole brain extracts from APPxPS1-KI mice at 3 months, with an increased phosphorylation of the “eukaryotic translation initiation factor 2 subunit α ” (eIF2 α) (Page et al., 2006). The phosphorylation of this factor was responsible for a sustained translational repression implicated in neurodegeneration in a Prion disease mouse model (Moreno et al., 2012). To determine if such alteration could be responsible for the loss of synapses and neurons in APPxPS1-KI mice, we analyzed the phosphorylation of eIF2 α in brain slices of these mice. There was indeed a significant increase of the optical density of p-eIF2 α immunostaining in the CA1 pyramidal layer at 6 months (+35%, unpaired Student’s t-test: $t(6)=4.295$, $P=0.0051$; Fig. 2A, B). Nevertheless, an increased phosphorylation of eIF2 α was also observed in APP transgenic mice that do not develop loss of neurons and synapses (+28%, unpaired Student’s t-test: $t(10)=5.397$, $P=0.0003$; Fig. 2C). Thus, increased eIF2 α phosphorylation does not seem to be sufficient to induce loss of neurons and synapses. However, to assess whether decreasing eIF2 α phosphorylation could prevent these losses, we injected a lentivirus expressing the specific eIF2 α phosphatase “growth arrest and DNA damage 34” (GADD34) and the “green fluorescent protein” (GFP) (LV-GADD34-GFP). As a control we used a lentivirus expressing GFP alone (LV-GFP). Unilateral injections in the CA1 pyramidal layer were performed at 4 months, when there was no loss of neurons. The effects were evaluated at 6 months when neuronal and synaptic loss are significant. The values obtained in the area where the lentivirus was expressed (lentivirus side) were compared to the values obtained in the equivalent area in the opposite side without lentivirus injection (control side) (Fig. 2D). The level of p-eIF2 α staining was decreased specifically in the area where the LV-GADD34-GFP was expressed in the pyramidal layer of the CA1 area (Fig. 2E). A significant 39% decreased of optical density

was observed in the lentivirus side after LV-GADD34-GFP injection (paired Student's t-test: $t(3)=7.156$, $P=0.0056$; Fig. 2F). However, no difference was observed between the lentivirus and the control side after injection of LV-GADD34-GFP in term of density of neurons (Fig. 2G) or synapses (Fig. 2H). Thus, decreasing eIF2 α phosphorylation is not sufficient to prevent the neuronal and synaptic loss in APPxPS1-KI mice.

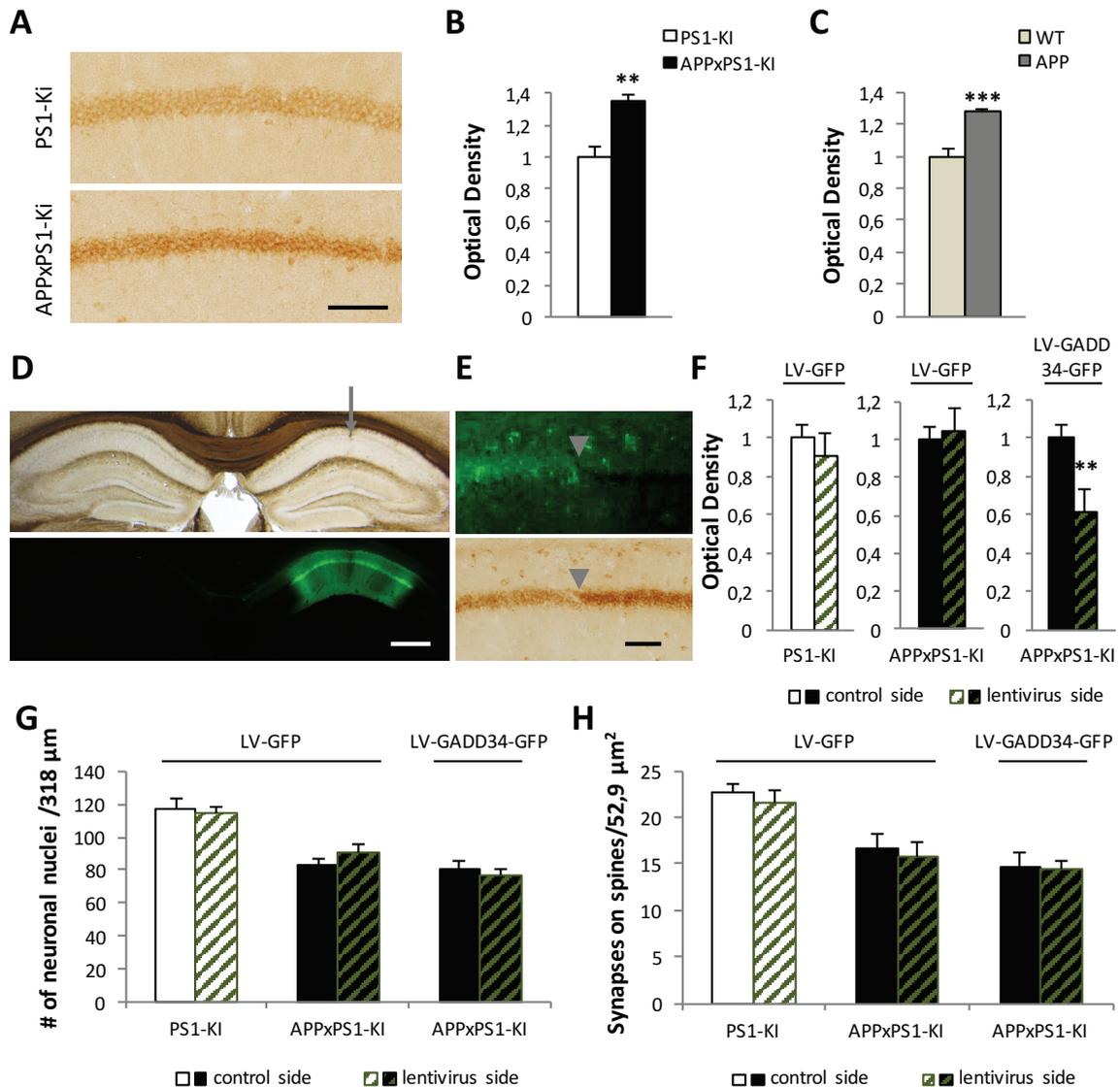


Figure 2. Decreasing eIF2 α phosphorylation did not prevent neuronal and synaptic loss

A. Immunohistochemical staining for p-eIF2 α in the CA1 subfield in PS1-KI and APPxPS1-KI mice. B. Quantification (mean+SEM) of the optical density of p-eIF2 α staining in the pyramidal layer at 6 months. Histograms show means normalized by PS1-KI mice. C. Quantification (mean+SEM) of the optical density of p-eIF2 α staining in WT and APP mice at 6 months. Histograms show means normalized by WT mice. Note the significant increase of p-eIF2 α staining in APPxPS1-KI mice, but also in APP mice that did not present loss of neuron and synapse. D.

Example of the expression of the control lentivirus expressing GFP only (LV-GFP) at 6 months after injection in the CA1 pyramidal layer at 4 months (the arrow indicates the site of injection in the lentivirus side). E. Example of the effect of the lentivirus expressing both GADD-34 and GFP (LV-GADD34-GFP) on p-eIF2 α staining at 6 months. Note the decrease of the staining where the lentivirus was expressed (left side of the arrowhead). F. Quantification (mean+SEM) of the optical density of p-eIF2 α staining in the CA1 pyramidal layer after injection of either LV-GFP or LV-GADD34-GFP in PS1-KI and APPxPS1-KI mice. Histograms show means in the area where LV-GFP or LV-GADD34-GFP is expressed (lentivirus side), normalized by the same area on the control side. Note the specific and significant decrease of p-eIF2 α staining in the lentivirus side after injection of LV-GADD34-GFP in APPxPS1-KI, in comparison to the control side without injection of lentivirus. Quantification (mean+SEM) of the number of neuronal nuclei profiles per 318 μm -long portion of the CA1 pyramidal cell layer (G) and the number of synaptic profiles on spines per 52,9 μm^2 in the middle of the CA1 stratum radiatum (H), after injection of either LV-GFP or LV-GADD34-GFP. Note that despite the fact that LV-GADD34-GFP decreased the phosphorylation of eIF2 α , the number of neurons and synapses was unchanged. Scale bar in A: 100 μm , D: 500 μm , E: 100 μm . Difference between genotypes, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Early deficit in spatial memory

In order to find alterations preceding the loss of synapses and neurons that could be involved in these losses, we firstly determined whether cognitive deficits could be present early in mice by studying the short-term spatial recognition memory at 3 months. For that purpose, we used a novel object location (NOL) paradigm.

During acquisition mice spent much time exploring the objects. This was observed both in PS1-KI (mean = 202 sec. of exploration cumulated on the 3 objects, minimum = 134 sec., maximum = 311 sec.) and in APPxPS1-KI mice (mean = 189 sec., minimum = 113 sec., maximum = 266 sec.). Importantly similar levels of exploration were noted in the two genotypes (unpaired Student's t-test: $t(18) = 0.57$, ns) indicating comparable exposition to the stimuli to be memorized.

Five minutes after acquisition mice were replaced in the arena for the memory retention test (Fig. 3A). When exploration levels were compared to chance level (33% of exploration on each objects), PS1-KI mice significantly preferred the displaced object (paired Student's t-test: $t(8) = 8.156$; $p < 0.0001$) while APPxPS1-KI mice did not ($t(10) = 1.927$; ns). APPxPS1-KI mice demonstrated a lower memory index when compared to control PS1-KI mice (unpaired Student's t-test: $t(18) = 3.5017$; $p < 0.005$; Fig. 3B) indicative of an important recognition memory deficit in this genotype at 3 months.

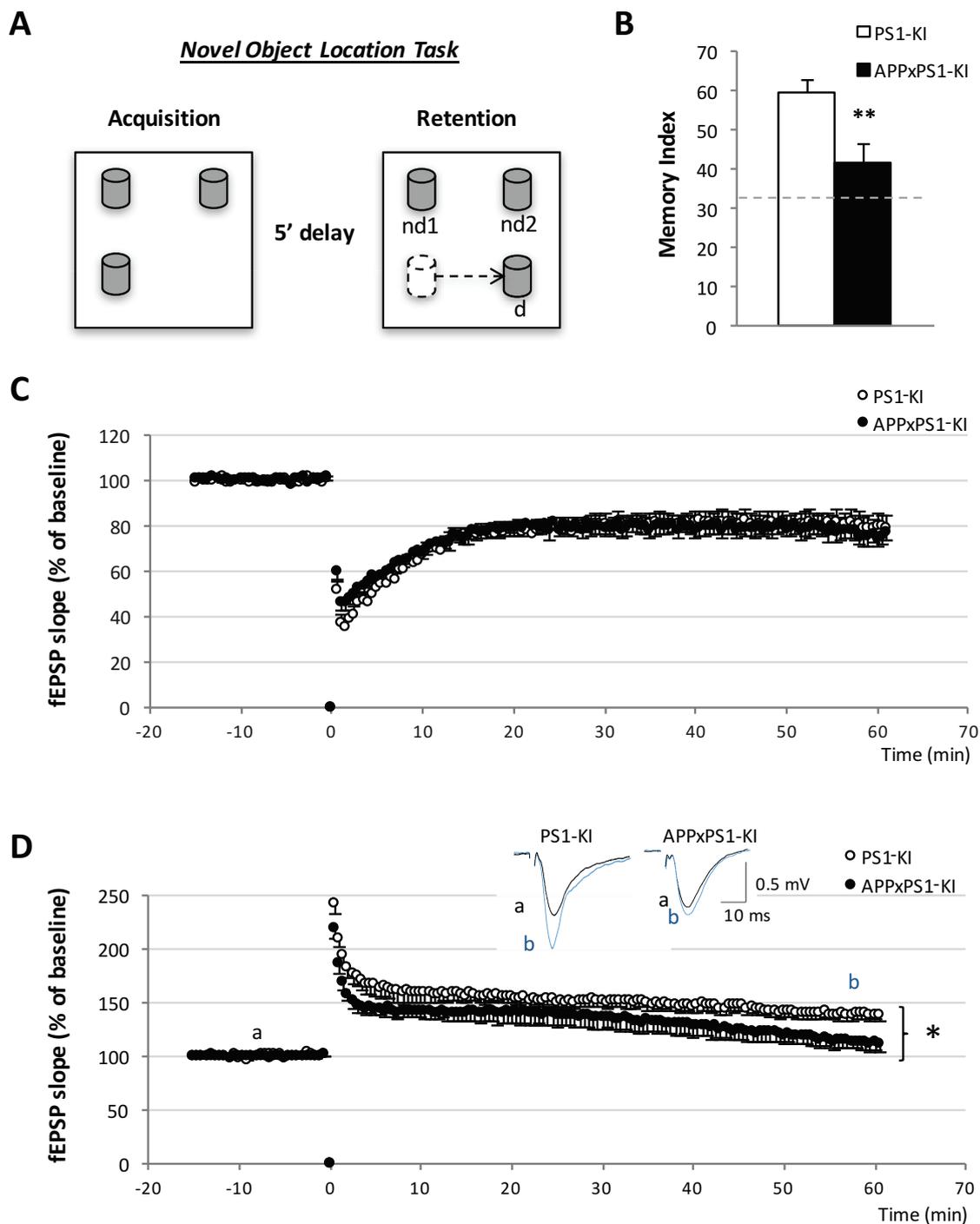


Figure 3. Early alteration of memory performance and synaptic plasticity

A. Scheme of the NOL paradigm (Acquisition and Retention phases). nd1, nd2: non displaced objects; d: displaced object. B. Graph of memory index showing memory impairment in 3-months-old APPxPS1 KI mice. 33% line: random performance. C. Long-term depression (LTD) recorded after application of a low frequency stimulation. D. Long-term potentiation (LTP) was induced by Theta Burst Stimulation at t0 after recording 15 min of baseline. LTP was then recorded during 60

min. Note that applying stimulation induced a potentiation of synaptic responses (measured between the 50th and 60th minutes after stimulation) much lower in APPxPS1-KI mice as compared to PS1-KI mice. Difference between genotypes, *:p<0.05, **: p<0.01.

Early deficit in long-term potentiation

An early deficit in recognition memory could be indicative of an alteration in synaptic plasticity before the loss of synapses and neurons. To determine if such alteration occurs in APPxPS1-KI mice, we performed electrophysiological experiments at 3 months, when recognition memory is altered.

In the CA1 subfield, LTD following low frequency stimulation of Schaffer collaterals was not modified in APPxPS1-KI (Fig. 3C). The low frequency stimulation applied at 2-Hz (1200 pulses), induced a comparable depression of synaptic responses in slices from PS1-KI ($80.3 \pm 4.8\%$ of baseline, n=10 slices from 8 mice) and in slices from APPxPS1-KI ($77.9 \pm 4.0\%$ of baseline, n=8 slices from 8 mice; $F(1,16)=0.15$, $P=0.7$).

However, a deficit in LTP was observed following theta-burst stimulation of Schaffer collaterals (Fig. 3D). Applying stimulation induced a potentiation of synaptic responses (measured between the 50th and 60th minutes after stimulation) much lower in APPxPS1-KI mice ($115.9 \pm 7.5\%$ of baseline, n=14 slices from 8 mice) as compared to PS1-KI mice ($139.8 \pm 5.2\%$ of baseline, n=13 slices from 8 mice). The difference was statistically significant ($F(1,25)=6.8$, $P=0.014$). A statistically significant difference was also observed during the first 3 minutes after stimulation, indicating an alteration of LTP induction. These results indicate that an alteration of LTP precedes synapse and neuron loss in APPxPS1-KI mice.

Maintenance of basal parameters of synaptic function

To determine whether changes of basal parameters of synaptic function could be responsible for the early alteration of LTP or whether a depression of basal synaptic function could be involved in the loss of synapses, we performed electrophysiological recordings in the CA1 subfield. Following stimulation of Schaffer collaterals, we observed no alteration of the afferent volley slope, of the field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) or of the paired-pulse facilitation, suggesting that presynaptic axon excitability and presynaptic release probability were not altered in APPxPS1-KI mice (Fig. 4A, B, C). There were also no significant modification of the amplitude of NMDA-dependent fEPSPs (Fig. 4D). Patch

clamp recordings of CA1 pyramidal neurons showed no alterations of the amplitude and frequency of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) dependent on the activation of AMPA receptors, nor of the membrane resistance (Fig. 4 E, F, G). Thus, the spontaneous release of glutamate and synaptic AMPA and NMDA currents did not appear modified.

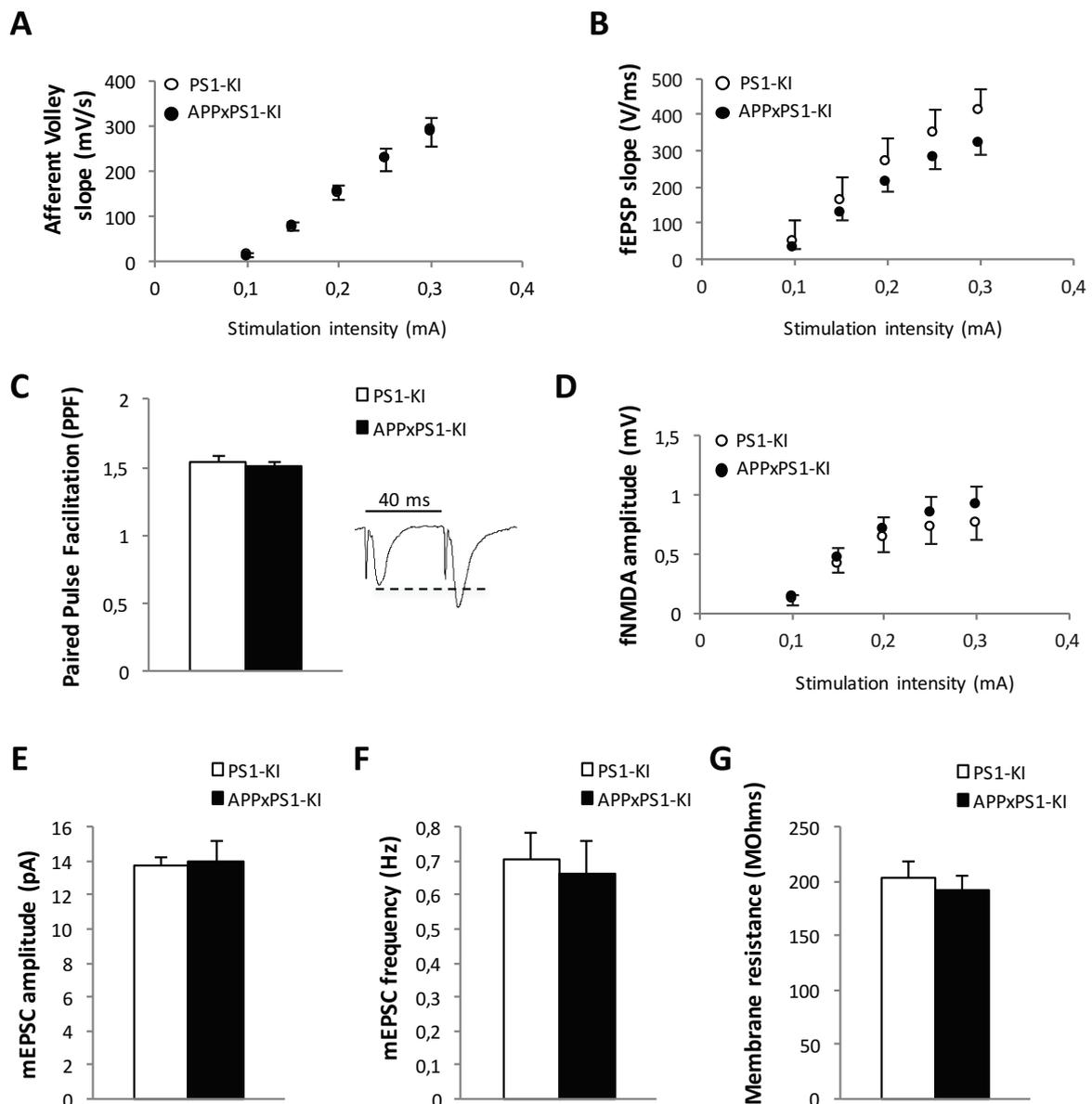


Figure 4. Maintenance of basal parameters of synaptic function

Extracellular recordings of afferent volley slopes (A), fEPSP slopes of non-NMDA synaptic potentials (B), paired-pulse facilitation (PPF) (C) and fNMDA amplitudes (D). For PPF measurement, the slope of the second response was normalized by the slope of the first one. Patch

clamp recordings of amplitude (E) and frequency (F) of miniature events (mEPSCs) and of the membrane resistance (G). Note the absence of significant modifications in APPxPS1-KI mice.

Early alteration in the morphology of dendritic spines

An increased proportion of stubby spines was observed in mouse models of AD (Pozueta et al., 2013; Tackenberg and Brandt, 2009). To determine if an alteration of spine morphology could be associated to the early deficit of LTP, preceding the loss of synapses and neurons, the morphology of dendritic spines was assessed by measuring the neck diameter of spines in the plane of EM sections (Fig. 5A, B). The neck diameter was increased in APPxPS1-KI mice at 3 months when compared to PS1-KI mice (28,6%, unpaired Student's t-test: $t(6)= 2.57$, $P= 0.018$) and in APP at 6 months when compared to WT (18,6%, unpaired Student's t-test: $t(4)= 4.20$, $P= 0.007$, Fig. 5C). Note that the increase of the neck diameter in APPxPS1-KI seems greater than in APP transgenic mice.

Correlation of spine density and morphology in biopsies

To study whether similar changes could be detected in AD brains, sections of layers II-III from biopsies of frontal cortex were studied. The ultrastructure was well preserved in the biopsies of either non-AD ($n=5$) or AD patients ($n=3$), allowing a clear identification of spine synapses (asterisks in Fig. 5D, E). We measured for each case the neck diameter for all the spines having their neck and their PSD in the plane of the section (Fig. 5F, G). A significant negative correlation was observed between the number of synapses and the neck diameter ($R^2=0.566$, $\text{Prob}>F = 0.031$; Fig. 5H). Moreover, to account for the effect of intra-individual sample variation that could possibly affect the predicted correlation, a resampling approach was adopted. The calculated 95% bootstrap confidence interval (-0.9493,-0.6003) still provides strong evidence of a significant negative correlation to validate the relationship between the number of synapses and the neck diameter. For two AD-cases, a decreased number of synapses was associated with an increase of the spine neck diameter. Because a modification of spine morphology was observed both in patients and animal models, we evaluated the potential impact of this alteration on synaptic physiology.

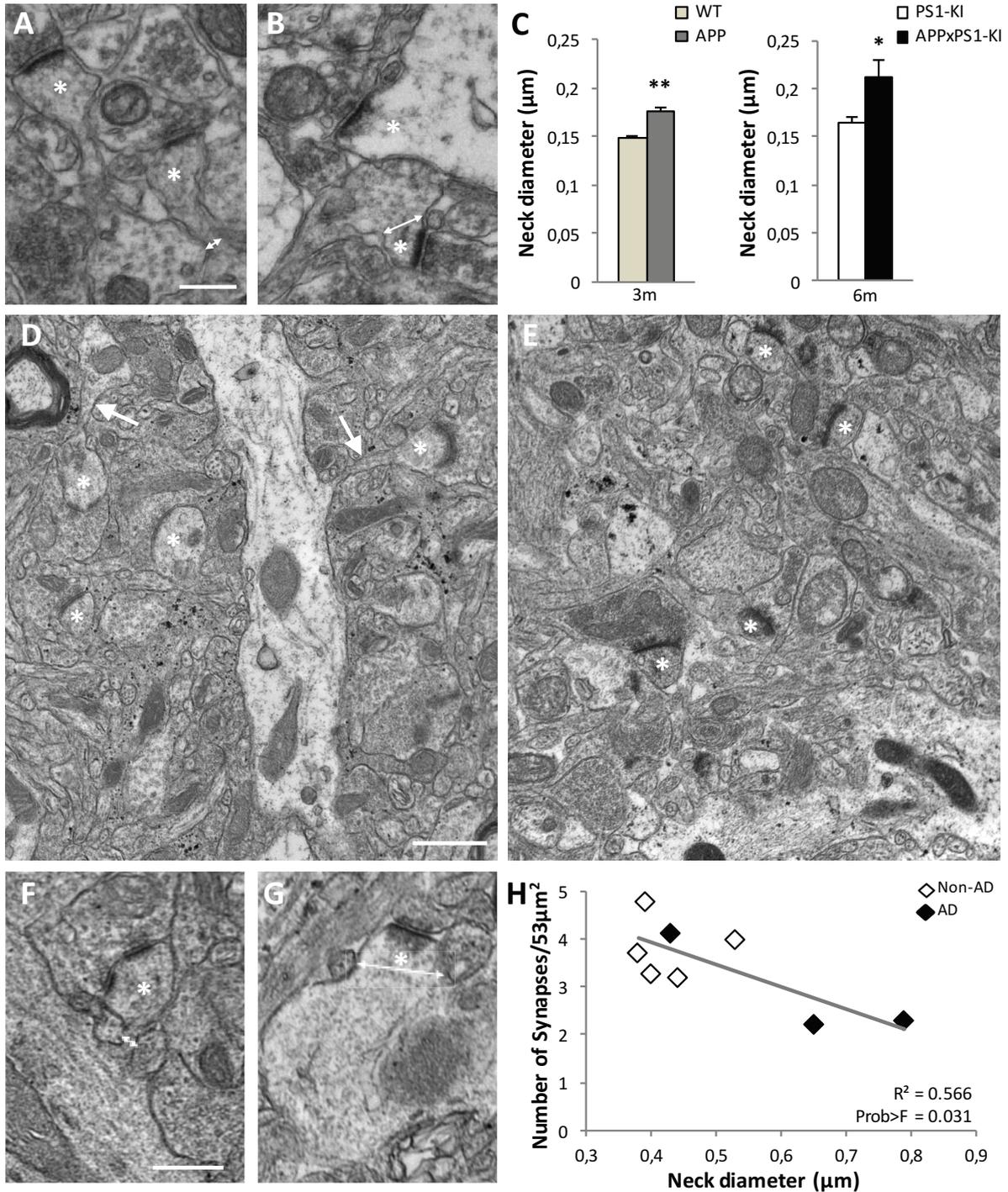


Figure 5. Early alteration of the morphology of dendritic spines

A, B. Examples of ultrathin sections through dendritic spines from PS1-KI (A) and APPxPS1-KI (B) mice at 3 months. Asterisks indicate spines having their neck in the plane of the section. Double arrows indicate the diameter of spine necks. C. Quantification (mean+SEM) of the neck diameter of dendritic spines having their neck in the plane of the section in PS1-KI and APPxPS1-KI mice at 3 months and in WT and APP transgenic mice at 6 months. Note the increased neck diameter in APP transgenic at 6 months and in APPxPS1-KI mice at 3 months. D, E. Ultrathin sections in the layers II-III of the frontal cortex of a non-AD (D) and an AD (E) patient. Spine

synapses are indicated by asterisks. Spine necks in the plane of the section are indicated by arrows. F, G. Examples of dendritic spines from a non-AD (F) and an AD (G) patient. Asterisks indicate spines having their neck in the plane of the section. Double arrows indicate the diameter of spine necks. H. Linear regression of the density of synapses on neck diameter in patients. Note that 2 AD cases displayed a reduction of synaptic density associated with an increased neck diameter. Scale bar in A: 500 nm in A and B. Scale bar in D: 1 μ m in D and E. Scale bar in F: 500 nm in F and G. Difference between genotypes, *: $p < 0.05$.

3D-spine reconstruction to simulate the impact of the alteration of spine morphology on EPSP amplitude

To simulate the impact of the alterations of spine morphology on the electrical and biochemical compartmentalization of spines, these alterations were precisely quantified using 3D reconstructions following serial sectioning EM (Fig. 6A, B).

Fifty spines were analyzed per mouse, allowing a total of 200 spines per genotype and per time point. 3D-spine reconstructions showed spines with either a thin neck (arrows) or a large neck (arrowheads) (Fig. 6B). The morphology of dendritic spines was then analyzed. Spines were classified as either “with head” when they had a bulbous end (spine head), or “headless”, when their thickness was homogeneous along their length (Fig. 6C; (Fiala et al., 2008)). Already at 3 months, there was a 28% decrease of the number of spines with head and a 93% increase of the number of headless spines in APPxPS1-KI mice (unpaired Student’s t-test: $t(6) = 3.54$, $P = 0.0122$; Fig. 6D). At 4 months, there was a 33% decrease of the number of spines with head and a 73% increase of the number of headless spines in APPxPS1-KI mice (unpaired Student’s t-test: $t(6) = 14.72$, $P < 0.0001$; Fig. 6D). At 6 months, the difference was also significant, with a 20% decrease in the number of spines with head and a 41% increase of the number of headless spines (unpaired Student’s t-test: $t(6) = 2.49$, $P = 0.047$; Fig. 6D).

Several morphological parameters have been measured on electron microscopy 3D-spine reconstruction (Fig. 6E, F). The size of the PSD is correlated with the volume of the dendritic spine (Harris and Stevens, 1989). Spine volume was not altered in APPxPS1-KI mice at 3 months, in agreement with the absence of modification of PSD length (Fig. 1J). The spine volume was increased by 43% in APPxPS1-KI mice at 4 months (unpaired Student’s t-test: $t(6) = 2.48$, $P = 0.048$), and by 26% at 6 months (unpaired Student’s t-test: $t(6) = 3.07$, $P = 0.022$) (Fig. 6G).

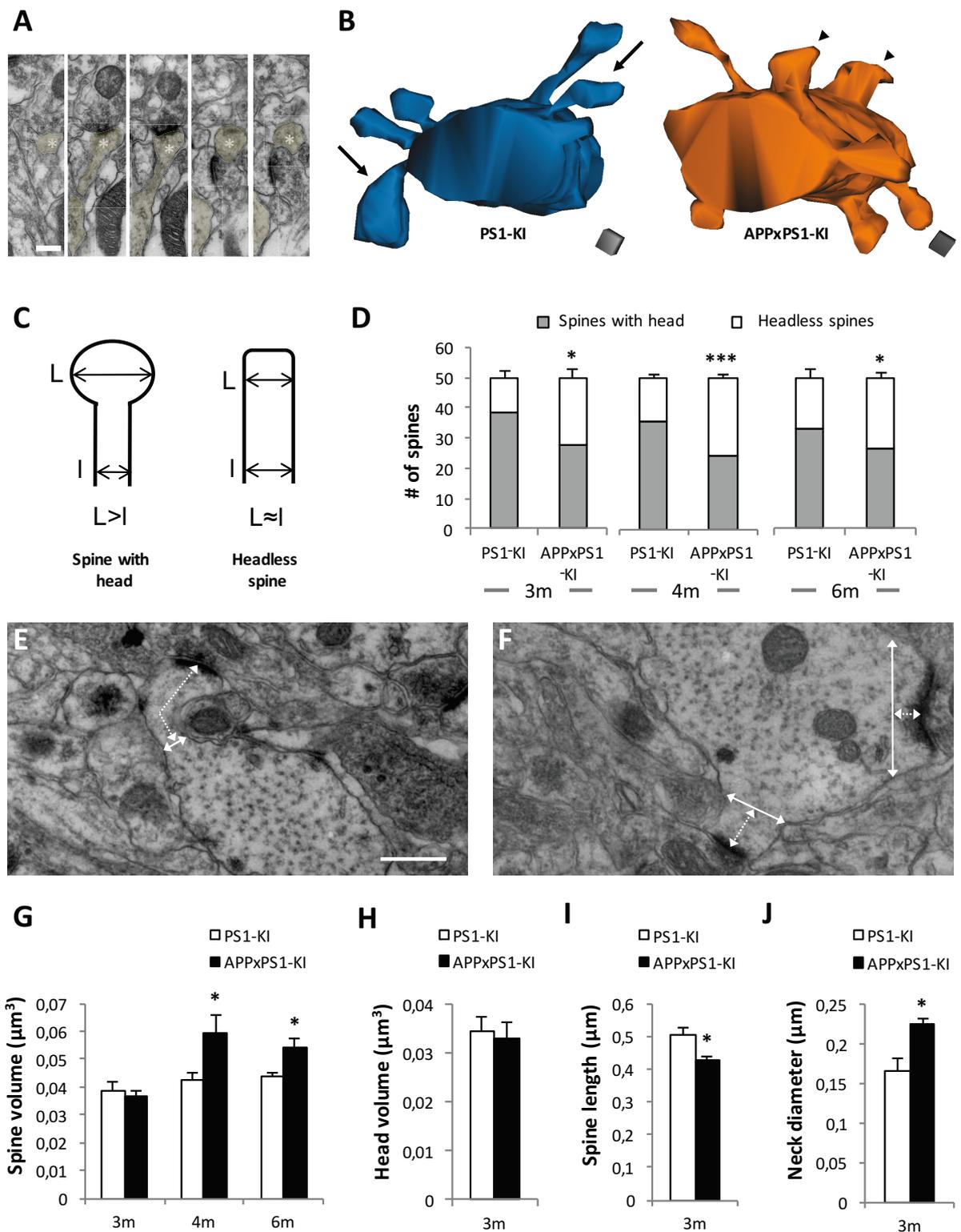


Figure 6. Measurement of dendritic spine morphological characteristics using 3D-spine reconstruction

A. Serial sections through a dendritic spine from a PS1-KI mouse at 4 months. Asterisks indicate the head of the spine. B. Examples of 3D reconstructions of dendritic segments from PS1-KI (arrows: spines with a thin neck) and APPxPS1-KI (arrowheads: spines with a large neck) mice at 3 months. C. Criteria for the classification of spines as spine with head and headless spine. D.

Quantification (mean+SEM) of the number of spines with head and headless spines at 3, 4 and 6 months of age. E, F. Examples of sections through dendritic spines from a PS1-KI (E) and an APPxPS1-Ki (F) mouse. Double arrows indicate the diameter of spine necks and double dashed arrows indicate the length of the spines. Quantification (mean+SEM) of the volume of dendritic spines (G), the volume of the spine heads (H), the length of spines (I), and the diameter of spine necks (J). Note that the spine length is decreased while the spine neck is increased in APPxPS1-KI mice at 3 months. Scale bar in A: 250nm. Scale cube in B: $0.2\mu\text{m}^2$ on a side. Scale bar in E: 500 nm in E and F. Difference between genotypes, *: $p<0.05$; ***: $p<0.001$.

To avoid bias due to this increased volume, measurements of spine morphology were performed at 3 months. The head volume was not modified at 3 months (Fig. 6H). However, the length of dendritic spines (dashed arrows in Fig. 6E, F) was decreased in APPxPS1-KI mice by 15 % (unpaired Student's t-test: $t(6)= 2.81$, $P= 0.0308$, Fig. 6I) and the diameter of spine necks (arrows in Fig. 6E, F) was increased by 35% (unpaired Student's t-test: $t(6)= 3.36$, $P= 0.0153$; Fig. 6J), in agreement with the quantification on single sections (Fig. 5C). Thus, at 3 months the length of dendritic spines is reduced while the diameter of their neck is increased, before the loss of synapses and neurons. It gives spines a more “stubby” appearance (Fig. 6B).

Simulation of the impact of the alteration of spine morphology on the electrical and biochemical compartmentalization of spines

Both, the reduced length and the increase of the neck diameter should reduce the electrical resistance of spine necks (Tønnesen et al., 2014). We estimated the electrical resistance of spine necks on the basis of neck morphology using Ohm's law:

$$R = \frac{\rho L}{A}$$

where ρ is the resistivity of the cytoplasm assumed to be $150 \Omega \times \text{cm}$, L the length and A the cross-sectional area of the spine neck (Tønnesen et al., 2014). The estimated mean neck resistance was $35 \text{ M}\Omega$ in PS1-KI mice and $20 \text{ M}\Omega$ in APPxPS1-KI mice (unpaired Student's t-test: $t(6)=2.6291$, $P=0.0391$), indicating a 43% reduction of the neck resistance (Fig. 7A).

We then simulated the potential effects of the modification of spine neck resistance on EPSPs in spine heads and somas (Fig. 7B). Decreasing the spine neck resistance by 50% had very little impact on EPSP amplitude in the cell body, whatever the initial resistance (Fig. 7C). It started to substantially affect the EPSP in the spine head for neck resistances initially larger

than 80 M Ω (Fig. 7C). However, only a small fraction of spines had neck resistances larger than 80 M Ω in control mice. While previous studies based on super-resolution light microscopy reported higher estimates for the average neck resistance of spines of hippocampal neurons, the fraction of spines with high neck resistance was also relatively modest (Tønnesen et al., 2014; Viana da Silva et al., 2016).

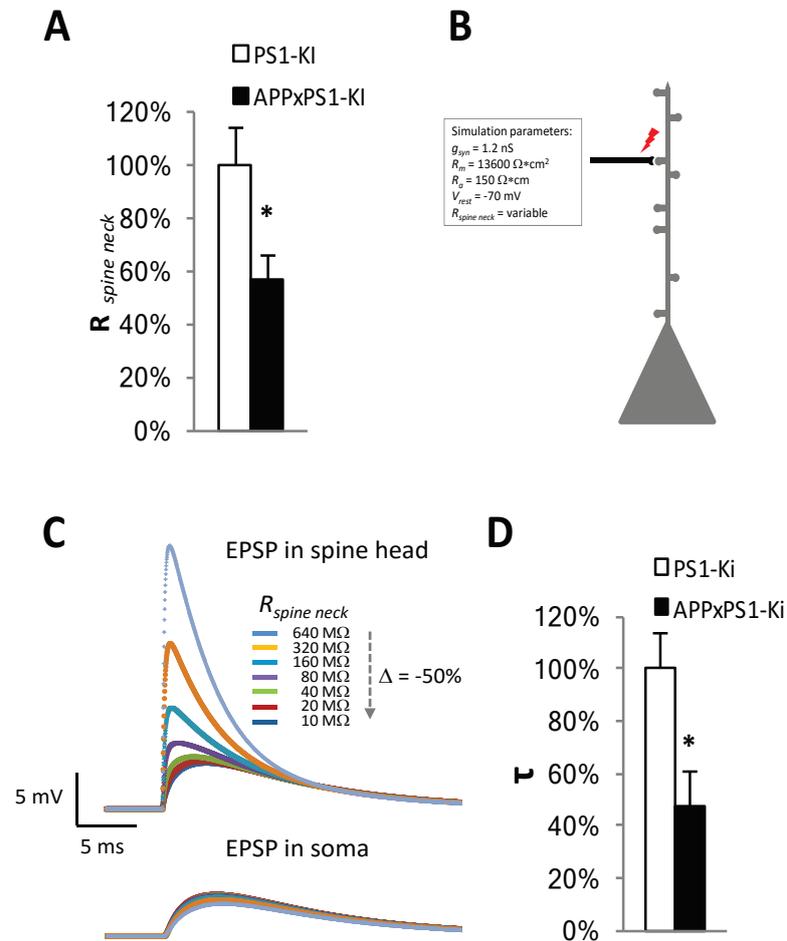


Figure 7. Simulation of the impact of the alteration of spine morphology on the electrical and biochemical compartmentalization of spines

A. Quantification (mean+SEM) of the electrical resistance of the spine neck ($R_{spine\ neck}$) at 3 months. B. Schematic of the NEURON model and simulation parameters. C. Simulation of the effect of 50% reductions in $R_{spine\ neck}$ on EPSPs in the spine head (upper traces) or in the soma (lower traces). Note that only EPSPs in spine heads are affected, and only for spines with a $R_{spine\ neck} > 80\text{M}\Omega$. D. Simulation indicating a 52% reduction in the time constant of diffusional equilibration of molecules across the spine neck in APPxPS1 KI mice.

The loss of spine heads and increase of neck diameters in APPxPS1-KI mice should alter the diffusion of molecules across the spine neck (Tønnesen and Nägerl, 2016). We estimated the

diffusional coupling between the spine head and the dendritic shaft:

$$\tau = \frac{VL}{DA}$$

where τ is the time constant of diffusional equilibration across the spine neck for a particular molecule, V is the volume of the spine head, L the length and A the cross-sectional area of the spine neck, and D the diffusion coefficient of the molecule (Tønnesen et al., 2014). For headless spines, the head volume was estimated using the diameter of the neck. There was a 52% reduction of the time constant in APPxPS1-KI mice (unpaired Student's t-test: $t(6)=2.8443$, $P=0.0294$; Fig. 7D), indicating a strong reduction of the biochemical compartmentalization of spines.

Discussion

We observed that the loss of CA1 pyramidal neurons previously described in APPxPS1-KI mice was preceded by a reduction in the density of synaptic profiles in the stratum radiatum. The decreased density of synaptic profiles was paralleled by an increase in size of the remaining PSDs. There was an increased phosphorylation of eIF2 α but decreasing it did not prevent the losses in APPxPS1-KI mice. Moreover, no synaptic depression nor increase of LTD were observed that could be responsible for the loss of synapses and neurons. However, a deficit of LTP and spatial memory was observed before the loss of synapses and neurons. An alteration of the morphology of dendritic spines was also observed at this early stage. There was a reduction of spine length and an increased diameter of spine necks. In biopsies from AD patient, an enlargement of spine neck was correlated to the loss of synapses. In mice, numerical simulation indicated that the increased spine neck diameter and ensuing drop in spine neck resistance were unlikely to alter significantly EPSPs in the cell body. Indeed, there was maintenance of fEPSPs, NMDA-dependent fEPSPs, and of the frequency and amplitude of miniature AMPA currents. Afferent volley slope and paired-pulse facilitation were also maintained. This enlargement induces a decrease in the biochemical compartmentalization of the spines. The change in the morphology of dendritic spines points to an alteration of their actin cytoskeleton, that could alter synapse plasticity and maintenance.

The APPxPS1-KI mice recapitulate several aspects of the synaptopathy observed in AD. The loss of CA1 pyramidal neurons was accompanied by a reduction in the density of synapses, similarly to the synapse loss described in AD (Davies et al., 1987; DeKosky and Scheff, 1990; Scheff and Price, 2003; Scheff et al., 2007; Selkoe, 2002; Terry et al., 1991). The enlargement of PSDs of the remaining spines observed in APPxPS1-KI mice was also analogous to what is observed in AD (Scheff and Price, 2003; Scheff et al., 2007). It could be due to a compensatory, “homeostatic” regulation of the size of PSDs (Horellou et al., 2014). Before synapse loss, there was an early reduction of spine length together with an enlargement of spine necks in APPxPS1-KI mice. An increase in the proportion of headless spines occurring before spine loss has been described in another APP transgenic mice (Pozueta et al., 2013). In single sections of biopsies from the frontal cortex of non-AD (n=5) and AD (n=3) patients, a significant negative correlation was observed between the density of synapses and the neck diameter. In two AD-cases, there was a decreased density of synapses, which was associated to an increased spine neck diameter. The loss of synapses was therefore accompanied by an alteration of spine morphology. Thus, APPxPS1 KI mice mimicked the

synaptopathy observed in AD with a reduction in synaptic density, an increase in size of the remaining PSDs, and an increase in the diameter of spine necks.

Several mechanisms that could be responsible for the loss of synapses and neurons in APPxPS1-KI mice have been studied here. In a prion disease mouse model, loss of synapses and neurons was mediated by an increase of the phosphorylation of eIF2 α (Moreno et al., 2012). Since an increased phosphorylation of eIF2 α was also described in APPxPS1-KI mice (Page et al., 2006), we tested its role in synapse and neuron loss. The same strategy that was used in the Prion disease model was efficient to decrease eIF2 α phosphorylation in APPxPS1-KI mice, but it did not prevent the loss of synapses and neurons. Thus, neurodegeneration in this prion mouse model and in APPxPS1-KI mice might not involve the same pathway. Moreover, LTD induces a shrinkage of the spines that are then eliminated (Wiegert and Oertner, 2013; Zhou et al., 2004), but we found no evidence for a decrease in basal synaptic transmission or an increase in LTD in APPxPS1-KI mice.

Rather, whilst a deficit in LTP was described at later stages in APPxPS1 KI mice (Breyhan et al., 2009), we observed that it was present before the reductions in neuronal and synaptic densities, along with memory alteration. LTP is dependent on calcium influx through NMDA receptors (Huganir and Nicoll, 2013). However, there was no reduction of the amplitude of NMDA-dependent fEPSPs. Similarly a recent study on another APP transgenic mouse line found no alteration of NMDA currents (Viana da Silva et al., 2016). The deficit in LTP was paralleled by an alteration of the morphology of dendritic spines. Long-term potentiation increases the diameter of spine necks (Tønnesen et al., 2014). Thus, the increased neck diameter in APPxPS1 KI mice is unlikely to be secondary to the deficit in LTP. Oppositely, the abnormal morphology of spines could reduce LTP. An enlargement of spine necks could potentially affect EPSPs and the diffusion of molecules (Tønnesen and Nägerl, 2016). Even though the simulation suggests that the observed changes in spine morphology are unlikely to substantially impair EPSPs in the cell body, they might substantially reduce EPSPs in the heads of spines that initially have a high neck resistance. It would counteract the depolarization required for the induction of synaptic plasticity. In addition to this electrical effect, the changes in spine morphology should increase the diffusional coupling of molecules between the spine head and the dendritic shaft. This reduced spine compartmentalization could alter LTP by modifying the diffusion of proteins activated downstream of the calcium influx through NMDA receptors (Alvarez and Sabatini, 2007; Nishiyama and Yasuda, 2015). Finally, the alteration at origin of the change in spine morphology could also be responsible

for the decreased LTP. The spine cytoskeleton is made of actin filaments (Fifková and Delay, 1982; Matus et al., 1982). The change in spine morphology in APPxPS1-KI mice therefore reveals an alteration of actin filament organization. Actin polymerization is essential for LTP, which is characterized by a rapid increase in size of spines (Kopec, 2006; Krucker et al., 2000; Tønnesen et al., 2014). An alteration of the actin cytoskeleton of spines could be detrimental to LTP, by disturbing the assembly of actin that normally follows the inducing stimuli. The mechanism of actin cytoskeleton alteration, its implication in modification of spine morphology and how the shortening of spines could eventually lead to the loss of synapses and neurons remains to be investigated.

Acknowledgments

We are grateful to Prof. Jean-François Foncin for having established a collection of biopsies taken during neurosurgery (Prof. Le Beau) and having provided it to us, and for critical reading of the manuscript. We thank Pascal Barneoud and Laurent Pradier from Sanofi for sharing the mice lines and for stimulating discussions. We also thank Patricia Bassereau for helpful discussions. Serge Marty and Alexandre Androuin were supported by a grant from France Alzheimer. The present work was also supported by funding from the program “Investissements d’avenir ANR-10-IAIHU-06”. Antoine Triller was supported by grants from France Alzheimer (Project R12035JJ), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-MNPS-013-01 and ANR-11-BSV8-021-01), the ERC advanced research grant ‘PlasItInhib’, the program “Investissements d’Avenir” (ANR-10-LABX-54 MEMO LIFE and ANR-11-IDEX-0001-02 PSL* Research University). We also thank the imaging facility of the IBENS, and the imaging facility icm.Quant of the ICM, particularly Dominique Langui and Asha Baskarun for the electron microscopy. This work was partly carried out on the vectorology and HISTOMICS platforms of the ICM and we thank all the staff involved. We also thank the biostatistics facility of the ICM and particularly François-Xavier Lejeune. All animal work was conducted at the ICM PHENOPARC Core Facility. We thank Nadège Sarrazin, Delphine Roussel and Joanna Drosbeke from the PHENO.ICMice for their help. The Core is supported by 2 “Investissements d’avenir” (ANR-10-IAIHU-06 and ANR-11-INBS-0011-NewATRIS) and the “Fondation pour la Recherche Médicale”.

References

- Alvarez, V.A., and Sabatini, B.L. (2007). Anatomical and Physiological Plasticity of Dendritic Spines. *Annu. Rev. Neurosci.* *30*, 79–97.
- Anderson, W.W., and Collingridge, G.L. (2001). The LTP Program: a data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and other synaptic events. *J. Neurosci. Methods* *108*, 71–83.
- Blanchard, V., Moussaoui, S., Czech, C., Touchet, N., Bonici, B., Planche, M., Canton, T., Jedidi, I., Gohin, M., Wirths, O., et al. (2003). Time sequence of maturation of dystrophic neurites associated with Abeta deposits in APP/PS1 transgenic mice. *Exp. Neurol.* *184*, 247–263.
- Breyhan, H., Wirths, O., Duan, K., Marcello, A., Rettig, J., and Bayer, T.A. (2009). APP/PS1KI bigenic mice develop early synaptic deficits and hippocampus atrophy. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *117*, 677–685.
- Casas, C., Sergeant, N., Itier, J.-M., Blanchard, V., Wirths, O., van der Kolk, N., Vingtroux, V., van de Steeg, E., Ret, G., Canton, T., et al. (2004). Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am. J. Pathol.* *165*, 1289–1300.
- Davies, C.A., Mann, D.M., Sumpter, P.Q., and Yates, P.O. (1987). A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* *78*, 151–164.
- DeKosky, S.T., and Scheff, S.W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* *27*, 457–464.
- Duyckaerts, C., Delatour, B., and Potier, M.-C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *118*, 5–36.
- Efron, B. (1987). Better Bootstrap Confidence Intervals. *J. Am. Stat. Assoc.* *82*, 171–185.
- Faure, A., Verret, L., Bozon, B., El Tannir El Tayara, N., Ly, M., Kober, F., Dhenain, M., Rampon, C., and Delatour, B. (2011). Impaired neurogenesis, neuronal loss, and brain functional deficits in the APPxPS1-Ki mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *32*, 407–418.
- Fiala, J.C. (2005). Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J. Microsc.* *218*, 52–61.
- Fiala, J.C., Spacek, J., and Harris, K.M. (2008). Chapter 1 : Dendrite structure. In *Dendrites*, Second Edition, G. Stuart, N. Spruston, and M. Häusser, eds. (Oxford University Press), pp. 1–40.
- Fifková, E., and Delay, R.J. (1982). Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J. Cell Biol.* *95*, 345–350.
- Gerakis, Y., and Hetz, C. (2017). Emerging roles of ER stress in the aetiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. *FEBS J.*

- Gundersen, H.J., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Møller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sørensen, F.B., and Vesterby, A. (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *96*, 379–394.
- el Hachimi, K.H., and Foncin, J.F. (1990). [Loss of dendritic spines in Alzheimer's disease]. *C. R. Acad. Sci. III* *311*, 397–402.
- el Hachimi, K.H., Verga, L., Giaccone, G., Tagliavini, F., Frangione, B., Bugiani, O., and Foncin, J.F. (1991). Relationship between non-fibrillary amyloid precursors and cell processes in the cortical neuropil of Alzheimer patients. *Neurosci. Lett.* *129*, 119–122.
- Harris, K.M., and Stevens, J.K. (1989). Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J. Neurosci.* *9*, 2982–2997.
- Harris, K.M., Jensen, F.E., and Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation [published erratum appears in *J Neurosci* 1992 Aug; 12 (8): following table of contents]. *J. Neurosci.* *12*, 2685–2705.
- Hines, M.L., and Carnevale, N.T. (1997). The NEURON simulation environment. *Neural Comput.* *9*, 1179–1209.
- Horellou, S., Pascual, O., Triller, A., and Marty, S. (2014). Adaptive and non-adaptive changes in activity-deprived presynaptic terminals. *Eur. J. Neurosci.* *39*, 61–71.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2006). AMPAR Removal Underlies A β -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron* *52*, 831–843.
- Huganir, R.L., and Nicoll, R.A. (2013). AMPARs and Synaptic Plasticity: The Last 25 Years. *Neuron* *80*, 704–717.
- Jacobsen, J.S., Wu, C.-C., Redwine, J.M., Comery, T.A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R., Morrison, J.H., Pangalos, M.N., Reinhart, P.H., et al. (2006). Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5161–5166.
- Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., et al. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* *488*, 96–99.
- Kopec, C.D. (2006). Glutamate Receptor Exocytosis and Spine Enlargement during Chemically Induced Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* *26*, 2000–2009.
- Kril, J., Patel, S., Harding, A., and Halliday, G. (2002). Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *103*, 370–376.
- Krucker, T., Siggins, G.R., and Halpain, S. (2000). Dynamic actin filaments are required for

stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 6856–6861.

Lanz, T., Carter, D., and Merchant, K. (2003). Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiol. Dis.* *13*, 246–253.

Matus, A., Ackermann, M., Pehling, G., Byers, H.R., and Fujiwara, K. (1982). High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *79*, 7590–7594.

Merino-Serrais, P., Knafo, S., Alonso-Nanclares, L., Feraud-Espinosa, I., and DeFelipe, J. (2011). Layer-specific alterations to CA1 dendritic spines in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus* *21*, 1037–1044.

Moolman, D.L., Vitolo, O.V., Vonsattel, J.-P.G., and Shelanski, M.L. (2004). Dendrite and dendritic spine alterations in Alzheimer models. *J. Neurocytol.* *33*, 377–387.

Moreno, J.A., Radford, H., Peretti, D., Steinert, J.R., Verity, N., Martin, M.G., Halliday, M., Morgan, J., Dinsdale, D., Ortori, C.A., et al. (2012). Sustained translational repression by eIF2 α -P mediates prion neurodegeneration. *Nature*.

Nishiyama, J., and Yasuda, R. (2015). Biochemical Computation for Spine Structural Plasticity. *Neuron* *87*, 63–75.

Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., and Ron, D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α . *J. Cell Biol.* *153*, 1011–1022.

Page, G., Rioux Bilan, A., Ingrand, S., Lafay-Chebassier, C., Pain, S., Perault Pochat, M.C., Bouras, C., Bayer, T., and Hugon, J. (2006). Activated double-stranded RNA-dependent protein kinase and neuronal death in models of Alzheimer's disease. *Neuroscience* *139*, 1343–1354.

Peters, A., Palay, S.L., and Webster, H. deF (1991). *The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells* (New York: Oxford Univ. Press).

Potier, B., Billard, J.-M., Rivière, S., Sinet, P.-M., Denis, I., Champeil-Potokar, G., Grinval, B., Jouvenceau, A., Kollen, M., and Dutar, P. (2010). Reduction in glutamate uptake is associated with extrasynaptic NMDA and metabotropic glutamate receptor activation at the hippocampal CA1 synapse of aged rats: Synaptic effects of reduced glutamate uptake in the aged rat hippocampus. *Aging Cell* *9*, 722–735.

Pozueta, J., Lefort, R., Ribe, E.M., Troy, C.M., Arancio, O., and Shelanski, M. (2013). Caspase-2 is required for dendritic spine and behavioural alterations in J20 APP transgenic mice. *Nat. Commun.* *4*.

Rasband, W. (1997). ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

Scheff, S., and Price (2003). Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol. Aging* *24*, 1029–1046.

- Scheff, S.W., Price, D.A., Schmitt, F.A., DeKosky, S.T., and Mufson, E.J. (2007). Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 68, 1501–1508.
- Selkoe, D.J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298, 789–791.
- Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* 8, 595–608.
- Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., and Sabatini, B.L. (2007). Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *J. Neurosci.* 27, 2866–2875.
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375, 754–760.
- Spires, T.L., Meyer-Luehmann, M., Stern, E.A., McLean, P.J., Skoch, J., Nguyen, P.T., Bacskai, B.J., and Hyman, B.T. (2005). Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 7278–7287.
- Tackenberg, C., and Brandt, R. (2009). Divergent Pathways Mediate Spine Alterations and Cell Death Induced by Amyloid- , Wild-Type Tau, and R406W Tau. *J. Neurosci.* 29, 14439–14450.
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., and Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30, 572–580.
- Tønnesen, J., and Nägerl, U.V. (2016). Dendritic Spines as Tunable Regulators of Synaptic Signals. *Front. Psychiatry* 7.
- Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B., and Nägerl, U.V. (2014). Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nat. Neurosci.* 17, 678–685.
- Viana da Silva, S., Haberl, M.G., Zhang, P., Bethge, P., Lemos, C., Gonçalves, N., Gorlewicz, A., Malezieux, M., Gonçalves, F.Q., Grosjean, N., et al. (2016). Early synaptic deficits in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease involve neuronal adenosine A2A receptors. *Nat. Commun.* 7, 11915.
- West, M.J., Coleman, P.D., Flood, D.G., and Troncoso, J.C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Lond. Engl.* 344, 769–772.
- Wiegert, J.S., and Oertner, T.G. (2013). Long-term depression triggers the selective elimination of weakly integrated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E4510–E4519.
- Wirhth, O., Breyhan, H., Schäfer, S., Roth, C., and Bayer, T.A. (2008). Deficits in working memory and motor performance in the APP/PS1ki mouse model for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 29, 891–901.

Zhou, Q., Homma, K.J., and Poo, M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44, 749–757.

Zou, C., Montagna, E., Shi, Y., Peters, F., Blazquez-Llorca, L., Shi, S., Filser, S., Dorostkar, M.M., and Herms, J. (2015). Intraneuronal APP and extracellular A β independently cause dendritic spine pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 909–920.

II. Altérations lysosomales chez les souris APPxPS1-KI et chez les patients atteints de Maladie d'Alzheimer

Des pertes de neurones importantes sont observées dans les souris exprimant à la fois un transgène APP et un transgène ou un Knock-In PS1 (Casas et al., 2004; Oakley et al., 2006). Les neurones qui dégèrent chez ces souris ont pour point commun l'accumulation d'A β intracellulaire (Casas et al., 2004; Mucke et al., 2000; Oakley et al., 2006). La perte de neurones ne corrèle pas avec les dépôts extracellulaires d'A β mais est associée à l'accumulation d'A β intracellulaire (Christensen et al., 2008; Schmitz et al., 2004). L'accumulation d'A β intracellulaire semble précéder la formation des plaques amyloïdes (Oddo et al., 2006b; Wirths et al., 2001). Afin de tester l'implication de l'accumulation d'A β intracellulaire dans les pertes de neurones et de synapses dans les souris APPxPS1-KI, des stratégies visant à son élimination doivent être développées. L'identification de la localisation subcellulaire de l'accumulation d'A β est primordiale au développement de telles stratégies. Deux localisations avaient été proposées dans la littérature pour l'accumulation intracellulaire d'A β : à l'intérieur des corps multivésiculaires (Takahashi et al., 2002) ou dans des granules de lipofuscine qui correspondent à des dérivés des lysosomes (Baner et al., 1989). L'objectif principal de cette étude préliminaire était d'identifier le site intracellulaire d'accumulation d'A β chez les souris APPxPS1-KI. Nous avons de plus analysé les altérations des organelles concernés, à savoir les lysosomes.

II. 1. Matériels et méthodes

Localisation des accumulations intracellulaires d'A β par immunocytochimie post-enrobage

Des souris PS1-KI de 4 mois (n=2) et des souris APPxPS-KI de 3 mois (n=1), 4 mois (n=2) et 6 mois (n=1) (Casas et al., 2004) ont reçu une surdose de pentobarbital sodique (120 mg/kg) et ont été perfusées de façon intracardiaque avec du PB contenant 4% de paraformaldéhyde et 0,1% de glutaraldéhyde. Après 1 heure à 4°C, les cerveaux ont été extraits et post-fixés la nuit à 4°C dans une solution de paraformaldéhyde à 4%. Des coupes frontales de 200 μ m d'épaisseur ont été réalisées avec un vibratome dans du PBS.

Des coupes localisées au milieu de l'hippocampe dorsal ont été incluses dans une solution de lowicryl grâce à l'appareil Leica AFS. Les coupes sont rincées avec du PBS. Pendant que la température descend jusqu'à -20°C (24°/heure), elles sont progressivement transférées dans des solutions de méthanol à 30% puis 50% (la dernière contenant 0,5% d'acétate d'uranyle). Les coupes sont rincées dans du méthanol à 50% (15 minutes) et déshydratées par des bains de méthanol de concentration croissante pendant que la température descend jusqu'à -45°C avec une vitesse de 15°C/heure. Les coupes sont ensuite infiltrées avec du Lowicryl HM20 (Polysciences, Inc Warrington, PA, USA) et la résine est polymérisée sous l'exposition d'une lumière UV pendant 48 heures.

Des coupes ultrafines de 70nm sont ensuite réalisées, et collectées sur des grilles en Nickel couvertes d'un film de Formwar.

Comme décrit précédemment (Horellou et al. 2014), les coupes sont incubées pendant 30 minutes dans une solution de blocage (905.002, Aurion, Wageningen). Après 3 rinçages de 5 min dans une solution tampon de 0,2% BSA-c (900.099, Aurion) dans du PBS, les coupes sont incubées toute la nuit dans un tampon d'incubation contenant l'anticorps dirigé contre les peptides contenant de l'A β (anticorps monoclonal 4G8, Covance SIG-39240-200, 1 :250). Après 4 rinçages de 5 min dans le tampon d'incubation, les coupes sont incubées pendant 2 heures à température ambiante avec un anticorps secondaire dirigés contre les IgG de souris conjugué à des billes d'or de 10nm (1:50, BritishBiocell International, Cardiff, UK). L'omission de l'anticorps primaire n'a donné aucun marquage. Les coupes sont rincées deux fois dans le tampon d'incubation, deux fois dans du PBS, suivie d'une solution de fixation de

glutaraldéhyde à 1% dans du PBS pendant 5 min. Les coupes sont rincées une fois dans du PBS et une fois dans de l'eau distillée avant d'être séchées. Elles sont ensuite contrastées 10 minutes avec de l'acétate d'uranyle à 5% filtré et 10 minutes avec du citrate de Plomb à 3%.

Analyse de la morphologie des lysosomes en microscopie électronique

Pour analyser les lysosomes en microscopie électronique, les coupes utilisées dans l'article ont été analysées au niveau des corps cellulaires neuronaux, soit dans la couche pyramidale de la région CA1 de l'hippocampe pour les modèles murins de la Maladie d'Alzheimer, soit dans les couches II et III du cortex frontal pour les biopsies de patients.

Le nombre de lysosomes tertiaires (pour les neurones murins) ou de granules de lipofuscine (pour les neurones humains) par profil neuronal a été compté. A noter que la biopsie de patient non-Alzheimer qui avait 38 ans a été retirée des analyses pour que les patients contrôles et atteints de Maladie d'Alzheimer aient le même âge en moyenne (60 ans). Une moyenne de 70 neurones (30 à 129 neurones) par souris et 24 neurones (17 à 43 neurones) par biopsie ont été analysés. La surface des lysosomes tertiaires et des granules de lipofuscine a également été mesurée grâce au logiciel ImageJ.

Immunohistochimie de la Cathepsine B

Pour étudier les lysosomes en microscopie optique, des immunomarquages ont été réalisés sur des coupes flottantes de 40 μm d'épaisseur de souris PS1-KI et APPxPS1-KI à 6 mois (n=3 par génotype) et de 50 μm d'épaisseur pour des souris WT et APP à 6 mois (n=6 par génotype), suivant le protocole décrit dans l'article précédent. L'anticorps utilisé est dirigé contre la Cathepsine B (Calbiochem PC41, 1 :100).

Après immunomarquage avec les anticorps anti-cathepsine B, des photographies de la couche de cellules pyramidales ont été prises au milieu du champ CA1 de l'hippocampe dorsal, sur 2-3 coupes par cas, grâce au microscope Zeiss A1 scope à l'objectif x63. La densité et l'aire moyenne des spots positifs pour la cathepsine B ont été quantifiées en utilisant le plugin « spot detector » du logiciel ICY. Les histogrammes montrent des valeurs normalisées par les souris WT.

Analyses statistiques

Des comparaisons entre groupes, en utilisant un test t de Student bilatéral et non apparié, sont considérées comme montrant une différence significative pour une valeur de $p < 0,05$. Des comparaisons entre plus de deux groupes sont réalisées par Analyse de variance à un facteur

(ANOVA) suivie d'un test post-hoc de Tukey. Les analyses ont été faites grâce au logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

II. 2. Résultats

Accumulation d'A β dans des organelles élargies dans les neurones des souris APPxPS1-KI

Afin de localiser les sites d'accumulation de l'A β dans les neurones des souris APPxPS1-KI, un immunomarquage couplé à des billes d'or et utilisant l'anticorps 4G8 dirigé contre les peptides contenant la séquence A β a été effectué et analysé en microscopie électronique (ME). Dans les corps cellulaires des neurones pyramidaux du champ CA1 de l'hippocampe, une accumulation de peptides contenant de l'A β est observée dans des organelles présentant une matrice sombre avec des gouttelettes claires de taille et de morphologie hétérogènes (Fig. 27A, C). Nous n'observons pas cette accumulation dans les organelles équivalentes chez les souris PS1-KI (Fig. 27B). Les peptides contenant la séquence A β sont organisés sous forme de fibrilles (Fig. 27A, C). De telles fibrilles ne sont pas observées chez les souris PS1-KI. Les accumulations d'A β dans ces organelles peuvent occuper une surface importante entraînant un élargissement des organelles qui peuvent présenter une morphologie irrégulière (Fig. 27C). La matrice sombre et la présence de gouttelettes de tailles très variées permet d'identifier ces organelles comme étant des lysosomes.

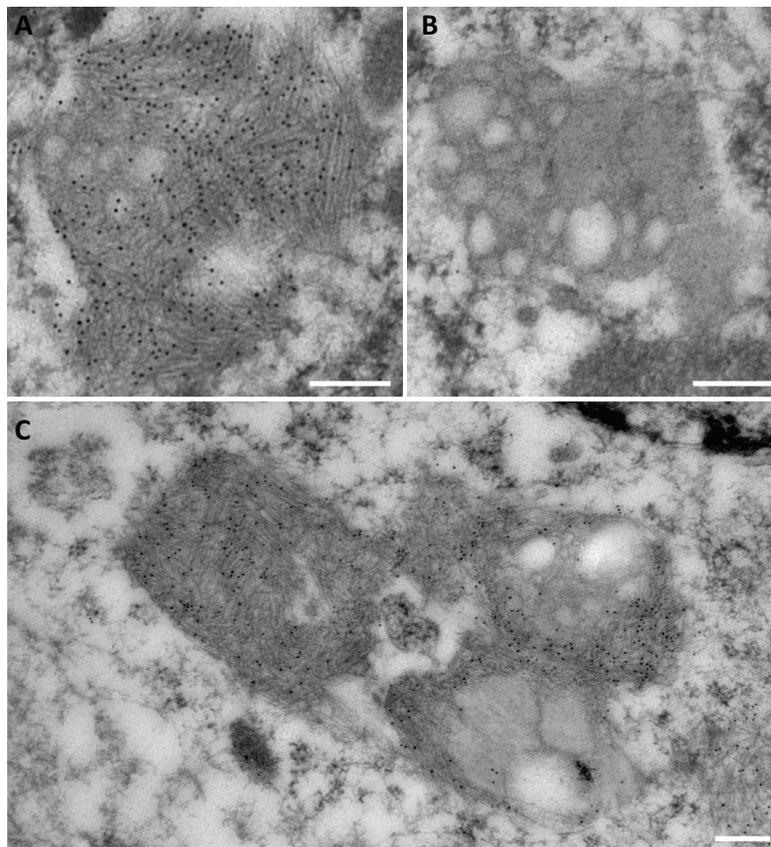


Figure 27. Accumulation d'Aβ dans des organelles élargies de souris APPxPS1-KI

A, B, C. Immunomarquage couplé à des billes d'or de 10nm utilisant l'anticorps 4G8 dirigé contre le peptide Aβ dans le corps cellulaire de neurones de la couche de cellules pyramidales du champ CA1 de l'hippocampe dans les souris APPxPS1-Ki (A, C) et PS1-KI (B). Notez l'accumulation de peptide contenant de l'Aβ dans des organelles avec une matrice sombre et des gouttelettes claires hétérogènes en taille (A, C). Cette accumulation n'est pas observée chez les souris PS1-KI (B). Ces accumulations peuvent occuper une surface importante, entraînant un élargissement des organelles (C). Barre d'échelle en A-C: 200 nm.

Altération des lysosomes dans les souris APPxPS1-KI

Afin de vérifier la nature lysosomale des organelles accumulant de l'Aβ, une étude morphologique a été réalisée en microscopie électronique classique. Les lysosomes ont été classés en différentes catégories suivant leur morphologie en ME (Sekhon and Maxwell, 1974). Les lysosomes dits « primaires » sont des organelles de petite taille, avec des contours nets et réguliers, qui peuvent avoir un fond sombre ou clair (flèches pleines, Fig. 28A, B). Les lysosomes dits « secondaires » se caractérisent par une taille plus importante, la présence de gouttelettes lipidiques et un fond plus ou moins dense contenant des inclusions membranaires par exemple (Fig. 28C, D). Enfin, dans les souris APPxPS1-KI, on observe des lysosomes dits « tertiaires » se caractérisant par une augmentation importante de la taille, des contours moins nets, une forme irrégulière et un fond assez dense (Fig. 28E, F). Quelquefois, des images d'autophagie autour de ces lysosomes tertiaires sont observées (Fig. 28G). Ces lysosomes tertiaires s'accumulent dans 15 à 20 % des neurones des souris APPxPS1-KI. Contrairement aux souris APPxPS1-KI, seulement quelques neurones contiennent ces inclusions dans les souris transgéniques APP et aucun dans les souris PS1-KI (Fig. 28H). Ainsi, l'accumulation de ces lysosomes tertiaires est spécifique des souris APPxPS1-KI. Ces inclusions occupent une surface de $1 \mu\text{m}^2$ en moyenne dans les neurones des souris APPxPS1-KI (Fig. 28I).

Les lysosomes tertiaires qui apparaissent chez les souris APPxPS1-KI peuvent être différenciés des corps multivésiculaires qui présentent un fond clair et des vésicules homogènes (Flèche en pointillé dans Fig. 28B). Ces lysosomes tertiaires présentent une accumulation d'inclusion fibrillaire (astérisque, Fig. 28E, F). Les immunomarquages précédant montraient une accumulation d'Aβ dans des organelles avec une matrice sombre et des gouttelettes de taille hétérogène (Fig. 27), correspondant à des caractéristiques morphologiques semblables aux lysosomes tertiaires (Fig. 28E, F). De plus, l'accumulation

de peptide $A\beta$ était observée sous forme de fibrilles. Ces observations croisées permettent de confirmer que l' $A\beta$ s'accumule sous forme de fibrilles dans des lysosomes qui sont alors élargis.

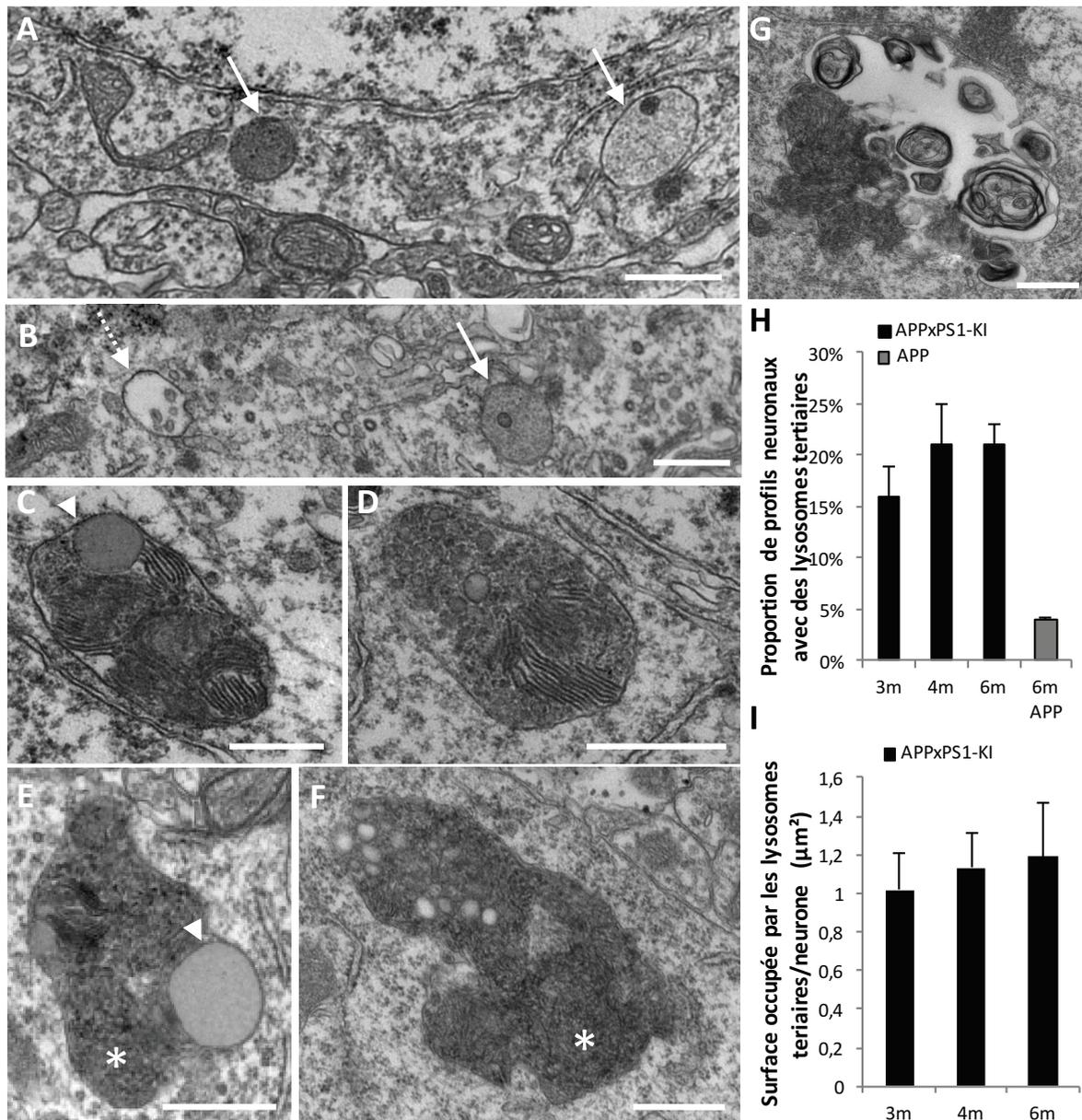


Figure 28. Présence d'inclusions fibrillaires dans les lysosomes tertiaires de souris APPxPS1-KI

A-F. Exemples de lysosomes à différents stades dans le corps cellulaire de neurones de la couche de cellules pyramidales du champ CA1 de l'hippocampe dans les souris PS1-Ki (A-D) et APPxPS1-KI (E-F). La taille, la morphologie et la densité du fond de ces organelles permettent de différencier les lysosomes primaires (flèches pleines, A, B), les lysosomes secondaires (C, D) et les lysosomes tertiaires (E, F). Notons que les corps multivésiculaires

(flèche en pointillée, B) présentent une morphologie différente de celle des lysosomes (flèche pleine, B). Les têtes de flèches montrent une gouttelette lipidique (C, E). Notons que les lysosomes tertiaires présentent une accumulation d'inclusions fibrillaires (astérisque, E, F).

G. Exemple d'autophagie au bord d'un lysosome tertiaire.

H. Quantification (moyenne+SEM) de la proportion de profils neuronaux contenant des lysosomes tertiaires avec des inclusions fibrillaires. Notons l'accumulation spécifique de ces inclusions fibrillaires dans les souris APPxPS1-KI.

I. Quantification (moyenne+SEM) de la surface occupée par les lysosomes tertiaires contenant des inclusions fibrillaires par neurones dans les souris APPxPS1-KI. Barre d'échelle en A-G: 500 nm.

Modification du nombre de lysosomes spécifiquement dans les souris APPxPS1-KI

L'accumulation d'inclusions fibrillaires dans les lysosomes tertiaires dans les souris APPxPS1-KI indique une altération des lysosomes. Nous avons étudié cette altération en microscopie optique. Les lysosomes ont été marqués avec un anticorps dirigé contre la cathepsine B, une protéase spécifique des lysosomes, et étudiés en microscopie optique (Fig. 29A, B). Les souris APPxPS1-KI présentent une diminution significative de la densité des lysosomes immunoréactifs pour la cathepsine B (ANOVA, test post-hoc de Tukey significatif pour les comparaisons APPxPS1-KI vs WT et vs PS1-KI, Fig. 29C) avec une augmentation significative de leur surface moyenne (ANOVA, test post-hoc de Tukey significatif pour les comparaisons APPxPS1-KI vs WT et vs PS1-KI, Fig. 29D). Aucune modification de la densité (Fig. 29E) ou de la surface moyenne (Fig. 29F) des lysosomes n'est observée dans les souris transgéniques APP qui ne développent aucune perte de neurones ou de synapses. Ainsi, les altérations du système lysosomal sont spécifiquement observées dans les souris APPxPS1-KI.

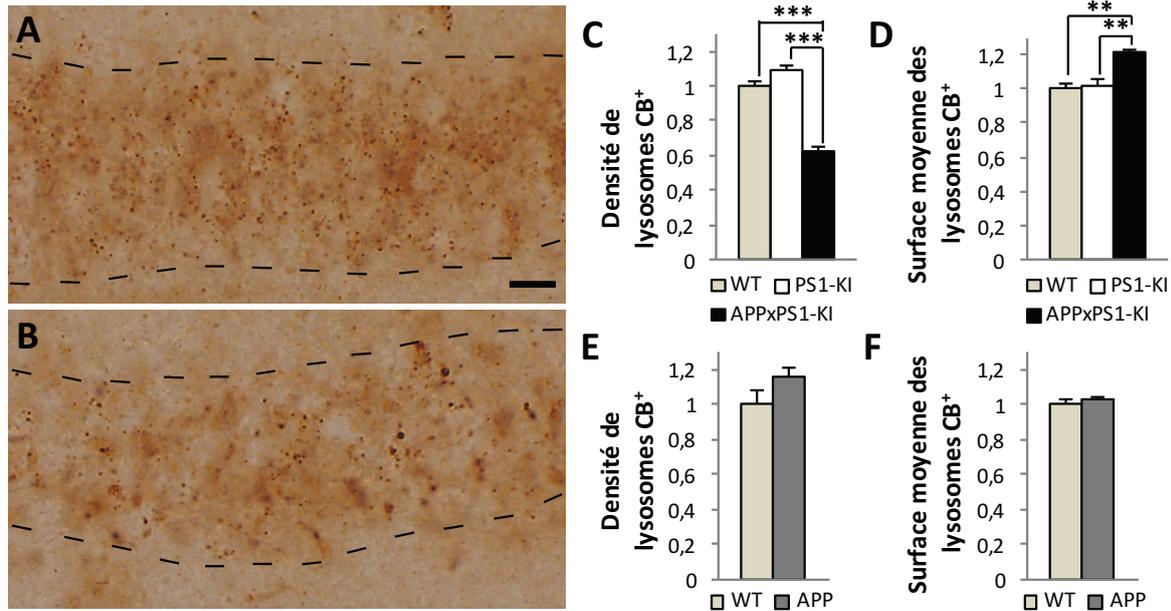


Figure 29. Altération des lysosomes spécifiquement dans les souris APPxPS1-KI

A, B. Immunohistochimie à l'aide d'anticorps dirigés contre la Cathepsine-B (CB) dans la couche de cellules pyramidales du champ CA1 de l'hippocampe (délimitée par des pointillés) dans les souris PS1-KI (A) et APPxPS1-KI (B).

C, D. Quantification (moyenne+SEM) de la densité (C) et de la surface moyenne (D) des lysosomes immunoréactifs pour la Cathepsine-B (CB⁺) dans la couche de cellules pyramidales du champ CA1 de l'hippocampe de souris WT, PS1-KI et APPxPS1-KI à 6 mois.

E, F. Quantification (moyenne+SEM) de la densité (E) et de la surface moyenne (F) des lysosomes CB⁺ dans la couche de cellules pyramidales du champ CA1 de l'hippocampe dans les souris WT et transgéniques APP à 6 mois. Les histogrammes (C, D, E, F) montrent des moyennes normalisées par rapport aux souris WT. Notons la diminution de la densité de lysosomes CB⁺ accompagnées d'une augmentation de leur surface moyenne de façon spécifique dans les souris APPxPS1-KI. Barre d'échelle en A: 10 µm pour A et B. Différence entre les génotypes, **: p<0.01, ***: p<0.001.

Accumulation de granules de lipofuscine dans les biopsies de patients atteints de Maladie d'Alzheimer

Pour étudier la pertinence dans la pathologie humaine des altérations du système lysosomal observées dans les souris APPxPS1-KI, nous avons analysé les corps cellulaires des neurones dans les biopsies de patients. La morphologie des corps cellulaires dans ces biopsies est très bien conservée, permettant l'identification des neurones et l'analyse de leurs organelles (Fig. 30A, B). Nous observons dans ces neurones des granules de lipofuscine, qui sont des organelles sombres au contour irrégulier et contenant des gouttelettes lipidiques de tailles variées (Fig. 30A-D). Ces granules de lipofuscine sont donc similaires aux lysosomes tertiaires décrits chez les souris APPxPS1-KI (Fig. 29E, F). Une augmentation significative du

nombre (test t de Student non apparié : $t(5)= 4.638$, $P= 0.0056$; Fig. 30E) et de la surface (test t de Student non apparié : $t(5)= 4.491$, $P= 0.0065$; Fig. 30F) de ces granules de lipofuscine par neurone est observée dans les biopsies de patients atteints de Maladie d'Alzheimer. Ainsi, comme dans les souris APPxPS1-KI, nous observons dans les neurones des patients atteints de Maladie d'Alzheimer l'accumulation d'organelles dérivées des lysosomes.

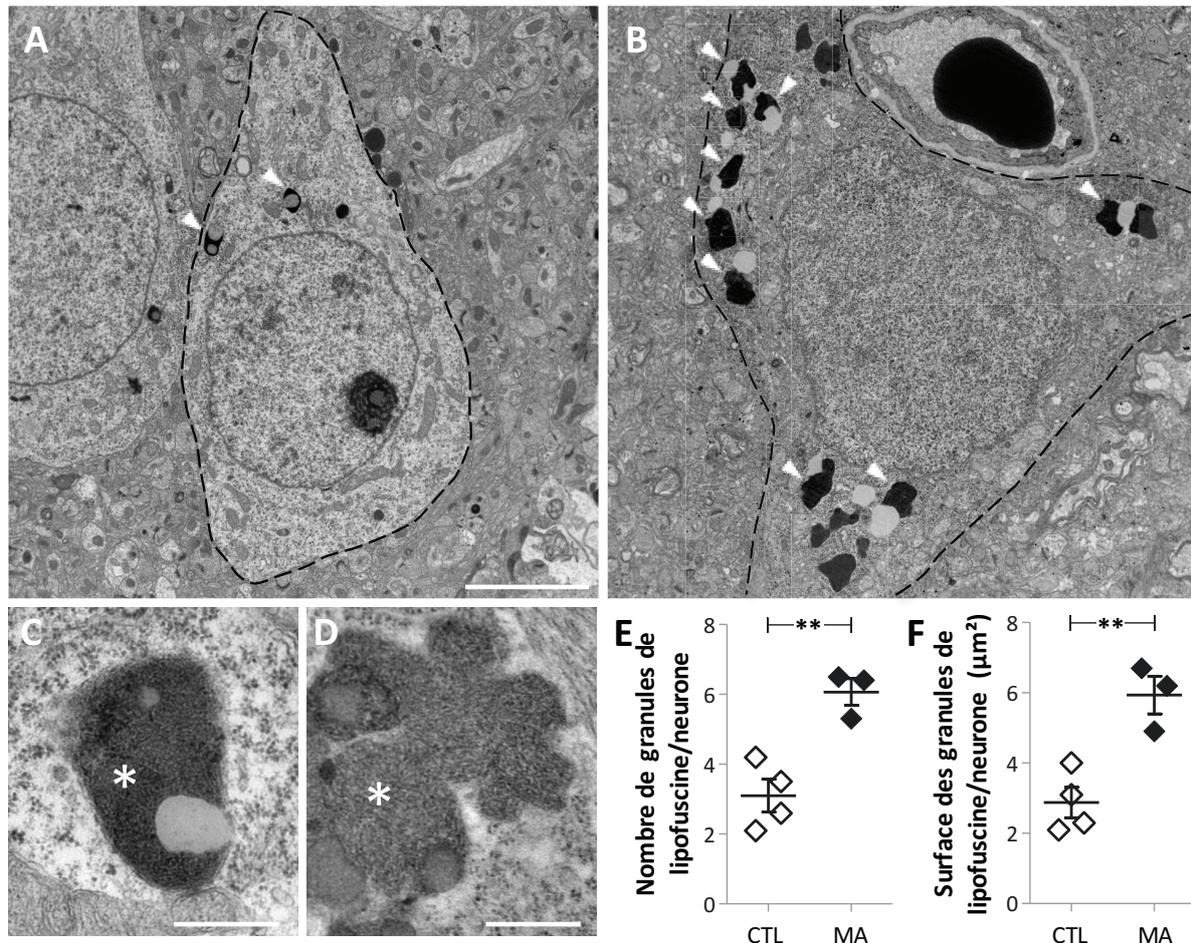


Figure 30. Accumulation de granules de lipofuscine dans les biopsies de patients atteints de Maladie d'Alzheimer

A, B. Exemple de corps cellulaires de neurones dans le cortex frontal de biopsies de patients contrôles (A) et atteints de Maladie d'Alzheimer (B). Les têtes de flèches montrent des lysosomes tertiaires.

C, D. Exemples de lysosomes tertiaires dans les biopsies de patients contrôles (C) et atteints de Maladie d'Alzheimer (D). Des inclusions fibrillaires sont visibles dans ces lysosomes tertiaires (astérisques, C, D).

E, F. Quantification (moyenne+SEM) du nombre de lysosomes tertiaires (E) et de leur surface (F) par neurones. Notons l'augmentation significative du nombre et de la surface occupée par les lysosomes tertiaires dans les biopsies de patients atteints de Maladie d'Alzheimer. Barre d'échelle en A: 5 µm pour A et B. Barre d'échelle en C et D : 500 nm. Différence entre les génotypes, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$.

Cette étude montre que des peptides contenant la séquence A β s'accumulent dans les lysosomes chez les souris APPxPS1-KI. En parallèle, les lysosomes sont altérés chez ces souris, avec une diminution de leur nombre et une augmentation de leur surface. Dans les biopsies issues de patients atteints de Maladie d'Alzheimer, on observe une accumulation de granules de lipofuscine. Ces résultats indiquent qu'un dysfonctionnement lysosomal pourrait être à l'origine des pertes de synapses et de neurones.

DISCUSSION

DISCUSSION

La Maladie d'Alzheimer se caractérise par une perte progressive de synapses et de neurones. La perte de synapses est un marqueur précoce, précédant la perte de neurones, et qui corrèle de façon très significative avec le déclin cognitif des patients (Davies et al., 1987; Terry et al., 1991). Elle s'accompagne d'une augmentation de la surface d'apposition des synapses restantes (DeKosky and Scheff, 1990; Scheff et al., 2007). Cependant, comment le peptide amyloïde peut induire ces pertes est toujours sujet à débat. Nous avons étudié le mécanisme de ces altérations dans un modèle murin de Maladie d'Alzheimer. Les souris APPxPS1-KI surexpriment un transgène humain APP avec deux mutations familiales, associé à deux mutations knock-in dans le gène de la PS1, responsables d'une accumulation d'A β accélérée (Casas et al., 2004). Ces souris ont la particularité de développer une perte progressive de neurones dans le champ CA1 de l'hippocampe, à partir de 6 mois (Breyhan et al., 2009) et de façon encore plus importante à 10 mois (Casas et al., 2004). Nous avons retrouvé cette perte de neurones à 6 mois dans le champ CA1 de l'hippocampe des souris APPxPS1-KI et montré qu'elle était précédée d'une perte de synapses dès l'âge de 4 mois dans la stratum radiatum du champ CA1 de l'hippocampe. Une diminution des niveaux de marqueurs pré- et post-synaptiques avait été observée dans ces souris, seulement par western blot sur des extraits totaux de cerveau ou de fractions enrichies de synaptosomes et à l'âge de 6 mois (Breyhan et al., 2009). Nous avons également observé que la perte de synapses dans ce modèle s'accompagne d'un élargissement des densités post-synaptiques comme chez les patients atteints de Maladie d'Alzheimer. Ces observations suggèrent que le modèle APPxPS1-KI présente différents aspects des altérations synaptiques observées chez les patients et constitue donc un modèle d'étude pour identifier le mécanisme des pertes de neurones et de synapses.

Comparées aux souris simple transgéniques APP, les souris APPxPS1-KI présentent une accumulation d'A β accélérée et plus importante (Casas et al., 2004). Comme observé précédemment, nous n'avons pas retrouvé de perte de neurones dans les souris simple transgénique APP (Casas et al., 2004), ni de perte de synapses. Les souris PS1-KI quant à elles ne présentent pas d'accumulation d'A β et ne développent pas de pertes de neurones (Casas et al., 2004). Il semblerait donc que ce soit l'association du transgène APP et des mutations knock-in sur le gène PS1 qui soit nécessaire à l'induction d'une perte de neurones et de synapses. C'est pourquoi, au cours de cette thèse, nous avons comparé les modèles

murins APP et APPxPS1-KI pour tenter d'identifier les altérations spécifiques qui pourraient être responsables des pertes de neurones et de synapses.

En outre, l'étude de biopsies de patients, dont la morphologie des neurones est très bien conservée, nous a permis de vérifier la pertinence chez l'homme des altérations retrouvées dans les modèles murins. Plusieurs hypothèses de mécanismes sous-tendant la perte de neurones et de synapses ont ainsi pu être étudiées.

I. Absence d'implication du stress du réticulum endoplasmique

Chez les patients atteints de Maladie d'Alzheimer, une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α , de PKR ou de PERK est observée dans les neurones (Chang et al., 2002a; Hoozemans et al., 2005; Stutzbach et al., 2013; Unterberger et al., 2006), ce qui est le synonyme d'un stress du réticulum endoplasmique. La diminution de la traduction des protéines induite par le stress du RE est responsable de la perte de neurones et de synapses dans un modèle murin de maladie à prions, et la diminution de la phosphorylation d'eIF2 α permet de prévenir ces pertes (Moreno et al., 2012, 2013). Une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α a déjà été observé dans les souris APPxPS1-KI par western blot sur des lysats de cerveau entier (Page et al., 2006). Nous avons vérifié l'augmentation de phosphorylation d'eIF2 α dans la couche pyramidale des neurones du champ CA1 de l'hippocampe par immunohistochimie et utilisé la même stratégie que celle décrite dans le modèle de maladie à prions (transduction des neurones par un lentivirus exprimant une phosphatase spécifique) afin de diminuer la phosphorylation d'eIF2 α spécifiquement dans cette région. La diminution de phosphorylation d'eIF2 α dans la couche pyramidale du champ CA1 de l'hippocampe ne permet pas de prévenir la perte de neurones et de synapses dans les souris APPxPS1-KI.

Ces résultats soulèvent la question de la méthodologie utilisée, notamment l'âge d'injection. Les souris APPxPS1-KI ont un phénotype dit « agressif », avec une perte de synapses et de neurones précoce et une accumulation très importante d'A β en comparaison d'autres modèles murins. Le processus neurodégénératif pourrait avoir déjà débuté à l'âge

auquel sont injectées les souris (4 mois) puisqu'une perte de synapse est déjà observée à cet âge. Cependant, la phosphorylation d'eIF2 α est augmentée avec la même intensité dans les souris simple transgénique APP, qui ne développent pas de pertes de neurones et de synapses. L'augmentation de phosphorylation d'eIF2 α n'est pas spécifique aux souris APPxPS1-KI et ne semble donc pas être le phénomène causal des pertes de neurones et de synapses. Ainsi, il est tout à fait probable que des injections plus précoces n'auraient pas suffi à prévenir les pertes de neurones et de synapses.

La prévention des pertes de neurones par la réduction de la phosphorylation d'eIF2 α n'a été observé que dans des modèles de maladie à prions et de démence frontotemporale (Moreno et al., 2012, 2013; Radford et al., 2015). Nos résultats suggèrent que le stress du réticulum endoplasmique n'est pas un mécanisme commun des pertes de neurones et de synapses dans tous les modèles de maladies neurodégénératives. Récemment, d'autres résultats ont soulevé la question de l'implication du stress du RE dans la physiopathogénie de modèles murins de la Maladie d'Alzheimer (Briggs et al., 2017; Johnson and Kang, 2016). Ces études utilisent un inhibiteur de la réponse intégrée au stress (Pakos- Zebucka et al., 2016), qui diminue le stress du RE et l'inhibition de la traduction des protéines médiée par la phosphorylation d'eIF2 α (Sidrauski et al., 2015a, 2015b). Ce composé permet de prévenir la perte de neurones dans l'hippocampe de souris modèle de maladie à prions (Halliday et al., 2015) et améliore l'apprentissage et la mémoire dans des souris sauvages (Sidrauski et al., 2013). Cependant, dans des souris modèles de tauopathie (PS19) ou de Maladie d'Alzheimer (APP^{swe}, J20), cette molécule n'induit aucune amélioration du comportement, de l'apprentissage ou de la mémoire (Briggs et al., 2017; Johnson and Kang, 2016). Il faut tout de même noter que ces trois derniers modèles ne semblent pas présenter d'augmentation du stress du RE et que les effets bénéfiques du traitement obtenus sur les souris sauvages ne sont pas retrouvés dans les modèles de Maladie d'Alzheimer.

Le mécanisme précis d'activation du stress du RE dans les neurones au cours de la Maladie d'Alzheimer ou d'autres maladies neurodégénératives reste encore inconnu. Dans ces maladies, les protéines qui s'agrègent ne s'accumulent généralement pas dans le réticulum endoplasmique et, pour beaucoup d'entre elles, n'entrent jamais dans le RE (Halliday and Mallucci, 2015; Scheper and Hoozemans, 2015). L'activation du stress du RE doit sans doute être indirecte. Par exemple, dans un modèle de démence frontotemporale, l'accumulation de la protéine tau altère le fonctionnement du système de dégradation associé au réticulum

endoplasmique (ERAD), entraînant secondairement une activation de l'UPR (« unfolded protein response ») (Abisambra et al., 2013). De plus, les oligomères d'A β peuvent induire la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique, altérant l'homéostasie du calcium dans le RE, ce qui est une cause d'activation de l'UPR (Scheper and Hoozemans, 2015; Suen et al., 2003). Enfin, Lourenco et al. ont observé que PKR n'était pas activée directement par les oligomères d'A β , ces derniers induisant plutôt une augmentation de TNF- α qui à son tour active la voie PKR/eIF2 α (Lourenco et al., 2013). Enfin, la phosphorylation d'eIF2 α peut être induite par différentes kinases activées par d'autres types de stress (Donnelly et al., 2013), suggérant que cette phosphorylation pourrait être une altération secondaire dans la physiopathologie de la maladie.

II. Absence d'implication d'une dépression de la transmission synaptique

Beaucoup d'études ont montré une relation entre la modification du fonctionnement synaptique induite par l'A β et les pertes de synapses. Dans des tranches d'hippocampe de souris transgéniques APP ou après application d'A β sur des cultures de neurones et des tranches de cerveau, la transmission synaptique est diminuée (Hsia et al., 1999; Kamenetz et al., 2003; Snyder et al., 2005) et une augmentation de la dépression à long terme peut être observée (Li et al., 2009). Les oligomères d'A β mimeraient en effet un blocage partiel des récepteurs NMDA favorisant l'induction de la DLT (Shankar et al., 2007). Ils pourraient par ailleurs emprunter des voies de signalisation typiques de la DLT et induire une phosphorylation des récepteurs AMPA responsable de leur endocytose et d'une perte d'épines (Hsieh et al., 2006). La DLT induit en effet un rétrécissement des épines (Zhou et al., 2004) qui sont ensuite éliminées (Wiegert and Oertner, 2013). Au contraire, dans les souris APPxPS1-KI, aucune perturbation de la transmission synaptique basale, y compris NMDA, ou de la DLT n'est observée. La perte de synapse dans notre modèle ne semble donc pas être liée à une perturbation de la transmission synaptique basale ou de la DLT.

III. Altération de la plasticité et de la morphologie des épines dendritiques

Même si elles ne présentent pas de modification de la transmission synaptique basale, les souris APPxPS1-KI présentent une diminution de la potentialisation à long terme à 3 mois, associée avec des troubles de la mémoire spatiale. Une diminution de la PLT est observée dans des modèles transgéniques (Chapman et al., 1999) et quand l'A β est appliqué sur des tranches d'hippocampe (Wang et al., 2002) ou injecté de façon intracérébrale (Shankar et al., 2008; Walsh et al., 2002b). Une telle diminution a déjà été observée dans le modèle APPxPS1-KI mais à 6 mois (Breyhan et al., 2009). De même, des défauts de mémoire spatiale dans un test de piscine de Morris avaient été observés dans ce modèle, mais plus tardivement (Faure et al., 2011). A noter que la diminution de PLT que nous observons concerne aussi bien les phases précoces et tardives de la PLT, et ne peut donc pas être expliquée par la phosphorylation d'eIF2 α qui altère seulement la phase tardive de la PLT (Costa-Mattioli et al., 2007).

Associées à la diminution de PLT et présentes également avant la perte de synapses, des modifications de la forme des épines ont été observées dans les souris APPxPS1-KI. Il y a une augmentation de la proportion d'épine sans têtes, avec des épines présentant une diminution de leur longueur et une augmentation de la largeur de leur cou. Une diminution du nombre d'épines avec une tête (« mushroom ») associée à une augmentation du nombre d'épines sans tête (« stubby ») est également observée après application d'oligomères d'A β 42 sur des cultures de neurones hippocampiques (Popugaeva et al., 2015). Des résultats similaires sont observés dans des cultures de tranches surexprimant l'APP, associés avec une diminution de la longueur des épines des neurones du champ CA1 de l'hippocampe (Penazzi et al., 2016; Tackenberg and Brandt, 2009). Dans ces études, il n'y a pas une perte spécifique des épines de type « mushroom » mais plutôt un changement de leur forme, suggérant qu'elles deviennent d'avantage « stubby ». De même, un modèle transgénique (J20) présente dès 4 mois une diminution du nombre d'épines « mushroom » associée à une augmentation du nombre d'épine « stubby », avant l'apparition de la perte d'épines, de façon similaire à ce qui est observé dans les souris APPxPS1-KI (Pozueta et al., 2013a). Par ailleurs, la diminution de la densité d'épines et la modification de leur morphologie sont corrélées avec le niveau d'APP

intracellulaire à 4-5 mois dans un autre modèle transgénique (APP23) (Zou et al., 2015). Enfin, nous avons vérifié la pertinence dans la pathologie humaine des altérations de la morphologie des épines observées dans les souris APPxPS1-KI, en étudiant des biopsies de patients. Une corrélation négative a été observée entre la densité de synapses et le diamètre du cou. Ainsi, les deux biopsies issues de patients atteints de Maladie d'Alzheimer qui présentaient une diminution de la densité de synapses présentaient également une augmentation du diamètre du cou des épines.

Une telle modification de la forme des épines pourrait être responsable de la réduction de la PLT observée dans les souris APPxPS1-KI. En effet, un élargissement du cou des épines modifie la compartimentalisation électrique et biochimique de l'épine (Tønnesen and Nägerl, 2016). Les simulations mathématiques indiquent que l'élargissement du cou des épines n'influence pas les potentiels post-synaptiques excitateurs mesurés au niveau du corps cellulaire, ce qui est confirmé par l'absence d'altération de la transmission synaptique basale dans les souris APPxPS1-KI. A l'inverse, l'élargissement du cou pourrait diminuer les potentiels postsynaptiques excitateurs au niveau de la tête de l'épine. Cet effet ne devrait affecter que les épines présentant initialement une résistance importante du cou (au moins 80 Mohm). Cependant, il n'existe qu'une faible proportion d'épines avec une résistance électrique aussi importante. L'impact de la compartimentalisation électrique sur les potentiels de membrane reste encore débattu. Ceci est dû aux limitations techniques empêchant la mesure des potentiels excitateurs directement dans l'épine, et aux résultats non concordants entre différentes études (Tønnesen and Nägerl, 2016). En libérant du glutamate « cagé » directement au niveau de la tête des épines, Araya et al. ont observé que l'amplitude des potentiels au niveau du soma était inversement proportionnelle à la longueur du cou de l'épine (Araya et al., 2006). Cependant, d'autres études ont montré une absence de corrélation entre la morphologie de l'épine et les potentiels synaptiques (Takasaki and Sabatini, 2014) ou que la résistance du cou était trop faible pour isoler électriquement la synapse et avoir des conséquences fonctionnelles (Popovic et al., 2015).

L'élargissement du cou des épines dans les souris APPxPS1-KI pourrait davantage altérer la compartimentalisation biochimique de l'épine, en augmentant la diffusion de molécules entre la tête de l'épine et le corps du dendrite (Tønnesen and Nägerl, 2016). En théorie, la diminution de compartimentalisation biochimique pourrait altérer la PLT en modifiant par exemple la diffusion de protéines activées suite à l'influx de calcium à travers les récepteurs NMDA (Alvarez and Sabatini, 2007; Nishiyama and Yasuda, 2015).

Cependant, la compartimentalisation biochimique ne peut avoir un impact sur les processus synaptiques que pour des molécules qui ne sont pas rapidement dégradées, inactivées ou séquestrées par des interactions moléculaires dans la tête de l'épine (Alvarez and Sabatini, 2007). Par exemple, beaucoup d'études ont démontré l'importance de la compartimentalisation biochimique du calcium dans la tête de l'épine (Korkotian et al., 2004; Noguchi et al., 2005). Cependant, ces études étaient réalisées à température ambiante, ce qui ralentit l'éjection du calcium par les pompes calciques. Quand les mêmes expériences sont réalisées à des températures physiologiques, le calcium est plus rapidement éjecté de la tête de l'épine par les pompes calciques que par diffusion le long du cou (Alvarez and Sabatini, 2007; Bloodgood and Sabatini, 2009; Sobczyk, 2005). Malgré le développement de nombreuses hypothèses, nous n'avons pas trouvé dans la littérature d'exemple direct d'un rôle de la compartimentalisation biochimique des épines dans la physiologie synaptique. Des modélisations indiquent que la forme des épines pourrait influencer la diffusion des récepteurs au glutamate (Kusters et al., 2013). Un élargissement du cou des épines pourrait diminuer la concentration de récepteurs au glutamate dans la tête de l'épine, particulièrement si une exocytose de ces récepteurs se produit localement.

La morphologie des épines dendritiques dépend de l'organisation de leur cytosquelette composé de filaments d'actine (Fifková and Delay, 1982; Matus et al., 1982). Le changement de morphologie des épines dans les souris APPxPS1-KI suggère donc une altération de leur cytosquelette d'actine. Or la polymérisation d'actine est essentielle pour la PLT (Kopec, 2006; Krucker et al., 2000; Tønnesen et al., 2014). En effet, l'induction de la PLT entraîne une augmentation de la polymérisation de l'actine, responsable d'une augmentation de la taille de l'épine et du diamètre de leur cou (Kopec, 2006; Krucker et al., 2000; Okamoto et al., 2004; Tønnesen et al., 2014). L'augmentation du diamètre du cou des épines dans les souris APPxPS1-KI ne peut donc pas être due au déficit de PLT observé. A l'inverse, l'inhibition de la polymérisation de l'actine altère la PLT (Ramachandran and Frey, 2009). C'est pourquoi une altération du cytosquelette d'actine dans les épines pourrait être le synonyme d'une altération de la polymérisation de l'actine, et être responsable de la diminution de PLT.

IV. Mécanisme potentiel de l'altération de la morphologie des épines dendritiques

La morphologie des épines dépend de la présence de protéines régulatrices de l'actine qui modifient sa polymérisation, sa contractibilité ou encore sa nucléation (Goley and Welch, 2006; Hotulainen and Hoogenraad, 2010; Ryu et al., 2006). Des altérations de certaines protéines régulatrices de l'actine pourraient être responsables d'une modification de forme des épines (Bolognin et al., 2014). Par exemple, l'A β pourrait induire une augmentation de l'activation de la GTPase RhoA et de ROCKII, responsable du rétrécissement des épines que l'on peut observer dans des modèles *in vitro* ou dans des souris transgéniques (Pozueta et al., 2013a). En outre, des molécules d'adhésion cellulaire à la surface de la cellule sont associées directement avec les protéines de liaison à l'actine (Konietzny et al., 2017). Ces molécules permettent de traduire les signaux extérieurs à la cellule en un changement local de la dynamique de l'actine, modifiant notamment la plasticité des épines (Leshchyn's'ka and Sytnyk, 2016; Togashi et al., 2009). L'A β , sous sa forme soluble extracellulaire, pourrait alors perturber ces molécules et ainsi induire des modifications de la morphologie des épines.

Récemment, une nouvelle structure de l'actine a été identifiée. Il s'agit d'un réseau d'actine en anneaux périodique (« periodic actin rings »), la présence de tétramères de spectrine définissant l'espace entre ces anneaux (Konietzny et al., 2017; Xu et al., 2013). Ces anneaux d'actine ont été mis en évidence par microscopie à super résolution au niveau des axones (Xu et al., 2013), des dendrites (D'Este et al., 2015) et dans le cou des épines (Bär et al., 2016; He et al., 2016; Sidenstein et al., 2016) (Fig. 31A). L'identification de ces anneaux a changé la vision de l'organisation de l'actine dans les épines dendritiques (Bär et al., 2016) (Fig. 31B). Cette structure particulière présente au niveau du cou de l'épine et qui semble absente de la tête pourrait être impliquée dans la forme du cou de l'épine. En effet, par des simulations, Miermans et al. suggèrent que ces anneaux d'actine pourraient être impliqués dans la constriction du cou des épines et pourraient participer à la stabilisation des cous longs et fins des épines (Bertling and Hotulainen, 2017; Miermans et al., 2017). Le modèle de Miermans et al. montre que la constriction du cou de l'épine aide à la stabilisation d'épines matures, impliquant ainsi les anneaux d'actine dans la stabilisation des épines. C'est pourquoi, une perturbation de ces anneaux d'actine pourrait être responsable d'une diminution de la

force de constriction au niveau du cou des épines, entraînant une déstabilisation des épines « mushroom » matures qui vont s'affaisser et devenir plus « stubby » (Fig. 31C). On peut également émettre l'hypothèse qu'à force de s'affaisser l'épine puisse disparaître, ce qui pourrait constituer un mécanisme de perte de synapses dans les souris APPxPS1-KI. Il serait intéressant d'observer le réseau de l'actine spécifiquement dans le cou des épines dendritiques des souris APPxPS1-KI par microscopie à super-résolution (Bär et al., 2016).

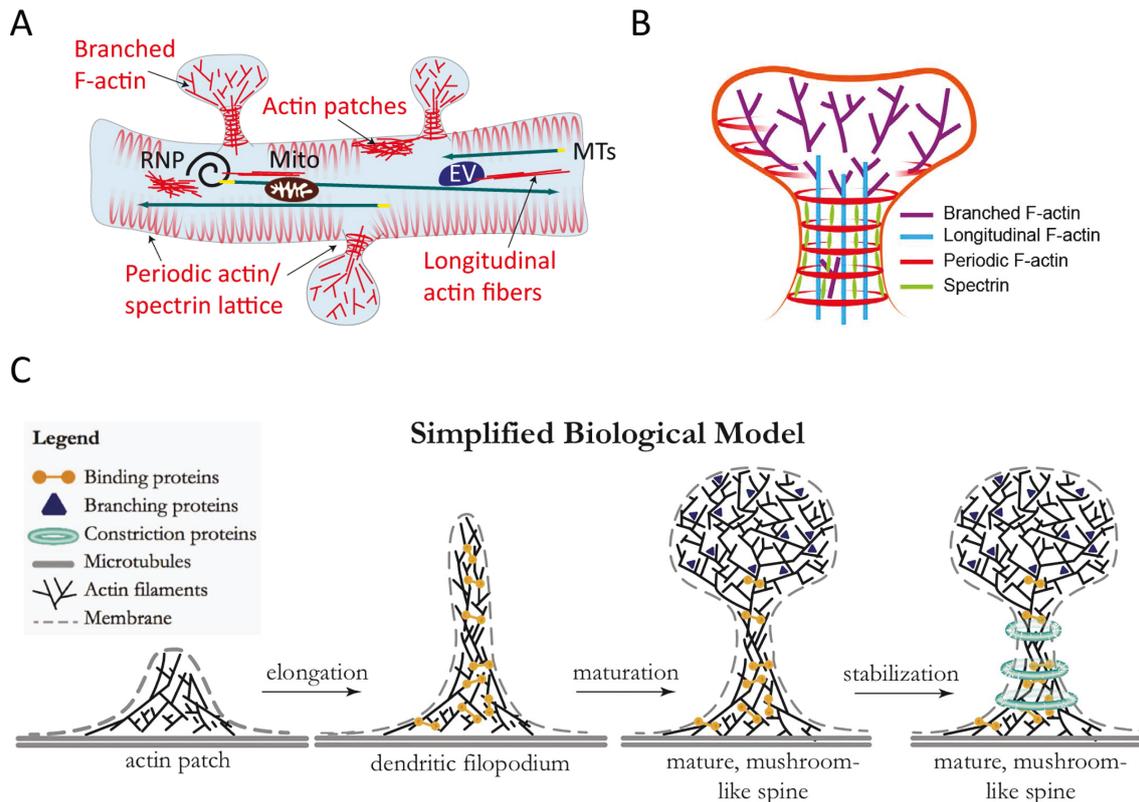


Figure 31. Les anneaux d'actine périodique sous-tendent la constriction du cou des épines

A. Les anneaux d'actine périodique sont présents dans le dendrite et le cou des épines (d'après Konietzny et al., 2017).

B. Schéma de l'organisation du cytosquelette d'actine dans une épine dendritique. Les anneaux d'actine périodique sont retrouvés uniquement dans le cou de l'épine et la présence de spectrine définit l'espace entre ces anneaux. Le cou de l'épine est constitué en plus de filaments d'actine longitudinale alors que la tête est plutôt constituée de filaments d'actine branchée (d'après Bär et al., 2016).

C. Modèle présentant le rôle des anneaux d'actine dans la constriction du cou de l'épine et sa stabilisation. Des protéines de liaison sont impliquées dans l'alignement des filaments d'actines à distance du dendrite; des protéines de nucléation sont impliquées dans la création d'un réseau d'actine branchée dans les têtes d'épines matures; enfin différentes protéines sont impliquées dans la constriction du cou et la stabilisation de cous longs et fins, comme les anneaux d'actine périodique retrouvés uniquement dans le cou et absents de la tête de l'épine (d'après Miermans et al., 2017).

De façon intéressante, le niveau d'accumulation de l'A β semble influencer la gravité des altérations observées dans les souris APPxPS1-KI. En effet, les souris transgénique APP, qui ne développent pas de pertes de neurones et de synapses, présentent une production d'A β plus faible que dans les souris APPxPS1-KI (Casas et al., 2004). L'augmentation de la largeur du cou des épines dans les souris transgéniques APP semble plus faible (18,6%) que l'augmentation observée dans les souris APPxPS1-KI (28,6%). Les souris transgéniques APP pourraient ainsi présenter un phénotype intermédiaire qui coïncide avec une accumulation plus faible d'A β . On peut donc émettre l'hypothèse d'un effet graduel de la concentration d'A β sur l'élargissement du cou des épines. Par son caractère soluble, l'A β pourrait se lier à la surface des dendrites, voire au niveau des synapses (Gong et al., 2003; Lacor, 2007) et ainsi perturber le cytosquelette d'actine et ses protéines de régulation, entraînant une modification de la morphologie des épines et de la PLT. L'application d'A β sur des cultures de neurones ou des tranches de cerveau, associée à de la microscopie à super-résolution permettrait de vérifier l'hypothèse que l'A β puisse se fixer au niveau des épines dendritique et altérer leur cytosquelette (Bär et al., 2016; Nägerl et al., 2008).

V. Implication d'un dysfonctionnement lysosomal

D'autres souris modèles de la Maladie d'Alzheimer développent des pertes de neurones (Jawhar et al., 2012; Oakley et al., 2006; Wirths and Bayer, 2010). Ces modèles ont la particularité de présenter des accumulations d'A β intracellulaire. Comme dans ces modèles, les souris APPxPS1-KI présentent une accumulation d'A β intracellulaire, notamment dans la couche pyramidale des neurones du champ CA1 de l'hippocampe. Dans les souris APPxPS1-KI, la perte de neurones corrèle d'avantage avec l'accumulation d'A β intracellulaire qu'avec les plaques amyloïdes puisque cette perte est observée dans des régions cérébrales présentant une accumulation d'A β intracellulaire et est absente des régions présentant uniquement des plaques (Christensen et al., 2008). A noter que dans des souris APPxPS1 (Wirths et al., 2002), qui développent des pertes de neurones (Schmitz et al., 2004) et une perte de boutons présynaptiques (Rutten et al., 2005) à des âges très avancés, les plaques ne corrèlent pas non plus avec la perte de neurones (Schmitz et al., 2004).

Puisque l'accumulation d'A β intracellulaire corrèle avec la perte de neurones, il semble essentiel d'étudier la localisation subcellulaire de ce peptide dans les neurones des souris APPxPS1-KI. En croisant les observations issues d'immunocytochimie et des observations morphologiques en microscopie électronique classique, nous avons pu observer que l'A β s'accumule sous forme de fibrilles dans les lysosomes qui sont élargis. L'augmentation de ces lysosomes dits tertiaires, présentant des accumulations fibrillaires, est spécifique des souris APPxPS1-KI et est très faible dans les souris transgénique APP qui ne développent pas de perte de neurones ou de synapses. Ces résultats sont en accord avec les données de Langui et al. qui ont observé une colocalisation de l'A β avec des marqueurs des lysosomes dans des souris transgéniques APPxPS1 (Langui et al., 2004) et Lauritzen et al. qui ont observé une accumulation de C99 dans les lysosomes de souris double et triple transgénique (APP, Tau +/- PS1) (Lauritzen et al., 2016). Par des immunomarquages utilisant des anticorps dirigés contre la cathepsine B spécifique des lysosomes, nous avons observé une diminution du nombre et une augmentation de la surface des lysosomes dans les souris APPxPS1-KI. L'immun marquage cathepsine B n'est pas altéré dans les souris transgéniques APP. De telles observations suggèrent un dysfonctionnement du système lysosomal dans les souris APPxPS1-KI. Le système lysosomal est impliqué dans la dégradation de l'APP (Caporaso et al., 1992, 1994; Golde et al., 1992; Haass et al., 1992) et la production de l'A β (Pasternak et al., 2003; Sannerud et al., 2016). En particulier, la localisation restreinte de la préséniline 2 dans les endosomes tardifs et les lysosomes permet un clivage de l'APP localisé dans ces organelles et la génération d'un pool important d'A β intracellulaire (Sannerud et al., 2016). L'afflux majeur d'A β dans ces organelles, du à des mutations spécifiques responsables d'une augmentation importante d'A β , pourrait surcharger les lysosomes dont la fonction de dégradation deviendrait dépassée. Un cercle vicieux pourrait alors se former dans lequel la fonction de dégradation de l'A β dans les lysosomes serait dépassée, entraînant alors une accumulation d'A β dans les lysosomes, qui les surchargerait et perturberait encore davantage leur fonction de dégradation. Dans des modèles transgéniques simples APP, où la quantité d'A β est moins importante, l'A β s'accumule essentiellement dans les corps multivésiculaires (Takahashi et al., 2002).

Dans la Maladie d'Alzheimer, les résultats sont controversés. Bancher et al. ont observé une accumulation d'A β dans les granules de lipofuscine dans des neurones de tissu post-mortem de patients en microscopie électronique (Bancher et al., 1989). Cependant, une accumulation d'A β dans les corps multivésiculaires et pas dans les granules de lipofuscine a

été observée dans une étude plus récente (Takahashi et al., 2002). Quel que soit le site intracellulaire d'accumulation de l'A β dans la Maladie d'Alzheimer, l'observation d'une augmentation du nombre de granules de lipofuscine dans les corps cellulaires des neurones dans les biopsies de patients atteints de Maladie d'Alzheimer indique une modification des lysosomes dans cette pathologie.

Les altérations du système lysosomal dans les souris APPxPS1-KI pourraient être impliquées dans les modifications de la morphologie des épines et le déficit en PLT. Récemment, le rôle des lysosomes dans la plasticité des épines dendritiques a été montré. L'activité synaptique induit un influx de calcium dans le dendrite responsable d'une libération de calcium par les lysosomes, qui constituent une source de stockage de calcium distincte du réticulum endoplasmique (Galione, 2015). Cette libération de calcium induit la fusion des lysosomes avec la membrane plasmique et la libération de cathepsine B dans le milieu extracellulaire. La cathepsine B peut alors, en clivant l'inhibiteur lié à la metalloprotéinase de la matrice (« matrix metalloproteinase » ou MMP) MMP-9, permettre une activation de la MMP-9. La MMP-9 est associée classiquement au remodelage de la matrice extracellulaire. L'activité de la MMP-9 permet le maintien à long terme de la plasticité structurale des épines dendritiques qui accompagne l'activité synaptique, à savoir l'augmentation de la taille de l'épine (Padamsey et al., 2017). L'activité de la MMP-9 est nécessaire au maintien de la potentialisation à long terme et à la croissance des épines dendritiques (Dziembowska and Wlodarczyk, 2012; Wang et al., 2008). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que dans les souris APPxPS1-KI, une altération de la fonction lysosomale soit responsable d'une perturbation de l'activation de la MMP-9 qui est impliquée dans le remodelage des épines et le maintien de la PLT. Les altérations des lysosomes pourraient donc constituer une cause primaire de modification de la forme des épines et d'une diminution de la PLT dans les souris APPxPS1-KI. Il faut cependant noter qu'une modification de la forme des épines dendritiques, moins importante, est également observée chez les souris transgéniques APP qui ne présentent pas d'altération des lysosomes, indiquant l'implication d'autres mécanismes.

En retour, une altération de la plasticité synaptique pourrait aggraver les anomalies de clairance intracellulaire de l'A β via une modulation du système lysosomal. L'activité synaptique permet d'induire une libération du peptide A β dans le milieu extracellulaire (Cirrito et al., 2005; Kamenetz et al., 2003). Tampellini et al. ont montré que des stimulations de type PLT chimique permettent également de réduire l'accumulation intraneuronale d'A β , et préviennent les altérations synaptiques associées à l'A β (Tampellini et al., 2009).

Inversement, l'inhibition de l'activité synaptique réduit les plaques, mais augmente l'A β intracellulaire et aggrave les altérations des synapses et de la mémoire dans une souris modèle de Maladie d'Alzheimer (Tampellini et al., 2010). Or l'inhibition de l'activité synaptique réduit la fonction autophagique-lysosomale, tandis que des stimulations de type PLT chimique l'augmentent (Akwa et al., 2017). Ces études indiquent qu'une altération de la plasticité synaptique pourrait réduire la dégradation de l'A β intracellulaire en diminuant l'activité du système lysosomal.

Afin de tester l'implication des altérations des lysosomes dans les pertes de neurones et de synapses dans les souris APPxPS1-KI, nous envisageons de moduler la fonction lysosomale par des injections de lentivirus exprimant TFEB ou cathepsine B dans la couche pyramidale de neurone du champ CA1 de l'hippocampe. Dans une souris transgénique, l'injection d'un AAV exprimant TFEB augmente la biogénèse des lysosomes et stimule le flux endosome-lysosomes pour augmenter la dégradation de l'APP et réduire la production d'A β et de plaques (Xiao et al., 2015). L'injection de ce lentivirus permet notamment d'augmenter la survie neuronale dans un modèle murin de tauopathie (Polito et al., 2014). De plus, la surexpression de la cathepsine B par l'injection d'un AAV ou d'un lentivirus permet de réduire l'A β , les dépôts amyloïdes (Embury et al., 2017; Mueller et al., 2010) et l'A β intracellulaire (Embury et al., 2017) dans des souris transgéniques. La stratégie consistant à surexprimer une autre enzyme lysosomale (glucocérébrosidase) permet de réduire les pertes de neurones induites par les oligomères d'A β dans des cultures de neurones hippocampiques (Choi et al., 2015). Nous avons donc prévu d'injecter ces lentivirus dans des souris APPxPS1-KI afin d'étudier si une augmentation de la fonction lysosomale, et donc une diminution des niveaux d'A β intracellulaire, permet de prévenir les pertes de neurones et de synapses.

En définitive, les souris APPxPS1-KI développent une perte de synapses qui précède la perte de neurones. Nous avons pu montrer que ces pertes n'étaient pas induites par un stress du réticulum endoplasmique, une dépression de l'activité synaptique ou une augmentation de la dépression à long terme. Avant les pertes de synapses et de neurones, des modifications de la morphologie des épines sont observées, associées à un déficit de la potentialisation à long terme et des troubles de la mémoire spatiale. Des altérations similaires de la morphologie des épines sont retrouvées dans les biopsies de patients atteints de Maladie d'Alzheimer. Ces altérations de la forme des épines sont responsables d'une modification de la

compartimentalisation électrique et biochimique de l'épine dans les souris APPxPS1-KI. De telles modifications de la morphologie de l'épine indiquent une altération du cytosquelette d'actine au niveau de l'épine, qui pourra être analysée par l'observation en microscopie à super-résolution. En outre, nous avons observé que les souris APPxPS1-KI présentaient une accumulation d'A β dans les lysosomes et que ces derniers étaient altérés de façon spécifique. Une modification des lysosomes est également observée dans les biopsies de patients atteints de Maladie d'Alzheimer, qui présentent une accumulation de granules de lipofuscine. Les altérations du système lysosomal pourraient être impliquées dans les pertes de synapses et de neurones dans les souris APPxPS1-KI puisqu'elles ne sont pas observées dans les souris transgénique APP qui ne développent pas ces pertes. L'augmentation de la fonction lysosomale par l'injection d'un lentivirus surexprimant TFEB ou la cathepsine B permettra d'étudier si une augmentation de la fonction lysosomale suffit à prévenir les pertes de synapses et de neurones dans les souris APPxPS1-KI.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abisambra, J.F., Jinwal, U.K., Blair, L.J., O’Leary, J.C., Li, Q., Brady, S., Wang, L., Guidi, C.E., Zhang, B., Nordhues, B.A., et al. (2013). Tau Accumulation Activates the Unfolded Protein Response by Impairing Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. *J. Neurosci.* *33*, 9498–9507.
- Abraham, W.C., and Williams, J.M. (2003). Properties and Mechanisms of LTP Maintenance. *The Neuroscientist* *9*, 463–474.
- Akwa, Y., Gondard, E., Mann, A., Capetillo-Zarate, E., Alberdi, E., Matute, C., Marty, S., Vaccari, T., Lozano, A.M., Baulieu, E.E., et al. (2017). Synaptic activity protects against AD and FTD-like pathology via autophagic-lysosomal degradation. *Mol. Psychiatry*.
- Almeida, C.G., Tampellini, D., Takahashi, R.H., Greengard, P., Lin, M.T., Snyder, E.M., and Gouras, G.K. (2005). Beta-amyloid accumulation in APP mutant neurons reduces PSD-95 and GluR1 in synapses. *Neurobiol. Dis.* *20*, 187–198.
- Alvarez, V.A., and Sabatini, B.L. (2007). Anatomical and Physiological Plasticity of Dendritic Spines. *Annu. Rev. Neurosci.* *30*, 79–97.
- Andersen, O.M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., von Arnim, C.A., Breiderhoff, T., Jansen, P., and Wu, X. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13461–13466.
- Araya, R., Jiang, J., Eisenthal, K.B., and Yuste, R. (2006). The spine neck filters membrane potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 17961–17966.
- Arendt, T., Bigl, V., Arendt, A., and Tennstedt, A. (1983). Loss of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer’s disease, paralysis agitans and Korsakoff’s Disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *61*, 101–108.
- Armstrong, A., Mattsson, N., Appelqvist, H., Janefjord, C., Sandin, L., Agholme, L., Olsson, B., Svensson, S., Blennow, K., Zetterberg, H., et al. (2014). Lysosomal Network Proteins as Potential Novel CSF Biomarkers for Alzheimer’s Disease. *NeuroMolecular Med.* *16*, 150–160.
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., and Hyman, B.T. (1992). Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer’s disease. *Neurology* *42*, 631–639.
- Bancher, C., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Kim, K.S., and Wisniewski, H.M. (1989). Immunoreactivity of neuronal lipofuscin with monoclonal antibodies to the amyloid beta-protein. *Neurobiol. Aging* *10*, 125–132.

- Bandyopadhyay, S., Goldstein, L.E., Lahiri, D.K., and Rogers, J.T. (2007). Role of the APP non-amyloidogenic signaling pathway and targeting alpha-secretase as an alternative drug target for treatment of Alzheimer's disease. *Curr. Med. Chem.* *14*, 2848–2864.
- Bär, J., Kobler, O., van Bommel, B., and Mikhaylova, M. (2016). Periodic F-actin structures shape the neck of dendritic spines. *Sci. Rep.* *6*.
- Bear, M.F., and Malenka, R.C. (1994). Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr. Opin. Neurobiol.* *4*, 389–399.
- Bekris, L.M., Yu, C.-E., Bird, T.D., and Tsuang, D.W. (2010). Review Article: Genetics of Alzheimer Disease. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* *23*, 213–227.
- Benilova, I., Karran, E., and De Strooper, B. (2012). The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* *15*, 349–357.
- Benke, T.A., Lüthi, A., Isaac, J.T., and Collingridge, G.L. (1998). Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* *393*, 793–797.
- Bernstein, S.L., Dupuis, N.F., Lazo, N.D., Wytttenbach, T., Condrón, M.M., Bitan, G., Teplow, D.B., Shea, J.-E., Ruotolo, B.T., Robinson, C.V., et al. (2009). Amyloid- β protein oligomerization and the importance of tetramers and dodecamers in the aetiology of Alzheimer's disease. *Nat. Chem.* *1*, 326–331.
- Bertling, E., and Hotulainen, P. (2017). New waves in dendritic spine actin cytoskeleton: From branches and bundles to rings, from actin binding proteins to post-translational modifications. *Mol. Cell. Neurosci.* *84*, 77–84.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* *2*, 326.
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D., and Tanzi, R.E. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat. Genet.* *39*, 17–23.
- Bertram, L., Lill, C.M., and Tanzi, R.E. (2010). The Genetics of Alzheimer Disease: Back to the Future. *Neuron* *68*, 270–281.
- Bierer, L.M., Hof, P.R., Purohit, D.P., Carlin, L., Schmeidler, J., Davis, K.L., and Perl, D.P. (1995). Neocortical neurofibrillary tangles correlate with dementia severity in Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.* *52*, 81–88.
- Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L., and LaFerla, F.M. (2005). Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* *45*, 675–688.
- Bliss, T.V., and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* *361*, 31–39.

- Bliss, T.V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* *232*, 331–356.
- Bloodgood, B.L., and Sabatini, B.L. (2009). NMDA Receptor-mediated calcium transients in dendritic spines. *Biol. NMDA Recept.* Boca Raton FL.
- Bobinski, M., Wegiel, J., Tarnawski, M., Bobinski, M., Reisberg, B., de Leon, M.J., Miller, D.C., and Wisniewski, H.M. (1997). Relationships between regional neuronal loss and neurofibrillary changes in the hippocampal formation and duration and severity of Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *56*, 414–420.
- Bolognin, S., Lorenzetto, E., Diana, G., and Buffelli, M. (2014). The Potential Role of Rho GTPases in Alzheimer’s Disease Pathogenesis. *Mol. Neurobiol.* *50*, 406–422.
- Bourne, J.N., and Harris, K.M. (2008). Balancing Structure and Function at Hippocampal Dendritic Spines. *Annu. Rev. Neurosci.* *31*, 47–67.
- Braak, H., and Braak, E. (1991a). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *1*, 213–216.
- Braak, H., and Braak, E. (1991b). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *82*, 239–259.
- Breyhan, H., Wirths, O., Duan, K., Marcello, A., Rettig, J., and Bayer, T.A. (2009). APP/PS1KI bigenic mice develop early synaptic deficits and hippocampus atrophy. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *117*, 677–685.
- Briggs, D.I., Defensor, E., Memar Ardestani, P., Yi, B., Halpain, M., Seabrook, G., and Shamloo, M. (2017). Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Learning and Memory Impairment and Alzheimer’s Disease-Like Neuropathology in the PS19 and APP^{Swe} Mouse Models of Tauopathy and Amyloidosis. *Eneuro* *4*, ENEURO.0025-17.2017.
- Brion, J., Passareiro, H., Nunez, J., and Flament-Durand, J. (1985). Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d’Alzheimer. *Arch Biol Brux* *95*, 229–235.
- Budson, A.E., and Price, B.H. (2005). Memory dysfunction. *N. Engl. J. Med.* *352*, 692–699.
- Buée, L., Bussièrre, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *33*, 95–130.
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., Yates, J., Cotman, C., and Glabe, C. (1992). Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer’s A4/beta amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* *267*, 546–554.
- Calabrese, B., Shaked, G.M., Tabarean, I.V., Braga, J., Koo, E.H., and Halpain, S. (2007). Rapid, concurrent alterations in pre- and postsynaptic structure induced by naturally-secreted

amyloid- β protein. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 183–193.

Campion, D., Dumanchin, C., Hannequin, D., Dubois, B., Belliard, S., Puel, M., Thomas-Anterion, C., Michon, A., Martin, C., and Charbonnier, F. (1999). Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 664–670.

Caporaso, G.L., Gandy, S.E., Buxbaum, J.D., and Greengard, P. (1992). Chloroquine inhibits intracellular degradation but not secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 2252–2256.

Caporaso, G.L., Takei, K., Gandy, S.E., Matteoli, M., Mundigl, O., Greengard, P., and De Camilli, P. (1994). Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 14, 3122–3138.

Casas, C., Sergeant, N., Itier, J.-M., Blanchard, V., Wirths, O., van der Kolk, N., Vingtdoux, V., van de Steeg, E., Ret, G., Canton, T., et al. (2004). Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated A β 42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am. J. Pathol.* 165, 1289–1300.

Castellano, J.M., Kim, J., Stewart, F.R., Jiang, H., DeMattos, R.B., Patterson, B.W., Fagan, A.M., Morris, J.C., Mawuenyega, K.G., Cruchaga, C., et al. (2011). Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- Peptide Clearance. *Sci. Transl. Med.* 3, 89ra57-89ra57.

Cataldo, A.M., and Nixon, R.A. (1990). Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 3861–3865.

Cataldo, A.M., Barnett, J.L., Mann, D.M., and Nixon, R.A. (1996). Colocalization of lysosomal hydrolase and beta-amyloid in diffuse plaques of the cerebellum and striatum in Alzheimer's disease and Down's syndrome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 704–715.

Cataldo, A.M., Barnett, J.L., Pieroni, C., and 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 β -amyloidogenesis. *J. Neurosci.* 17, 6142–6151.

Cataldo, A.M., Peterhoff, C.M., Troncoso, J.C., Gomez-Isla, T., Hyman, B.T., and Nixon, R.A. (2000). Endocytic pathway abnormalities precede amyloid β deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am. J. Pathol.* 157, 277–286.

Cataldo, A.M., Petanceska, S., Terio, N.B., Peterhoff, C.M., Durham, R., Mercken, M., Mehta, P.D., Buxbaum, J., Haroutunian, V., and Nixon, R.A. (2004). A β localization in abnormal endosomes: association with earliest A β elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol. Aging* 25, 1263–1272.

- Chafekar, S.M., Hoozemans, J.J.M., Zwart, R., Baas, F., and Scheper, W. (2007). A β_{1-42} Induces Mild Endoplasmic Reticulum Stress in an Aggregation State-Dependent Manner. *Antioxid. Redox Signal.* *9*, 2245–2254.
- Chang, E.H., Savage, M.J., Flood, D.G., Thomas, J.M., Levy, R.B., Mahadomrongkul, V., Shirao, T., Aoki, C., and Huerta, P.T. (2006). AMPA receptor downscaling at the onset of Alzheimer's disease pathology in double knockin mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 3410–3415.
- Chang, R.C., Wong, A.K., Ng, H.-K., and Hugon, J. (2002a). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α (eIF2 α) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroreport* *13*, 2429–2432.
- Chang, R.C.-C., Suen, K.-C., Ma, C.-H., Elyaman, W., Ng, H.-K., and Hugon, J. (2002b). Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α in neuronal degeneration. *J. Neurochem.* *83*, 1215–1225.
- Chapman, P.F., White, G.L., Jones, M.W., Cooper-Blacketer, D., Marshall, V.J., Irizarry, M., Younkin, L., Good, M.A., Bliss, T.V.P., Hyman, B.T., et al. (1999). Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat. Neurosci.* *2*.
- Chasseigneaux, S., and Allinquant, B. (2012). Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences: A β and sAPPs functions. *J. Neurochem.* *120*, 99–108.
- Chaudhari, N., Talwar, P., Parimisetty, A., Lefebvre d'Hellencourt, C., and Ravanan, P. (2014). A Molecular Web: Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, and Oxidative Stress. *Front. Cell. Neurosci.* *8*.
- Chazeau, A., and Giannone, G. (2016). Organization and dynamics of the actin cytoskeleton during dendritic spine morphological remodeling. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *73*, 3053–3073.
- Chen, Y., Bourne, J., Pieribone, V.A., and Fitzsimonds, R.M. (2004). The role of actin in the regulation of dendritic spine morphology and bidirectional synaptic plasticity. *Neuroreport* *15*, 829–832.
- Choi, S., Kim, D., Kam, T.-I., Yun, S., Kim, S., Park, H., Hwang, H., Pletnikova, O., Troncoso, J.C., Dawson, V.L., et al. (2015). Lysosomal Enzyme Glucocerebrosidase Protects against A β_{1-42} Oligomer-Induced Neurotoxicity. *PLOS ONE* *10*, e0143854.
- Christensen, D.Z., Kraus, S.L., Flohr, A., Cotel, M.-C., Wirths, O., and Bayer, T.A. (2008). Transient intraneuronal A β rather than extracellular plaque pathology correlates with neuron loss in the frontal cortex of APP/PS1KI mice. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *116*, 647–655.
- Cirrito, J.R., Yamada, K.A., Finn, M.B., Sloviter, R.S., Bales, K.R., May, P.C., Schoepp, D.D., Paul, S.M., Mennerick, S., and Holtzman, D.M. (2005). Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron* *48*, 913–922.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K.,

- Lee, M., Seubert, P., Davis, A., et al. (1997). Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat. Med.* 3, 67–72.
- Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., and Ashe, K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid- β protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* 8, 79–84.
- Coen, K., Flannagan, R.S., Baron, S., Carraro-Lacroix, L.R., Wang, D., Vermeire, W., Michiels, C., Munck, S., Baert, V., and Sugita, S. (2012). Lysosomal calcium homeostasis defects, not proton pump defects, cause endo-lysosomal dysfunction in PSEN-deficient cells. *J Cell Biol* 198, 23–35.
- Conn, P.J., and Pin, J.-P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 205–237.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923.
- Cossec, J.-C., Simon, A., Marquer, C., Moldrich, R.X., Leterrier, C., Rossier, J., Duyckaerts, C., Lenkei, Z., and Potier, M.-C. (2010). Clathrin-dependent APP endocytosis and A β secretion are highly sensitive to the level of plasma membrane cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 846–852.
- Costa-Mattioli, M., Gobert, D., Stern, E., Gamache, K., Colina, R., Cuello, C., Sossin, W., Kaufman, R., Pelletier, J., Rosenblum, K., et al. (2007). eIF2 α Phosphorylation Bidirectionally Regulates the Switch from Short- to Long-Term Synaptic Plasticity and Memory. *Cell* 129, 195–206.
- Cox, J.S., Shamu, C.E., and Walter, P. (1993). Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 73, 1197–1206.
- Cras, P., Smith, M.A., Richey, P.L., Siedlak, S.L., Mulvihill, P., and Perry, G. (1995). Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 89, 291–295.
- Crawford, F.C., Freeman, M.J., Schinka, J.A., Abdullah, L.I., Gold, M., Hartman, R., Krivian, K., Morris, M.D., Richards, D., Duara, R., et al. (2000). A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology* 55, 763–768.
- Cummings, J.L. (2004). Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 351, 56–67.
- Davies, C.A., Mann, D.M., Sumpter, P.Q., and Yates, P.O. (1987). A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 78, 151–164.

- Davis, S., Butcher, S.P., and Morris, R.G. (1992). The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J. Neurosci.* *12*, 21–34.
- De Duve, C. (2005). The lysosome turns fifty. *Nat. Cell Biol.* *7*, 847–849.
- De Duve, C., Pressman, B., Gianetto, R., Wattiaux, R., and Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* *60*, 604.
- De Strooper, B. (2010). Proteases and Proteolysis in Alzheimer Disease: A Multifactorial View on the Disease Process. *Physiol. Rev.* *90*, 465–494.
- De Strooper, B., and Annaert, W. (2010). Novel Research Horizons for Presenilins and γ -Secretases in Cell Biology and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *26*, 235–260.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., and Van Leuven, F. (1998). Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* *391*, 387–390.
- DeKosky, S.T., and Scheff, S.W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* *27*, 457–464.
- Delacourte, A., and Defossez, A. (1986). Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.* *76*, 173–186.
- Delacourte, A., Sergeant, N., Wattez, A., Maurage, C.-A., Lebert, F., Pasquier, F., and David, J.-P. (2002). Tau aggregation in the hippocampal formation: an ageing or a pathological process? *Exp. Gerontol.* *37*, 1291–1296.
- Delaère, P., Duyckaerts, C., He, Y., Piette, F., and Hauw, J.J. (1991). Subtypes and differential laminar distributions of beta A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *81*, 328–335.
- Delaère, P., He, Y., Fayet, G., Duyckaerts, C., and Hauw, J.J. (1993). Beta A4 deposits are constant in the brain of the oldest old: an immunocytochemical study of 20 French centenarians. *Neurobiol. Aging* *14*, 191–194.
- D'Este, E., Kamin, D., Göttfert, F., El-Hady, A., and Hell, S.W. (2015). STED Nanoscopy Reveals the Ubiquity of Subcortical Cytoskeleton Periodicity in Living Neurons. *Cell Rep.* *10*, 1246–1251.
- Devi, L., and Ohno, M. (2014). PERK mediates eIF2 α phosphorylation responsible for BACE1 elevation, CREB dysfunction and neurodegeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *35*, 2272–2281.
- Dewachter, I., Filipkowski, R.K., Priller, C., Ris, L., Neyton, J., Croes, S., Terwel, D.,

- Gysemans, M., Devijver, H., Borghgraef, P., et al. (2009). Deregulation of NMDA-receptor function and down-stream signaling in APP[V717I] transgenic mice. *Neurobiol. Aging* *30*, 241–256.
- Di Prisco, G.V., Huang, W., Buffington, S.A., Hsu, C.-C., Bonnen, P.E., Placzek, A.N., Sidrauski, C., Krnjević, K., Kaufman, R.J., Walter, P., et al. (2014). Translational control of mGluR-dependent long-term depression and object-place learning by eIF2 α . *Nat. Neurosci.* *17*, 1073–1082.
- Dickerson, B.C., Bakkour, A., Salat, D.H., Feczko, E., Pacheco, J., Greve, D.N., Grodstein, F., Wright, C.I., Blacker, D., Rosas, H.D., et al. (2009). The Cortical Signature of Alzheimer's Disease: Regionally Specific Cortical Thinning Relates to Symptom Severity in Very Mild to Mild AD Dementia and is Detectable in Asymptomatic Amyloid-Positive Individuals. *Cereb. Cortex* *19*, 497–510.
- Dodart, J.-C., Bales, K.R., Gannon, K.S., Greene, S.J., DeMattos, R.B., Mathis, C., DeLong, C.A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D.M., et al. (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.*
- Donnelly, N., Gorman, A.M., Gupta, S., and Samali, A. (2013). The eIF2 α kinases: their structures and functions. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 3493–3511.
- Dubois, Beato, and Kalafat (2002). Avant la démence..., ou les limites du concept de trouble cognitif léger (MCI : mild cognitive impairment). *Médecine/Sciences* *18*, 775–779.
- Dubois, B., Picard, G., and Sarazin, M. (2009). Early detection of Alzheimer's disease: new diagnostic criteria. *Dialogues Clin. Neurosci.* *11*, 135–139.
- Dudek, S.M., and Bear, M.F. (1992). Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 4363–4367.
- Duran-Aniotz, C., Cornejo, V.H., Espinoza, S., Ardiles, Á.O., Medinas, D.B., Salazar, C., Foley, A., Gajardo, I., Thielen, P., Iwawaki, T., et al. (2017). IRE1 signaling exacerbates Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *134*, 489–506.
- Duyckaerts, C., Delatour, B., and Potier, M.-C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *118*, 5–36.
- Dziembowska, M., and Włodarczyk, J. (2012). MMP9: A novel function in synaptic plasticity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 709–713.
- Edgar, J.R., Willen, K., Gouras, G.K., and Futter, C.E. (2015). ESCRTs regulate amyloid precursor protein sorting in multivesicular bodies and intracellular amyloid- accumulation. *J. Cell Sci.* *128*, 2520–2528.
- Embury, C.M., Dyavarshetty, B., Lu, Y., Wiederin, J.L., Ciborowski, P., Gendelman, H.E., and Kiyota, T. (2017). Cathepsin B Improves β -Amyloidosis and Learning and Memory in

Models of Alzheimer's Disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 12, 340–352.

Emiliani, C., Urbanelli, L., Racanicchi, L., Orlacchio, A., Pelicci, G., Sorbi, S., Bernardi, G., and Orlacchio, A. (2003). Up-regulation of Glycohydrolases in Alzheimer's Disease Fibroblasts Correlates with Ras Activation. *J. Biol. Chem.* 278, 38453–38460.

Engert, F., and Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66–70.

Epelbaum, S., Youssef, I., Lacor, P.N., Chaurand, P., Duplus, E., Brugg, B., Duyckaerts, C., and Delatour, B. (2015). Acute amnestic encephalopathy in amyloid- β oligomer-injected mice is due to their widespread diffusion in vivo. *Neurobiol. Aging* 36, 2043–2052.

Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., and Ward, P.J. (1990). Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 1122–1124.

Escobar, M.L., and Derrick, B. (2007). Long-Term Potentiation and Depression as Putative Mechanisms for Memory Formation. In *Neural Plasticity and Memory: From Genes to Brain Imaging*, F. Bermúdez-Rattoni, ed. (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis), p.

Faure, A., Verret, L., Bozon, B., El Tannir El Tayara, N., Ly, M., Kober, F., Dhenain, M., Rampon, C., and Delatour, B. (2011). Impaired neurogenesis, neuronal loss, and brain functional deficits in the APPxPS1-Ki mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 32, 407–418.

Ferreira, S.T., and Klein, W.L. (2011). The A β oligomer hypothesis for synapse failure and memory loss in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Learn. Mem.* 96, 529–543.

Fiala, J.C., Spacek, J., and Harris, K.M. (2008). Chapter 1 : Dendrite structure. In *Dendrites*, Second Edition, G. Stuart, N. Spruston, and M. Häusser, eds. (Oxford University Press), pp. 1–40.

Fifková, E., and Delay, R.J. (1982). Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J. Cell Biol.* 95, 345–350.

Freeman, O.J., and Mallucci, G.R. (2016). The UPR and synaptic dysfunction in neurodegeneration. *Brain Res.* 1648, 530–537.

Fukutani, Y., Cairns, N.J., Shiozawa, M., Sasaki, K., Sudo, S., Isaki, K., and Lantos, P.L. (2000). Neuronal loss and neurofibrillary degeneration in the hippocampal cortex in late-onset sporadic Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 54, 523–529.

Galione, A. (2015). A primer of NAADP-mediated Ca²⁺ signalling: From sea urchin eggs to mammalian cells. *Cell Calcium* 58, 27–47.

Ghosh, P., Dahms, N.M., and Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 202–213.

- Giannakopoulos, P., Herrmann, F.R., Bussiere, T., Bouras, C., Kövari, E., Perl, D.P., Morrison, J.H., Gold, G., and Hof, P.R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 60, 1495–1500.
- Gilbert, B.J. (2013). The role of amyloid β in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Clin. Pathol.* 66, 362–366.
- Glenner, G.G. (1980). Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 302, 1283–1292.
- Glenner, G.G., and Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885–890.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., and James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–706.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519–526.
- Gold, C.A., and Budson, A.E. (2008). Memory loss in Alzheimer's disease: implications for development of therapeutics. *Expert Rev. Neurother.* 8, 1879–1891.
- Golde, T.E., Estus, S., Younkin, L.H., Selkoe, D.J., and Younkin, S.G. (1992). Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* 255, 728–730.
- Goldgaber, D., Lerman, M.I., McBride, O.W., Saffiotti, U., and Gajdusek, D.C. (1987). Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science* 235, 877–880.
- Goley, E.D., and Welch, M.D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 713–726.
- Gómez-Isla, T., Price, J.L., McKeel Jr, D.W., Morris, J.C., Growdon, J.H., and Hyman, B.T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 16, 4491–4500.
- Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J.H., Petersen, R.C., Parisi, J.E., and Hyman, B.T. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 41, 17–24.
- Gong, Y., Chang, L., Viola, K.L., Lacor, P.N., Lambert, M.P., Finch, C.E., Krafft, G.A., and Klein, W.L. (2003). Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A β ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 10417–10422.

- Gouras, G.K., Tsai, J., Naslund, J., Vincent, B., Edgar, M., Checler, F., Greenfield, J.P., Haroutunian, V., Buxbaum, J.D., Xu, H., et al. (2000). Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain. *Am. J. Pathol.* *156*, 15–20.
- Gray, E.G. (1959). Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J. Anat.* *93*, 420.
- Gruart, A. (2006). Involvement of the CA3-CA1 Synapse in the Acquisition of Associative Learning in Behaving Mice. *J. Neurosci.* *26*, 1077–1087.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 317–323.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986a). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 4913–4917.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., and Wisniewski, H.M. (1986b). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* *261*, 6084–6089.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., George, L., Tung, Y.-C., Kim, K.S., and Wisniewski, H.M. (1989). Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *86*, 2853–2857.
- Gyure, K.A., Durham, R., Stewart, W.F., Smialek, J.E., and Troncoso, J.C. (2001). Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *125*, 489–492.
- Haass, C., and Selkoe, D.J. (1993). Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide. *Cell* *75*, 1039–1042.
- Haass, C., Koo, E.H., Mellon, A., Hung, A.Y., and Selkoe, D.J. (1992). Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* *357*, 500–503.
- Haass, C., Lemere, C.A., Capell, A., Citron, M., Seubert, P., Schenk, D., Lannfelt, L., and Selkoe, D.J. (1995). The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat. Med.* *1*, 1291–1296.
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., and Sisodia, S. (2012). Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a006270–a006270.
- Halliday, G. (2003). Identifying severely atrophic cortical subregions in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *24*, 797–806.
- Halliday, M., and Mallucci, G.R. (2015). Review: Modulating the unfolded protein response to prevent neurodegeneration and enhance memory: UPR in neurodegeneration and memory. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *41*, 414–427.

Halliday, M., Radford, H., Sekine, Y., Moreno, J., Verity, N., le Quesne, J., Ortori, C.A., Barrett, D.A., Fromont, C., Fischer, P.M., et al. (2015). Partial restoration of protein synthesis rates by the small molecule ISRIB prevents neurodegeneration without pancreatic toxicity. *Cell Death Dis.* *6*, e1672.

Halliday, M., Radford, H., Zents, K.A.M., Molloy, C., Moreno, J.A., Verity, N.C., Smith, E., Ortori, C.A., Barrett, D.A., Bushell, M., et al. (2017). Repurposed drugs targeting eIF2 α -P-mediated translational repression prevent neurodegeneration in mice. *Brain* *140*, 1768–1783.

Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* *398*, 90.

Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell* *6*, 1099–1108.

Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* *297*, 353–356.

Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* *256*, 184–185.

Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvin, V., Dowzell, K., Williams, A., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* *41*, 1088–1093.

Harris, K.M., and Kater, S.B. (1994). Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu. Rev. Neurosci.* *17*, 341–371.

Harris, K.M., and Stevens, J.K. (1989). Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J. Neurosci.* *9*, 2982–2997.

Harris, K.M., Jensen, F.E., and Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation [published erratum appears in *J Neurosci* 1992 Aug; 12 (8): following table of contents]. *J. Neurosci.* *12*, 2685–2705.

Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell* *10*, 3787–3799.

He, J., Zhou, R., Wu, Z., Carrasco, M.A., Kurshan, P.T., Farley, J.E., Simon, D.J., Wang, G., Han, B., Hao, J., et al. (2016). Prevalent presence of periodic actin-spectrin-based membrane skeleton in a broad range of neuronal cell types and animal species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 6029–6034.

- Heinonen, O., Soininen, H., Sorvari, H., Kosunen, O., Paljärvi, L., Koivisto, E., and Riekkinen, P.J. (1995). Loss of synaptophysin-like immunoreactivity in the hippocampal formation is an early phenomenon in Alzheimer's disease. *Neuroscience* *64*, 375–384.
- Henze, D.A., Card, J.P., Barrionuevo, G., and Ben-Ari, Y. (1997). Large amplitude miniature excitatory postsynaptic currents in hippocampal CA3 pyramidal neurons are of mossy fiber origin. *J. Neurophysiol.* *77*, 1075–1086.
- Hering, H., and Sheng, M. (2001). Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 880–888.
- Herring, B.E., and Nicoll, R.A. (2016). Long-Term Potentiation: From CaMKII to AMPA Receptor Trafficking. *Annu. Rev. Physiol.* *78*, 351–365.
- Hetz, C., and Saxena, S. (2017). ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurol.* *13*, 477–491.
- Holderith, N., Lorincz, A., Katona, G., Rózsa, B., Kulik, A., Watanabe, M., and Nusser, Z. (2012). Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nat. Neurosci.* *15*, 988–997.
- Hoozemans, J.J.M., Veerhuis, R., Van Haastert, E.S., Rozemuller, J.M., Baas, F., Eikelenboom, P., and Scheper, W. (2005). The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *110*, 165–172.
- Hoozemans, J.J.M., van Haastert, E.S., Nijholt, D.A.T., Rozemuller, A.J.M., Eikelenboom, P., and Scheper, W. (2009). The Unfolded Protein Response Is Activated in Pretangle Neurons in Alzheimer's Disease Hippocampus. *Am. J. Pathol.* *174*, 1241–1251.
- Hotulainen, P., and Hoogenraad, C.C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.* *189*, 619–629.
- Hsia, A.Y., Masliah, E., McConlogue, L., Yu, G.Q., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Malenka, R.C., Nicoll, R.A., and Mucke, L. (1999). Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 3228–3233.
- Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2006). AMPAR Removal Underlies A β -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss. *Neuron* *52*, 831–843.
- Hunt, D.L., and Castillo, P.E. (2012). Synaptic plasticity of NMDA receptors: mechanisms and functional implications. *Curr. Opin. Neurobiol.* *22*, 496–508.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., et al. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* *393*, 702–705.
- Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K.L., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Frosch, M.P., Albert, M.S., Hyman, B.T., and Irizarry, M.C. (2004). Early Abeta accumulation and

progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* 62, 925–931.

Inserm (2007). Expertise collective - Maladie d'Alzheimer : Enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux.

Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., and Grundke-Iqbal, I. (2010). Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr. Alzheimer Res.* 7, 656–664.

Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13, 45–53.

Jack, C.R., Petersen, R.C., Xu, Y., O'Brien, P.C., Smith, G.E., Ivnik, R.J., Boeve, B.F., Tangalos, E.G., and Kokmen, E. (2000). Rates of hippocampal atrophy correlate with change in clinical status in aging and AD. *Neurology* 55, 484–490.

Jacobsen, J.S., Wu, C.-C., Redwine, J.M., Comery, T.A., Arias, R., Bowlby, M., Martone, R., Morrison, J.H., Pangalos, M.N., Reinhart, P.H., et al. (2006). Early-onset behavioral and synaptic deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5161–5166.

Jahn, R., and Scheller, R.H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 631–643.

Jalbert, J.J., Daiello, L.A., and Lapane, K.L. (2008). Dementia of the Alzheimer Type. *Epidemiol. Rev.* 30, 15–34.

Jarrett, J.T., and Lansbury, P.T. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055–1058.

Jawhar, S., Trawicka, A., Jenneckens, C., Bayer, T.A., and Wirths, O. (2012). Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 33, 196.e29-40.

Jaworski, T., Kügler, S., and Van Leuven, F. (2010). Modeling of tau-mediated synaptic and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2010.

Jin, L.-W., Shie, F.-S., Maezawa, I., Vincent, I., and Bird, T. (2004). Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid-beta precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities. *Am. J. Pathol.* 164, 975–985.

Jobst, K.A., Smith, A.D., Szatmari, M., Molyneux, A., Esiri, M.E., King, E., Smith, A., Jaskowski, A., McDonald, B., and Wald, N. (1992). Detection in life of confirmed Alzheimer's disease using a simple measurement of medial temporal lobe atrophy by computed tomography. *Lancet Lond. Engl.* 340, 1179–1183.

Johnson, E.C.B., and Kang, J. (2016). A small molecule targeting protein translation does not

rescue spatial learning and memory deficits in the hAPP-J20 mouse model of Alzheimer's disease. *PeerJ* 4, e2565.

Johnson, J.W., and Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325, 529–531.

Jonsson, T., Atwal, J.K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P.V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., et al. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488, 96–99.

Josephs, K.A., Whitwell, J.L., Ahmed, Z., Shiung, M.M., Weigand, S.D., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Parisi, J.E., Petersen, R.C., Dickson, D.W., et al. (2008). β -amyloid burden is not associated with rates of brain atrophy. *Ann. Neurol.* 63, 204–212.

Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., Sisodia, S., and Malinow, R. (2003). APP processing and synaptic function. *Neuron* 37, 925–937.

Kandel, E.R. (2001). Nobel Lecture: the molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Biosci. Rep.* 21, 565–611.

Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., and Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733–736.

Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N., and Nakahara, H. (2003). Structure–stability–function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci.* 26, 360–368.

Kaur, J., and Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 461–472.

Kaur, G., Pawlik, M., Gandy, S.E., Ehrlich, M.E., Smiley, J.F., and Levy, E. (2017). Lysosomal dysfunction in the brain of a mouse model with intraneuronal accumulation of carboxyl terminal fragments of the amyloid precursor protein. *Mol. Psychiatry* 22, 981–989.

Kim, C.H., and Lisman, J.E. (1999). A role of actin filament in synaptic transmission and long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 4314–4324.

Kleckner, N.W., and Dingledine, R. (1988). Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241, 835–837.

Klyubin, I., Betts, V., Welzel, A.T., Blennow, K., Zetterberg, H., Wallin, A., Lemere, C.A., Cullen, W.K., Peng, Y., Wisniewski, T., et al. (2008). Amyloid Protein Dimer-Containing Human CSF Disrupts Synaptic Plasticity: Prevention by Systemic Passive Immunization. *J. Neurosci.* 28, 4231–4237.

Klyubin, I., Cullen, W.K., Hu, N.-W., and Rowan, M.J. (2012). Alzheimer's disease A β assemblies mediating rapid disruption of synaptic plasticity and memory. *Mol. Brain* 5, 25.

Kodam, A., Maulik, M., Peake, K., Amritraj, A., Vetrivel, K.S., Thinakaran, G., Vance, J.E.,

- and Kar, S. (2010). Altered levels and distribution of amyloid precursor protein and its processing enzymes in Niemann-Pick type C1-deficient mouse brains. *Glia* 58, 1267–1281.
- Konietzny, A., Bär, J., and Mikhaylova, M. (2017). Dendritic Actin Cytoskeleton: Structure, Functions, and Regulations. *Front. Cell. Neurosci.* 11.
- Koo, E.H., and Squazzo, S.L. (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 269, 17386–17389.
- Koo, E.H., Squazzo, S.L., Selkoe, D.J., and Koo, C.H. (1996). Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *J. Cell Sci.* 109, 991–998.
- Kopec, C.D. (2006). Glutamate Receptor Exocytosis and Spine Enlargement during Chemically Induced Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* 26, 2000–2009.
- Korkotian, E., Holcman, D., and Segal, M. (2004). Dynamic regulation of spine-dendrite coupling in cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2649–2663.
- Korobova, F., and Svitkina, T. (2010). Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* 21, 165–176.
- Kril, J., Patel, S., Harding, A., and Halliday, G. (2002). Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 103, 370–376.
- Kril, J.J., Hodges, J., and Halliday, G. (2004). Relationship between hippocampal volume and CA1 neuron loss in brains of humans with and without Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 361, 9–12.
- Krucker, T., Siggins, G.R., and Halpain, S. (2000). Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6856–6861.
- Kusters, R., Kapitein, L.C., Hoogenraad, C.C., and Storm, C. (2013). Shape-Induced Asymmetric Diffusion in Dendritic Spines Allows Efficient Synaptic AMPA Receptor Trapping. *Biophys. J.* 105, 2743–2750.
- Lacor, P.N. (2007). Advances on the understanding of the origins of synaptic pathology in AD. *Curr. Genomics* 8, 486–508.
- Lacor, P.N., Buniel, M.C., Furlow, P.W., Sanz Clemente, A., Velasco, P.T., Wood, M., Viola, K.L., and Klein, W.L. (2007). A Oligomer-Induced Aberrations in Synapse Composition, Shape, and Density Provide a Molecular Basis for Loss of Connectivity in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 27, 796–807.
- LaFerla, F.M., Green, K.N., and Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 499–509.

- Lai, E., Teodoro, T., and Volchuk, A. (2007). Endoplasmic Reticulum Stress: Signaling the Unfolded Protein Response. *Physiology* 22, 193–201.
- Lambert, J.-C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M.J., Tavernier, B., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 41, 1094–1099.
- Lang, C., Barco, A., Zablow, L., Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A., and Zakharenko, S.S. (2004). Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16665–16670.
- Langui, D., Girardot, N., El Hachimi, K.H., Allinquant, B., Blanchard, V., Pradier, L., and Duyckaerts, C. (2004). Subcellular topography of neuronal A β peptide in APPxPS1 transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 165, 1465–1477.
- Lanz, T., Carter, D., and Merchant, K. (2003). Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiol. Dis.* 13, 246–253.
- Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bourgeois, A., Pagnotta, S., Biferi, M.-G., Barkats, M., Lacor, P., Klein, W., Bauer, C., and Checler, F. (2016). Intraneuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces A β -independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 132, 257–276.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., and Glimcher, L.H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.* 23, 7448–7459.
- Lee, J.-H., Yu, W.H., Kumar, A., Lee, S., Mohan, P.S., Peterhoff, C.M., Wolfe, D.M., Martinez-Vicente, M., Massey, A.C., Sovak, G., et al. (2010). Lysosomal Proteolysis and Autophagy Require Presenilin 1 and Are Disrupted by Alzheimer-Related PS1 Mutations. *Cell* 141, 1146–1158.
- Lee, J.-H., McBrayer, M.K., Wolfe, D.M., Haslett, L.J., Kumar, A., Sato, Y., Lie, P.P.Y., Mohan, P., Coffey, E.E., Kompella, U., et al. (2015). Presenilin 1 Maintains Lysosomal Ca²⁺ Homeostasis via TRPML1 by Regulating vATPase-Mediated Lysosome Acidification. *Cell Rep.* 12, 1430–1444.
- de Leon, M.J., George, A.E., Stylopoulos, L.A., Smith, G., and Miller, D.C. (1989). Early marker for Alzheimer's disease: the atrophic hippocampus. *Lancet Lond. Engl.* 2, 672–673.
- Lerma, J., and Marques, J.M. (2013). Kainate receptors in health and disease. *Neuron* 80, 292–311.
- Leshchyn'ska, I., and Sytnyk, V. (2016). Reciprocal Interactions between Cell Adhesion Molecules of the Immunoglobulin Superfamily and the Cytoskeleton in Neurons. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 9.

- Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K.H. (2006). A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* *440*, 352–357.
- Levy, A.D., Omar, M.H., and Koleske, A.J. (2014). Extracellular matrix control of dendritic spine and synapse structure and plasticity in adulthood. *Front. Neuroanat.* *8*, 116.
- Levy-Lahad, E., Wijsman, E.M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K.A., Weber, J.L., Bird, T.D., and Schellenberg, G.D. (1995a). A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* *269*, 970–973.
- Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D.M., Oshima, J., Pettingell, W.H., Yu, C.E., Jondro, P.D., Schmidt, S.D., and Wang, K. (1995b). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* *269*, 973–977.
- Li, S., Hong, S., Shepardson, N.E., Walsh, D.M., Shankar, G.M., and Selkoe, D. (2009). Soluble Oligomers of Amyloid β Protein Facilitate Hippocampal Long-Term Depression by Disrupting Neuronal Glutamate Uptake. *Neuron* *62*, 788–801.
- Lisman, J. (1989). A mechanism for the Hebb and the anti-Hebb processes underlying learning and memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *86*, 9574–9578.
- Lisman, J., Yasuda, R., and Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.*
- Liu, D., Zhang, M., and Yin, H. (2013a). Signaling Pathways Involved in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Neuronal Apoptosis. *Int. J. Neurosci.* *123*, 155–162.
- Liu, S.-Y., Wang, W., Cai, Z.-Y., Yao, L.-F., Chen, Z.-W., Wang, C.-Y., Zhao, B., and Li, K.-S. (2013b). Polymorphism –116C/G of Human X-box-Binding Protein 1 Promoter is Associated with Risk of Alzheimer's Disease. *CNS Neurosci. Ther.* *19*, 229–234.
- Lourenco, M.V., Clarke, J.R., Frozza, R.L., Bomfim, T.R., Forny-Germano, L., Batista, A.F., Sathler, L.B., Brito-Moreira, J., Amaral, O.B., Silva, C.A., et al. (2013). TNF- α Mediates PKR-Dependent Memory Impairment and Brain IRS-1 Inhibition Induced by Alzheimer's β -Amyloid Oligomers in Mice and Monkeys. *Cell Metab.* *18*, 831–843.
- Lue, L.-F., Kuo, Y.-M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E., and Rogers, J. (1999). Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* *155*, 853–862.
- Luscher, C., and Malenka, R.C. (2012). NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a005710–a005710.
- Luzio, J.P., Parkinson, M.D.J., Gray, S.R., and Bright, N.A. (2009). The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 1019–1021.
- Lynch, M.A. (2004). Long-Term Potentiation and Memory. *Physiol. Rev.* *84*, 87–136.

- Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2003). Delineation of a Negative Feedback Regulatory Loop That Controls Protein Translation during Endoplasmic Reticulum Stress. *J. Biol. Chem.* 278, 34864–34873.
- Ma, T., Trinh, M.A., Wexler, A.J., Bourbon, C., Gatti, E., Pierre, P., Cavener, D.R., and Klann, E. (2013). Suppression of eIF2 α kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits. *Nat. Neurosci.* 16, 1299–1305.
- Malenka, R.C. (1994). Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell* 78, 535–538.
- Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1999). Long-term potentiation—a decade of progress? *Science* 285, 1870–1874.
- Malinow, R., and Malenka, R.C. (2002). AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 103–126.
- Marciniak, S.J., Yun, C.Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H.P., and Ron, D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 18, 3066–3077.
- Marquer, C., Devauges, V., Cossec, J.-C., Liot, G., Lécart, S., Saudou, F., Duyckaerts, C., Lévêque-Fort, S., and Potier, M.-C. (2011). Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 25, 1295–1305.
- Martina, J.A., Chen, Y., Gucek, M., and Puertollano, R. (2012). MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* 8, 903–914.
- Masliah, E., Terry, R.D., DeTeresa, R.M., and Hansen, L.A. (1989). Immunohistochemical quantification of the synapse-related protein synaptophysin in Alzheimer disease. *Neurosci. Lett.* 103, 234–239.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., and Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4245–4249.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C.R., and Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761–766.
- Matus, A., Ackermann, M., Pehling, G., Byers, H.R., and Fujiwara, K. (1982). High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 7590–7594.
- Mawuenyega, K.G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J.C., Yarasheski, K.E., and Bateman, R.J. (2010). Decreased Clearance of CNS -Amyloid in Alzheimer's Disease. *Science* 330, 1774–1774.

- Mayer, M.L., Westbrook, G.L., and Guthrie, P.B. (1984). Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309, 261–263.
- Mayeux, R., and Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006239–a006239.
- McCaffrey, K., and Braakman, I. (2016). Protein quality control at the endoplasmic reticulum. *Essays Biochem.* 60, 227–235.
- McGlade-McCulloh, E., Yamamoto, H., Tan, S.E., Brickey, D.A., and Soderling, T.R. (1993). Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Nature* 362, 640–642.
- McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I., and Masters, C.L. (1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 46, 860–866.
- Meng, Y., Zhang, Y., Tregoubov, V., Janus, C., Cruz, L., Jackson, M., Lu, W.-Y., MacDonald, J.F., Wang, J.Y., Falls, D.L., et al. (2002). Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron* 35, 121–133.
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., and Sommer, T. (2005). ERAD: the long road to destruction. *Nat. Cell Biol.* 7, 766–772.
- Miermans, C.A., Kusters, R.P.T., Hoogenraad, C.C., and Storm, C. (2017). Biophysical model of the role of actin remodeling on dendritic spine morphology. *PloS One* 12, e0170113.
- Millan Sanchez, M., Heyn, S.N., Das, D., Moghadam, S., Martin, K.J., and Salehi, A. (2012). Neurobiological Elements of Cognitive Dysfunction in Down Syndrome: Exploring the Role of APP. *Biol. Psychiatry* 71, 403–409.
- Mintun, M.A., Larossa, G.N., Sheline, Y.I., Dence, C.S., Lee, S.Y., Mach, R.H., Klunk, W.E., Mathis, C.A., DeKosky, S.T., and Morris, J.C. (2006). [11C]PIB in a nondemented population: potential antecedent marker of Alzheimer disease. *Neurology* 67, 446–452.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069–1075.
- Morena, F., Argentati, C., Trotta, R., Crispoltoni, L., Stabile, A., Pistilli, A., di Baldassarre, A., Calafiore, R., Montanucci, P., Basta, G., et al. (2017). A Comparison of Lysosomal Enzymes Expression Levels in Peripheral Blood of Mild- and Severe-Alzheimer's Disease and MCI Patients: Implications for Regenerative Medicine Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1806.
- Moreno, J.A., Radford, H., Peretti, D., Steinert, J.R., Verity, N., Martin, M.G., Halliday, M., Morgan, J., Dinsdale, D., Ortori, C.A., et al. (2012). Sustained translational repression by eIF2 α -P mediates prion neurodegeneration. *Nature*.
- Moreno, J.A., Halliday, M., Molloy, C., Radford, H., Verity, N., Axten, J.M., Ortori, C.A.,

- Willis, A.E., Fischer, P.M., Barrett, D.A., et al. (2013). Oral Treatment Targeting the Unfolded Protein Response Prevents Neurodegeneration and Clinical Disease in Prion-Infected Mice. *Sci. Transl. Med.* *5*, 206ra138-206ra138.
- Morris, R.G., Anderson, E., Lynch, G.S., and Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* *319*, 774–776.
- Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.-Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of A β 1–42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* *20*, 4050–4058.
- Mueller, S.G., Schuff, N., Yaffe, K., Madison, C., Miller, B., and Weiner, M.W. (2010). Hippocampal atrophy patterns in mild cognitive impairment and Alzheimer’s disease. *Hum. Brain Mapp.* *31*, 1339–1347.
- Mueller-Stainer, S., Zhou, Y., Arai, H., Roberson, E.D., Sun, B., Chen, J., Wang, X., Yu, G., Esposito, L., Mucke, L., et al. (2006). Anti-amyloidogenic and Neuroprotective Functions of Cathepsin B: Implications for Alzheimer’s Disease. *Neuron* *51*, 703–714.
- Mulkey, R.M., and Malenka, R.C. (1992). Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* *9*, 967–975.
- Mulkey, R.M., Endo, S., Shenolikar, S., and Malenka, R.C. (1994). Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature* *369*, 486–488.
- Nägerl, U.V., Eberhorn, N., Cambridge, S.B., and Bonhoeffer, T. (2004). Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* *44*, 759–767.
- Nägerl, U.V., Willig, K.I., Hein, B., Hell, S.W., and Bonhoeffer, T. (2008). Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 18982–18987.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* *403*, 98–103.
- Näslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K.L., Davies, P., Greengard, P., and Buxbaum, J.D. (2000). Correlation between elevated levels of amyloid β -peptide in the brain and cognitive decline. *Jama* *283*, 1571–1577.
- Nelson, P.T., Alafuzoff, I., Bigio, E.H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N.J., Castellani, R.J., Crain, B.J., Davies, P., Tredici, K.D., et al. (2012). Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *71*, 362–381.
- Nilsberth, C., Westlind-Danielsson, A., Eckman, C.B., Condron, M.M., Axelman, K., Forsell,

- C., Stenh, C., Luthman, J., Teplow, D.B., Younkin, S.G., et al. (2001). The “Arctic” APP mutation (E693G) causes Alzheimer’s disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat. Neurosci.* *4*, 887–893.
- Nimchinsky, E.A., Sabatini, B.L., and Svoboda, K. (2002). Structure and Function of Dendritic Spines. *Annu. Rev. Physiol.* *64*, 313–353.
- Nishi, T., and Forgac, M. (2002). THE VACUOLAR (H⁺)-ATPASES — NATURE’S MOST VERSATILE PROTON PUMPS. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 94–103.
- Nishiyama, J., and Yasuda, R. (2015). Biochemical Computation for Spine Structural Plasticity. *Neuron* *87*, 63–75.
- Nixon, R.A., Wegiel, J., Kumar, A., Yu, W.H., Peterhoff, C., Cataldo, A., and Cuervo, A.M. (2005). Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *64*, 113–122.
- Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C.R., and Kasai, H. (2005). Spine-Neck Geometry Determines NMDA Receptor-Dependent Ca²⁺ Signaling in Dendrites. *Neuron* *46*, 609–622.
- Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., and Ron, D. (2001). Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha. *J. Cell Biol.* *153*, 1011–1022.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* *307*, 462–465.
- Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., et al. (2006). Intraneuronal beta-Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer’s Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J. Neurosci.* *26*, 10129–10140.
- O’Connor, T., Sadleir, K.R., Maus, E., Velliquette, R.A., Zhao, J., Cole, S.L., Eimer, W.A., Hitt, B., Bembinster, L.A., Lammich, S., et al. (2008). Phosphorylation of the Translation Initiation Factor eIF2 α Increases BACE1 Levels and Promotes Amyloidogenesis. *Neuron* *60*, 988–1009.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J.D., Murphy, M.P., Golde, T.E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M.P., Akbari, Y., and LaFerla, F.M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer’s disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* *39*, 409–421.
- Oddo, S., Vasilevko, V., Caccamo, A., Kitazawa, M., Cribbs, D.H., and LaFerla, F.M. (2006a). Reduction of Soluble A β and Tau, but Not Soluble A β Alone, Ameliorates Cognitive Decline in Transgenic Mice with Plaques and Tangles. *J. Biol. Chem.* *281*, 39413–39423.

- Oddo, S., Caccamo, A., Smith, I.F., Green, K.N., and LaFerla, F.M. (2006b). A Dynamic Relationship between Intracellular and Extracellular Pools of A β . *Am. J. Pathol.* *168*, 184–194.
- Ohkuma, S., Moriyama, Y., and Takano, T. (1982). Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 2758–2762.
- Okabe, S. (2007). Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Mol. Cell. Neurosci.* *34*, 503–518.
- Okamoto, K.-I., Nagai, T., Miyawaki, A., and Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat. Neurosci.* *7*, 1104–1112.
- Oliet, S.H., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1997). Two distinct forms of long-term depression coexist in CA1 hippocampal pyramidal cells. *Neuron* *18*, 969–982.
- Padamsey, Z., McGuinness, L., Bardo, S.J., Reinhart, M., Tong, R., Hedegaard, A., Hart, M.L., and Emptage, N.J. (2017). Activity-Dependent Exocytosis of Lysosomes Regulates the Structural Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron* *93*, 132–146.
- Page, G., Rioux Bilan, A., Ingrand, S., Lafay-Chebassier, C., Pain, S., Perault Pochat, M.C., Bouras, C., Bayer, T., and Hugon, J. (2006). Activated double-stranded RNA-dependent protein kinase and neuronal death in models of Alzheimer's disease. *Neuroscience* *139*, 1343–1354.
- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljubic, M., Samali, A., and Gorman, A.M. (2016). The integrated stress response. *EMBO Rep.* *17*, 1374–1395.
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., and Ballabio, A. (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 3852–3866.
- Palmieri, M., Pal, R., Nelvagal, H.R., Lotfi, P., Stinnett, G.R., Seymour, M.L., Chaudhury, A., Bajaj, L., Bondar, V.V., Bremner, L., et al. (2017). mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases. *Nat. Commun.* *8*, 14338.
- Pasternak, S.H., Bagshaw, R.D., Guiral, M., Zhang, S., Ackerley, C.A., Pak, B.J., Callahan, J.W., and Mahuran, D.J. (2003). Presenilin-1, nicastrin, amyloid precursor protein, and gamma-secretase activity are co-localized in the lysosomal membrane. *J. Biol. Chem.* *278*, 26687–26694.
- Penazzi, L., Tackenberg, C., Ghori, A., Golovyashkina, N., Niewidok, B., Selle, K., Ballatore, C., Smith, A.B., Bakota, L., and Brandt, R. (2016). A β -mediated spine changes in the hippocampus are microtubule-dependent and can be reversed by a subnanomolar concentration of the microtubule-stabilizing agent epothilone D. *Neuropharmacology* *105*,

84–95.

Peric, A., and Annaert, W. (2015). Early etiology of Alzheimer's disease: tipping the balance toward autophagy or endosomal dysfunction? *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 363–381.

Perluigi, M., Di Domenico, F., and Butterfield, D.A. (2015). mTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy. *Neurobiol. Dis.* 84, 39–49.

Peters, A., Palay, S.L., and Webster, H. deF (1991). *The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells* (New York: Oxford Univ. Press).

Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P.A., Small, S., Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B., et al. (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid β accumulation in mice. *J. Clin. Invest.*

Pitto, M., Raimondo, F., Zoia, C., Brighina, L., Ferrarese, C., and Masserini, M. (2005). Enhanced GM1 ganglioside catabolism in cultured fibroblasts from Alzheimer patients. *Neurobiol. Aging* 26, 833–838.

Platt, F.M., Boland, B., and van der Spoel, A.C. (2012). Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction. *J. Cell Biol.* 199, 723–734.

Podlisny, M.B., Ostaszewski, B.L., Squazzo, S.L., Koo, E.H., Rydell, R.E., Teplow, D.B., and Selkoe, D.J. (1995). Aggregation of secreted amyloid beta-protein into sodium dodecyl sulfate-stable oligomers in cell culture. *J. Biol. Chem.* 270, 9564–9570.

Polito, V.A., Li, H., Martini-Stoica, H., Wang, B., Yang, L., Xu, Y., Swartzlander, D.B., Palmieri, M., di Ronza, A., Lee, V.M.-Y., et al. (2014). Selective clearance of aberrant tau proteins and rescue of neurotoxicity by transcription factor EB. *EMBO Mol. Med.* 6, 1142–1160.

Popovic, M.A., Carnevale, N., Rozsa, B., and Zecevic, D. (2015). Electrical behaviour of dendritic spines as revealed by voltage imaging. *Nat. Commun.* 6, 8436.

Popugaeva, E., Pchitskaya, E., Speshilova, A., Alexandrov, S., Zhang, H., Vlasova, O., and Bezprozvanny, I. (2015). STIM2 protects hippocampal mushroom spines from amyloid synaptotoxicity. *Mol. Neurodegener.* 10.

Pozueta, J., Lefort, R., Ribe, E.M., Troy, C.M., Arancio, O., and Shelanski, M. (2013a). Caspase-2 is required for dendritic spine and behavioural alterations in J20 APP transgenic mice. *Nat. Commun.* 4.

Pozueta, J., Lefort, R., and Shelanski, M.L. (2013b). Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models. *Neuroscience* 251, 51–65.

Price, D.L., Tanzi, R.E., Borchelt, D.R., and Sisodia, S.S. (1998). Alzheimer's disease: genetic studies and transgenic models. *Annu. Rev. Genet.* 32, 461–493.

- Prince, and Jackson (2009). World Alzheimer Report 2009 (Alzheimer's Disease International).
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., and Ferri, C.P. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 9, 63–75.e2.
- Purves, D., Augustine, A., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A.-S., McNamara, J.O., and Williams, S.M. (2004). *Neuroscience*, third edition (Sunderland, Mass: Sinauer Associates, Publishers).
- Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 329–344.
- Radford, H., Moreno, J.A., Verity, N., Halliday, M., and Mallucci, G.R. (2015). PERK inhibition prevents tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 130, 633–642.
- Rajendran, L., and Annaert, W. (2012). Membrane Trafficking Pathways in Alzheimer's Disease: Membrane Trafficking and Alzheimer's Disease. *Traffic* 13, 759–770.
- Rajendran, L., Hoshino, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P., and Simons, K. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11172–11177.
- Ramachandran, B., and Frey, J.U. (2009). Interfering with the Actin Network and Its Effect on Long-Term Potentiation and Synaptic Tagging in Hippocampal CA1 Neurons in Slices In Vitro. *J. Neurosci.* 29, 12167–12173.
- Roczniak-Ferguson, A., Petit, C.S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T.C., and Ferguson, S.M. (2012). The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci. Signal.* 5, ra42.
- Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 519–529.
- Roselli, F. (2005). Soluble β -Amyloid1-40 Induces NMDA-Dependent Degradation of Postsynaptic Density-95 at Glutamatergic Synapses. *J. Neurosci.* 25, 11061–11070.
- Rovelet-Lecrux, A., Hannequin, D., Raux, G., Meur, N.L., Laquerrière, A., Vital, A., Dumanchin, C., Feuillet, S., Brice, A., Vercelletto, M., et al. (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat. Genet.* 38, 24–26.
- Rutkowski, D.T., and Kaufman, R.J. (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* 14, 20–28.
- Rutten, B.P., Van der Kolk, N.M., Schafer, S., van Zandvoort, M.A., Bayer, T.A., Steinbusch, H.W., and Schmitz, C. (2005). Age-Related Loss of Synaptophysin Immunoreactive

Presynaptic Boutons within the Hippocampus of APP751 SL, PS1 M146L, and APP751 SL/PS1 M146L Transgenic Mice. *Am. J. Pathol.* *167*, 161–173.

Ryu, J., Liu, L., Wong, T.P., Wu, D.C., Burette, A., Weinberg, R., Wang, Y.T., and Sheng, M. (2006). A Critical Role for Myosin IIB in Dendritic Spine Morphology and Synaptic Function. *Neuron* *49*, 175–182.

Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 623–635.

Sannerud, R., Esselens, C., Ejsmont, P., Mattera, R., Rochin, L., Tharkeshwar, A.K., De Baets, G., De Wever, V., Habets, R., Baert, V., et al. (2016). Restricted Location of PSEN2/ γ -Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular A β Pool. *Cell* *166*, 193–208.

Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., et al. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* *325*, 473–477.

Sarkar, S., Davies, J.E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., and Rubinsztein, D.C. (2007). Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* *282*, 5641–5652.

Schaeffer, V., Lavenir, I., Ozcelik, S., Tolnay, M., Winkler, D.T., and Goedert, M. (2012). Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. *Brain* *135*, 2169–2177.

Scheff, S. (2003). Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol. Aging* *24*, 1029–1046.

Scheff, S.W., and Price, D.A. (1993). Synapse loss in the temporal lobe in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* *33*, 190–199.

Scheff, S.W., DeKosky, S.T., and Price, D.A. (1990). Quantitative assessment of cortical synaptic density in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *11*, 29–37.

Scheff, S.W., Sparks, L., and Price, D.A. (1993). Quantitative assessment of synaptic density in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* *34*, 356–361.

Scheff, S.W., Price, D.A., Schmitt, F.A., and Mufson, E.J. (2006). Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol. Aging* *27*, 1372–1384.

Scheff, S.W., Price, D.A., Schmitt, F.A., DeKosky, S.T., and Mufson, E.J. (2007). Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* *68*, 1501–1508.

Scheper, W., and Hoozemans, J.J.M. (2015). The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: a neuropathological perspective. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *130*,

315–331.

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T.D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., et al. (1996). 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.* *2*, 864–870.

Schikorski, T., and Stevens, C.F. (2001). Morphological correlates of functionally defined synaptic vesicle populations. *Nat. Neurosci.* *4*, 391–395.

Schliebs, R., and Arendt, T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav. Brain Res.* *221*, 555–563.

Schmitz, C., Rutten, B.P.F., Pielen, A., Schäfer, S., Wirths, O., Tremp, G., Czech, C., Blanchard, V., Multhaup, G., Rezaie, P., et al. (2004). Hippocampal neuron loss exceeds amyloid plaque load in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* *164*, 1495–1502.

Schultz, M.L., Tecedor, L., Chang, M., and Davidson, B.L. (2011). Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends Neurosci.* *34*, 401–410.

Sekhon, S.S., and Maxwell, D.S. (1974). Ultrastructural changes in neurons of the spinal anterior horn of ageing mice with particular reference to the accumulation of lipofuscin pigment. *J. Neurocytol.* *3*, 59–72.

Selkoe, D.J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav. Brain Res.* *192*, 106–113.

Selkoe, D.J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* *8*, 595–608.

Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., and Hyman, B.T. (2011). Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *1*, a006189–a006189.

Seshadri, S., Fitzpatrick, A.L., Ikram, M.A., DeStefano, A.L., Gudnason, V., Boada, M., Bis, J.C., Smith, A.V., Carassquillo, M.M., Lambert, J.C., et al. (2010). Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* *303*, 1832–1840.

Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., et al. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* *332*, 1429–1433.

Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., and Vellard, M.C. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* *31*, 1095–1108.

Settembre, C., Fraldi, A., Medina, D.L., and Ballabio, A. (2013). Signals from the lysosome: a control centre for cellular clearance and energy metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 283–296.

Shamu, C.E., and Walter, P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* *15*, 3028–3039.

Shankar, G.M., Bloodgood, B.L., Townsend, M., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., and Sabatini, B.L. (2007). Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway. *J. Neurosci.* *27*, 2866–2875.

Shankar, G.M., Li, S., Mehta, T.H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N.E., Smith, I., Brett, F.M., Farrell, M.A., Rowan, M.J., Lemere, C.A., et al. (2008). Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat. Med.* *14*, 837–842.

Shen, H.-M., and Mizushima, N. (2014). At the end of the autophagic road: an emerging understanding of lysosomal functions in autophagy. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 61–71.

Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y., Rogaeva, E.A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., et al. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* *375*, 754–760.

Shore, G.C., Papa, F.R., and Oakes, S.A. (2011). Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr. Opin. Cell Biol.* *23*, 143–149.

Shrestha, B.R., Vitolo, O.V., Joshi, P., Lordkipanidze, T., Shelanski, M., and Dunaevsky, A. (2006). Amyloid β peptide adversely affects spine number and motility in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* *33*, 274–282.

Sidenstein, S.C., D'Este, E., Böhm, M.J., Danzl, J.G., Belov, V.N., and Hell, S.W. (2016). Multicolour Multilevel STED nanoscopy of Actin/Spectrin Organization at Synapses. *Sci. Rep.* *6*, 26725.

Sidrauski, C., and Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* *90*, 1031–1039.

Sidrauski, C., Acosta-Alvear, D., Khoutorsky, A., Vedantham, P., Hearn, B.R., Li, H., Gamache, K., Gallagher, C.M., Ang, K.K., and Wilson, C. (2013). Pharmacological brake-release of mRNA translation enhances cognitive memory. *Elife* *2*, e00498.

Sidrauski, C., Tsai, J.C., Kampmann, M., Hearn, B.R., Vedantham, P., Jaishankar, P., Sokabe, M., Mendez, A.S., Newton, B.W., Tang, E.L., et al. (2015a). Pharmacological dimerization and activation of the exchange factor eIF2B antagonizes the integrated stress response. *ELife* *4*, e07314.

Sidrauski, C., McGeachy, A.M., Ingolia, N.T., and Walter, P. (2015b). The small molecule ISRIB reverses the effects of eIF2 α phosphorylation on translation and stress granule assembly. *Elife* *4*, e05033.

- Siman, R., Cocca, R., and Dong, Y. (2015). The mTOR Inhibitor Rapamycin Mitigates Perforant Pathway Neurodegeneration and Synapse Loss in a Mouse Model of Early-Stage Alzheimer-Type Tauopathy. *PLOS ONE* *10*, e0142340.
- Simić, G., Kostović, I., Winblad, B., and Bogdanović, N. (1997). Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J. Comp. Neurol.* *379*, 482–494.
- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., et al. (1999). Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* *402*, 537–540.
- Sisodia, S.S. (1992). Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 6075–6079.
- Sisodia, S.S., Koo, E.H., Beyreuther, K., Unterbeck, A., and Price, D.L. (1990). Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* *248*, 492–495.
- Sitia, R., and Braakman, I. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* *426*, 891–894.
- Sleat, D.E., Jadot, M., and Lobel, P. (2007). Lysosomal proteomics and disease. *PROTEOMICS – Clin. Appl.* *1*, 1134–1146.
- Smith, M.H., Ploegh, H.L., and Weissman, J.S. (2011). Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science* *334*, 1086–1090.
- Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., Nairn, A.C., Salter, M.W., Lombroso, P.J., Gouras, G.K., et al. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . *Nat. Neurosci.* *8*, 1051–1058.
- Sobczyk, A. (2005). NMDA Receptor Subunit-Dependent $[Ca^{2+}]$ Signaling in Individual Hippocampal Dendritic Spines. *J. Neurosci.* *25*, 6037–6046.
- Soriano, S., Chyung, A.S., Chen, X., Stokin, G.B., Lee, V.M., and Koo, E.H. (1999). Expression of beta-amyloid precursor protein-CD3 γ chimeras to demonstrate the selective generation of amyloid beta(1-40) and amyloid beta(1-42) peptides within secretory and endocytic compartments. *J. Biol. Chem.* *274*, 32295–32300.
- Spilman, P., Podlutskaya, N., Hart, M.J., Debnath, J., Gorostiza, O., Bredesen, D., Richardson, A., Strong, R., and Galvan, V. (2010). Inhibition of mTOR by Rapamycin Abolishes Cognitive Deficits and Reduces Amyloid- β Levels in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* *5*, e9979.
- Spires, T.L., Meyer-Luehmann, M., Stern, E.A., McLean, P.J., Skoch, J., Nguyen, P.T., Bacskai, B.J., and Hyman, B.T. (2005). Dendritic spine abnormalities in amyloid precursor protein transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy.

J. Neurosci. 25, 7278–7287.

Squire, L.R., Bloom, F.E., Spitzer, N.C., du Lac, S., Ghosh, A., and Berg, D. (2008). *Fundamental neuroscience*, third edition (Amsterdam ; Boston: Elsevier / Academic Press).

St George-Hyslop, P., Haines, J., Rogaev, E., Mortilla, M., Vaula, G., Pericak-Vance, M., Foncin, J.F., Montesi, M., Bruni, A., Sorbi, S., et al. (1992). Genetic evidence for a novel familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Nat. Genet.* 2, 330–334.

Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993). 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.* 90, 1977–1981.

Stutzbach, L.D., Xie, S.X., Naj, A.C., Albin, R., Gilman, S., PSP Genetics Study Group, Lee, V.M.Y., Trojanowski, J.Q., Devlin, B., and Schellenberg, G.D. (2013). The unfolded protein response is activated in disease-affected brain regions in progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 1, 31.

Suen, K.-C., Yu, M.-S., So, K.-F., Chang, R.C.-C., and Hugon, J. (2003). Upstream Signaling Pathways Leading to the Activation of Double-stranded RNA-dependent Serine/Threonine Protein Kinase in β -Amyloid Peptide Neurotoxicity. *J. Biol. Chem.* 278, 49819–49827.

Sun, B., Zhou, Y., Halabisky, B., Lo, I., Cho, S.-H., Mueller-Steiner, S., Devidze, N., Wang, X., Grubb, A., and Gan, L. (2008). Cystatin C-Cathepsin B Axis Regulates Amyloid Beta Levels and Associated Neuronal Deficits in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Neuron* 60, 247–257.

Sze, C.I., Troncoso, J.C., Kawas, C., Mouton, P., Price, D.L., and Martin, L.J. (1997). Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 933–944.

Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., and Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 7, 880–885.

Tabas, I., and Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat. Cell Biol.* 13, 184–190.

Tackenberg, C., and Brandt, R. (2009). Divergent Pathways Mediate Spine Alterations and Cell Death Induced by Amyloid-, Wild-Type Tau, and R406W Tau. *J. Neurosci.* 29, 14439–14450.

Takahashi, R.H., Milner, T.A., Li, F., Nam, E.E., Edgar, M.A., Yamaguchi, H., Beal, M.F., Xu, H., Greengard, P., and Gouras, G.K. (2002). Intraneuronal Alzheimer abeta₄₂ accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology. *Am. J. Pathol.* 161, 1869–1879.

Takahashi, R.H., Nagao, T., and Gouras, G.K. (2017). Plaque formation and the intraneuronal

accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease: Intraneuronal accumulation of β -amyloid. *Pathol. Int.* 67, 185–193.

Takasaki, K., and Sabatini, B.L. (2014). Super-resolution 2-photon microscopy reveals that the morphology of each dendritic spine correlates with diffusive but not synaptic properties. *Front. Neuroanat.* 8.

Takasugi, N., Tomita, T., Hayashi, I., Tsuruoka, M., Niimura, M., Takahashi, Y., Thinakaran, G., and Iwatsubo, T. (2003). The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex. *Nature* 422, 438–441.

Takumi, Y., Ramírez-León, V., Laake, P., Rinvik, E., and Ottersen, O.P. (1999). Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat. Neurosci.* 2, 618–624.

Tammineni, P., Jeong, Y.Y., Feng, T., Aikal, D., and Cai, Q. (2017). Impaired axonal retrograde trafficking of the retromer complex augments lysosomal deficits in Alzheimer's disease neurons. *Hum. Mol. Genet.*

Tampellini, D., Rahman, N., Gallo, E.F., Huang, Z., Dumont, M., Capetillo-Zarate, E., Ma, T., Zheng, R., Lu, B., Nanus, D.M., et al. (2009). Synaptic activity reduces intraneuronal A β , promotes APP transport to synapses, and protects against A β -related synaptic alterations. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 9704–9713.

Tampellini, D., Capetillo-Zarate, E., Dumont, M., Huang, Z., Yu, F., Lin, M.T., and Gouras, G.K. (2010). Effects of synaptic modulation on beta-amyloid, synaptophysin, and memory performance in Alzheimer's disease transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 14299–14304.

Tanzi, R.E. (2012). The Genetics of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006296–a006296.

Tanzi, R.E., Gusella, J.F., Watkins, P.C., Bruns, G.A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M.L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D.M., and Neve, R.L. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880–884.

Tarawneh, R., and Holtzman, D.M. (2012). The clinical problem of symptomatic Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006148.

Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L.A., and Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 30, 572–580.

Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002). Phases of A β deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58, 1791–1800.

Thoreen, C.C., and Sabatini, D.M. (2009). Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely.

Autophagy 5, 725–726.

Thoreen, C.C., Kang, S.A., Chang, J.W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L.J., Sim, T., Sabatini, D.M., and Gray, N.S. (2009). An ATP-competitive Mammalian Target of Rapamycin Inhibitor Reveals Rapamycin-resistant Functions of mTORC1. *J. Biol. Chem.* 284, 8023–8032.

Togashi, H., Sakisaka, T., and Takai, Y. (2009). Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell Adhes. Migr.* 3, 29–35.

Tønnesen, J., and Nägerl, U.V. (2016). Dendritic Spines as Tunable Regulators of Synaptic Signals. *Front. Psychiatry* 7.

Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B., and Nägerl, U.V. (2014). Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nat. Neurosci.* 17, 678–685.

Torres, M., Jimenez, S., Sanchez-Varo, R., Navarro, V., Trujillo-Estrada, L., Sanchez-Mejias, E., Carmona, I., Davila, J.C., Vizuete, M., Gutierrez, A., et al. (2012). Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol. Neurodegener.* 7, 59.

Townsend, M., Shankar, G.M., Mehta, T., Walsh, D.M., and Selkoe, D.J. (2006). Effects of secreted oligomers of amyloid β -protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers: Amyloid β -protein and hippocampal synaptic plasticity. *J. Physiol.* 572, 477–492.

Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–496.

Trinh, M.A., Ma, T., Kaphzan, H., Bhattacharya, A., Antion, M.D., Cavener, D.R., Hoeffler, C.A., and Klann, E. (2014). The eIF2 kinase PERK limits the expression of hippocampal metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *Learn. Mem.* 21, 298–304.

Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (1995). Phosphorylation of paired helical filament tau in Alzheimer's disease neurofibrillary lesions: focusing on phosphatases. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 9, 1570–1576.

Unterberger, U., Höftberger, R., Gelpi, E., Flicker, H., Budka, H., and Voigtländer, T. (2006). Endoplasmic reticulum stress features are prominent in Alzheimer disease but not in prion diseases in vivo. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 348–357.

Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664–666.

Urbanelli, L., Emiliani, C., Massini, C., Persichetti, E., Orlacchio, A., Pelicci, G., Sorbi, S., Hasilik, A., Bernardi, G., and Orlacchio, A. (2008). Cathepsin D expression is decreased in

Alzheimer's disease fibroblasts. *Neurobiol. Aging* 29, 12–22.

Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., et al. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741.

Vereecken, T.H., Vogels, O.J., and Nieuwenhuys, R. (1994). Neuron loss and shrinkage in the amygdala in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 15, 45–54.

Walsh, D.M. (2005). Certain Inhibitors of Synthetic Amyloid -Peptide (A) Fibrillogenesis Block Oligomerization of Natural A and Thereby Rescue Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* 25, 2455–2462.

Walsh, D.M., Tseng, B.P., Rydel, R.E., Podlisny, M.B., and Selkoe, D.J. (2000). The Oligomerization of Amyloid β -Protein Begins Intracellularly in Cells Derived from Human Brain [†]. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 10831–10839.

Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002a). Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539.

Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002b). Amyloid- β oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition (Portland Press Limited).

Walter, P., and Ron, D. (2011). The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* 334, 1081–1086.

Wang, M., and Kaufman, R.J. (2016). Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature* 529, 326–335.

Wang, H.-W., Pasternak, J.F., Kuo, H., Ristic, H., Lambert, M.P., Chromy, B., Viola, K.L., Klein, W.L., Stine, W.B., Krafft, G.A., et al. (2002). Soluble oligomers of β amyloid (1-42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res.* 924, 133–140.

Wang, X., Bozdagi, O., Nikitczuk, J.S., Zhai, Z.W., Zhou, Q., and Huntley, G.W. (2008). Extracellular proteolysis by matrix metalloproteinase-9 drives dendritic spine enlargement and long-term potentiation coordinately. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 19520–19525.

Wang, X., Zhou, X., Li, G., Zhang, Y., Wu, Y., and Song, W. (2017). Modifications and Trafficking of APP in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front. Mol. Neurosci.* 10.

West, M.J., Coleman, P.D., Flood, D.G., and Troncoso, J.C. (1994). Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Lond. Engl.* 344, 769–772.

Whitehouse, P.J., Price, D.L., Clark, A.W., Coyle, J.T., and DeLong, M.R. (1981). Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis. *Ann. Neurol.*

10, 122–126.

Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., and Bear, M.F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science* 313, 1093–1097.

Whitwell, J.L. (2010). Progression of Atrophy in Alzheimer's Disease and Related Disorders. *Neurotox. Res.* 18, 339–346.

Whitwell, J.L., Josephs, K.A., Murray, M.E., Kantarci, K., Przybelski, S.A., Weigand, S.D., Vemuri, P., Senjem, M.L., Parisi, J.E., and Knopman, D.S. (2008). MRI correlates of neurofibrillary tangle pathology at autopsy A voxel-based morphometry study. *Neurology* 71, 743–749.

Whyte, L.S., Lau, A.A., Hemsley, K.M., Hopwood, J.J., and Sargeant, T.J. (2017). Endo-lysosomal and autophagic dysfunction: a driving factor in Alzheimer's disease? *J. Neurochem.* 140, 703–717.

Wiegert, J.S., and Oertner, T.G. (2013). Long-term depression triggers the selective elimination of weakly integrated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E4510–E4519.

Wilcox, K.C., Lacor, P.N., Pitt, J., and Klein, W.L. (2011). A β Oligomer-Induced Synapse Degeneration in Alzheimer's Disease. *Cell. Mol. Neurobiol.* 31, 939–948.

Wimo, and Prince (2010). World Alzheimer Report 2010, The global economic impact of dementia (Alzheimer's Disease International).

Wirhth, O., and Bayer, T.A. (2010). Neuron Loss in Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2010, 1–6.

Wirhth, O., and Bayer, T.A. (2012). Intraneuronal A β accumulation and neurodegeneration: lessons from transgenic models. *Life Sci.* 91, 1148–1152.

Wirhth, O., Multhaup, G., Czech, C., Blanchard, V., Moussaoui, S., Tremp, G., Pradier, L., Beyreuther, K., and Bayer, T.A. (2001). Intraneuronal A β accumulation precedes plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 double-transgenic mice. *Neurosci. Lett.* 306, 116–120.

Wirhth, O., Multhaup, G., Czech, C., Feldmann, N., Blanchard, V., Tremp, G., Beyreuther, K., Pradier, L., and Bayer, T.A. (2002). Intraneuronal APP/A β trafficking and plaque formation in beta-amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenic mice. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 12, 275–286.

Wirhth, O., Multhaup, G., and Bayer, T.A. (2004). A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide--the first step of a fatal cascade. *J. Neurochem.* 91, 513–520.

Wisniewski, K.E., Wisniewski, H.M., and Wen, G.Y. (1985). Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann. Neurol.* 17, 278–282.

- Xiao, Q., Yan, P., Ma, X., Liu, H., Perez, R., Zhu, A., Gonzales, E., Tripoli, D.L., Czerniewski, L., Ballabio, A., et al. (2015). Neuronal-Targeted TFEB Accelerates Lysosomal Degradation of APP, Reducing A Generation and Amyloid Plaque Pathogenesis. *J. Neurosci.* *35*, 12137–12151.
- Xu, K., Zhong, G., and Zhuang, X. (2013). Actin, Spectrin, and Associated Proteins Form a Periodic Cytoskeletal Structure in Axons. *Science* *339*, 452–456.
- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev. Cell* *13*, 365–376.
- Yamazaki, T., Koo, E.H., and Selkoe, D.J. (1996). Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *J. Cell Sci.* *109*, 999–1008.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., et al. (1999). Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* *402*, 533–537.
- Yang, D.-S., Stavrides, P., Mohan, P.S., Kaushik, S., Kumar, A., Ohno, M., Schmidt, S.D., Wesson, D., Bandyopadhyay, U., Jiang, Y., et al. (2011). Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain* *134*, 258–277.
- Yang, W., Zhou, X., Zimmermann, H.R., Cavener, D.R., Klann, E., and Ma, T. (2016). Repression of the eIF2 α kinase PERK alleviates mGluR-LTD impairments in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *41*, 19–24.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell* *6*, 1355–1364.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* *107*, 881–891.
- Younkin, S.G., and Steven (1998). The role of Ab42 in Alzheimer's disease. *J Physiology* *92*, 289–292.
- Yu, W.H., Cuervo, A.M., Kumar, A., Peterhoff, C.M., Schmidt, S.D., Lee, J.-H., Mohan, P.S., Mercken, M., Farmery, M.R., Tjernberg, L.O., et al. (2005). Macroautophagy—a novel β -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* *171*, 87–98.
- Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* *24*, 1071–1089.

Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 107–117.

Zhou, J., Tan, S.-H., Nicolas, V., Bauvy, C., Yang, N.-D., Zhang, J., Xue, Y., Codogno, P., and Shen, H.-M. (2013). Activation of lysosomal function in the course of autophagy via mTORC1 suppression and autophagosome-lysosome fusion. *Cell Res.* 23, 508–523.

Zhou, Q., Homma, K.J., and Poo, M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44, 749–757.

Zhu, P.J., Huang, W., Kalikulov, D., Yoo, J.W., Placzek, A.N., Stoica, L., Zhou, H., Bell, J.C., Friedlander, M.J., Krnjević, K., et al. (2011). Suppression of PKR Promotes Network Excitability and Enhanced Cognition by Interferon- γ -Mediated Disinhibition. *Cell* 147, 1384–1396.

Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., and Sabatini, D.M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science* 334, 678–683.

Zou, C., Montagna, E., Shi, Y., Peters, F., Blazquez-Llorca, L., Shi, S., Filser, S., Dorostkar, M.M., and Herms, J. (2015). Intraneuronal APP and extracellular A β independently cause dendritic spine pathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 909–920.