Université catholique de Louvain

Institute of Neuroscience

Alzheimer dementia group

Transcriptional regulation and neuronal activity controlled by the Amyloid Precursor Protein

Thèse soumise en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences biomédicales et pharmaceutiques

Secteur des sciences de la santé

Rémi Opsomer

Promoteur: Pr. Pascal Kienlen-Campard

Co-promoteur: Pr. Jean-Noël Octave

Le doctorat avec ses joies, ses difficultés, ses rencontres et ses découvertes reste une opportunité unique qu'il convient de réaliser avec motivation, fierté et courage en gardant à l'esprit qu'il constitue un privilège de pouvoir faire évoluer les connaissances scientifiques pour le bien de tous.

Composition du jury

Promoteur :

Pr. Pascal Kienlen-Campard (*Institute of Neuroscience, Alzheimer dementia*)

Co-promoteur :

Pr. Jean-Noël Octave (*Institute of Neuroscience, Alzheimer dementia*)

Président :

Pr. Frédéric Clotman (*Institute of Neuroscience, Laboratory of Neural Differentiation*)

Membres du comité d'accompagnement :

Pr. Charles De Smet (*de Duve Institute, Laboratory of Genetics and Epigenetics)*

Pr. Thomas Michiels (*de Duve Institute, Laboratory of Virology*)

Membres externes :

Dr. Raphaëlle Pardossi-Piquard (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR7275, Valbonne, France).

Pr. Nicolas Sergeant (Centre Jean Pierre Aubert, IMPRT, Univ. Lille Nord de France, INSERM UMRS1172, Lille, France).

Remerciements

Avant d'aborder l'ensemble du travail de thèse présenté dans ce manuscrit, j'aimerais dédier les quelques paragraphes suivants aux personnes qui, au devant de la scène ou dans l'ombre, ont contribué à l'aboutissement de cette fabuleuse aventure qu'est le doctorat. Ces mêmes personnes n'ont pas seulement contribué à la réussite de cette formation, elles ont également façonné ma vie tant au niveau professionnel qu'au niveau personnel. À bien des égards, celles-ci méritent un immense merci pour m'avoir formé, appris, fait confiance, supporté, soutenu et encouragé.

Les premiers remerciements reviennent tout d'abord à mon promoteur, **Pascal** grâce à qui j'ai eu la chance de pouvoir évoluer scientifiquement et personnellement durant ces cinq dernières années : je t'ai rencontré dans le cadre du cours de biologie générale il y maintenant 10 ans. D'abord, cette singularité qui te caractérisait à l'époque, et encore aujourd'hui, m'a marquée et elle a certainement joué un rôle important lorsque j'ai choisi de m'arrêter dans ton laboratoire pour réaliser mon doctorat. Ensuite, la liberté scientifique que tu m'as laissée a été totale et à mes yeux, elle est un élément essentiel à donner aux chercheurs pour qu'ils puissent évoluer et surtout *faire ce qu'ils veulent, car c'est ce qu'ils feront de mieux* [*Christian de Duve*]. Puis, malgré ton emploi du temps toujours chargé, tu as toujours la porte de ton bureau ouverte pour répondre à mes questions, mes doutes et « penser la « Science » » avec moi. Après, dans les moments compliqués (et il y en a eu), tu as toujours trouvé les mots pour me redonner la pêche et l'envie de continuer et de clôturer : je rentre dans ton bureau la gorge serrée, le moral dans les chaussettes et j'en ressors avec la banane et l'envie de casser la baraque. Je te dis donc merci pour tes conseils, tes corrections, les incroyables discussions à la *cafèt*, les moments « football », … et surtout merci pour la confiance que tu m'as donnée depuis le début de cette aventure. Elle m'a permis de m'épanouir et d'évoluer de la meilleure des manières durant ma jeune carrière scientifique.

Ensuite, il y a **Bernadette**. Nous avons commencé à travailler quotidiennement ensemble en novembre 2016 mais notre entente date depuis mon arrivée au laboratoire. Bernadette, c'est avec toi que j'ai

certainement appris le plus de choses sur les techniques du laboratoire et sur la manière de bien ordonner les manips. Je suis curieux et j'ai énormément apprécié lorsque tu m'expliquais comment vous faisiez à « l'époque » lorsque les « kits » n'existaient pas : le séquençage d'ADN à décoder nucléotide par nucléotide, les préparations plasmidiques au chlorure de sésium, la préparation des banques cDNA à partir de cerveaux humains, … des moments qui resteront gravés dans ma mémoire. Je suis heureux d'avoir pu profiter de ton immense expérience et de tes nombreuses astuces. Je t'admire aussi car tu fais partie des personnes qui se soucient beaucoup de leur travail et qui ne dorment pas bien si tout n'a pas été parfaitement réalisé. Je te remercie pour l'aide précieuse dans les génotypages, les infections, les cultures, les Western blots, les qPCR, la préparation des lentivirus, les ICCs et j'en passe. A côté du travail, nous nous sommes liés d'amitié et ta présence a toujours été d'un réconfort indispensable dans les moments difficiles. Les « télématins », les discussions quotidiennes et les fous rires vont me manquer à coup sûr mais nous nous reverrons aussi souvent que possible pour « papoter ». Malheureusement, ton départ du laboratoire est proche et cela provoquera un grand vide pour tous.

Jean-Noël, je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre laboratoire pour réaliser cette thèse. Je vous remercie également pour les conseils et commentaires toujours clairvoyants durant les « labmeeting » et pour la disponibilité dont vous avez fait preuve pendant ces nombreuses années.

Serena, tu es l'une des personnes que j'ai eu la chance de côtoyer depuis le début dans le laboratoire. Tu es partie il y a peu de temps et l'ambiance qui règnait ce vendredi 29 juin, ton dernier jour, traduisait très bien l'importance que tu avais dans le laboratoire pour nous tous. Merci pour tes conseils scientifiques éclairés, ton implication dans mon travail, ta disponibilité, tes encouragements dans les moments difficiles. Et surtout merci pour la bonne humeur que tu apportais au laboratoire à travers ta joie, tes rires et ton énergie positive à 200%. Je n'oublierai jamais les moments passés à l'animalerie à raconter les épisodes Netflix, ceux de nos vies avec les bons et les moins bons moments. Certaines périodes ont été difficiles pour nous mais ces moments « animalerie » ont contribué grandement à les

surmonter. En plus d'une collègue, j'ai la chance de pouvoir te compter parmi mes amis. Je te souhaite tout le meilleur pour ta future carrière scientifique.

Sabrina et Céline, les filles du groupe. Bien que nous nous sommes rencontrés à différents moments de nos parcours éducatifs, nous nous sommes rapidement entendus. Toujours présentes pour m'aider et m'encourager, vous avez contribué à transformer la vie quotidienne du laboratoire. À différents moments, vos motivations de jeunes *PhD student* m'ont permis de relever la tête dans les moments difficiles, j'espère pouvoir avec ces quelques phrases vous motiver à mon tour lorsque ces mêmes moments arriveront pour vous (le plus tard ou jamais si possible). **Sabrina**, sois sereine, tu es une incroyable scientifique. Je ne connais personne qui a pu gérer (seule) un projet scientifique complètement nouveau au laboratoire avec une si grande classe et avec, à la clé, une incroyable publication ! Tes grandes forces sont certainement la persévérance et l'intégrité scientifique dont tu fais preuve. *May the force be with you*. **Céline**, en 2 ans, j'ai pu apprécier la quantité de travail que tu as abattue : une publication et une bonne centaine de blots au compteur. Ta motivation, ton sens de l'organisation et ta rigueur sont admirables et t'aideront à réussir ton doctorat de la plus belle des manières, j'en suis sûr ! A coté du labo, j'ai la chance de vous compter comme des amies très proches avec qui les midis, les repas et les soirées sont toujours mémorables. Ces nombreux moments avec **vous** resteront à jamais dans ma mémoire. Merci pour tout !

Florian, le seul autre garçon du groupe de Pascal. Je suis très content d'avoir pu collaborer avec toi sur de nombreux projets et expériences pilotes. J'admire ta faculté à t'être adapté si facilement à deux laboratoires, à deux promoteurs et à une situation financière de doctorat des plus pénibles. Ta combativité et ta motivation à toute épreuve seront tes plus grandes armes pour arriver au bout de cette aventure. Tu es un excellent scientifique toujours prêt à donner un coup de main aux autres même lorsque ta situation est critique. Je te remercie pour ton aide et également pour les incroyables moments passé en ta compagnie, à Londres notamment. Je te souhaite une carrière scientifique des plus prospères.

Anna, il y aurait tant de choses à dire sur notre chemin commun. Bien qu'en master ensemble, c'est en doctorat que j'ai appris à connaitre la vraie Anna : une scientifique brillante avec qui j'ai eu la chance de collaborer et d'implémenter de nouvelles techniques au laboratoire. Tu es une amie et maintenant aussi une future collègue. Nos chemins parallèles ne semblent pas s'arrêter avec le doctorat et j'en suis fort content. Merci aussi pour tes conseils et l'aide que tu m'as apportée.

Cosmo, merci pour toutes les choses que tu m'as apprises depuis la culture neuronale jusqu'à la dissection des cerveaux de souris. Tu as toujours été là pour donner un coup de main et donner ton astuce de docteur. Tu es un scientifique hors pair et un sacré ami !

Pierre et **Maxime**, le duo doctoral de choc du laboratoire voisin. Merci pour les excellents moments passés ensemble à discuter science et à blaguer. Merci aussi pour l'aide et les conseils clairvoyants que vous m'avez apportés. Grâce à vous, je crois que nos laboratoires n'ont jamais été aussi complices que maintenant. Je suis content de pouvoir vous compter comme de très chers amis. Que le futur vous soit heureux et prospère.

Nathalie, merci pour ton aide et tes conseils scientifiques toujours justes, adéquats et sincères. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite ta carrière.

Maria, **Cathy, Sophie et Raphaël**, notre staff administratif et comptable. Un grand merci pour le travail de l'ombre que vous faites pour faire tourner le laboratoire et pour nous permettre de faire nos recherches dans les meilleures conditions. Merci surtout pour les demandes « express » ou « urgentes » que nous avons l'habitude de vous imposer en dernière minute parce que nous avons « oublié » et merci encore pour les solutions administratives que vous trouvez si rapidement pendant que nous nageons dans les méandres de l'administration. **Romelia**, tu fais partie de ces travailleurs de l'ombre également. Bien avant notre arrivée le matin, tu as déjà nettoyé notre vaisselle, organisé l'élimination de nos déchets et changé les animaux du laboratoire. Merci pour toutes ces tâches que tu réalises au quotidien et qui nous aident sans même que nous nous en rendions compte.

Simon, on se connait depuis le début de nos études et nous avons gardé contact tout au long de nos doctorats respectifs. Merci d'avoir partagé avec moi de longues discussions sur nos projets et sur la science en général. Je te souhaite une merveilleuse carrière scientifique car tu fais partie des meilleurs que je connaisse.

Merci encore à **Bruno**, **Alexandre**, **Matthew**, **Ilse**, **Claudia**, **Marie**, **Nathalie D**, **Inês**, **Amandine**, **Gauhar, Stéphanie, Mathilde, Audrey, Paul-Emile**, **Maureen**, **Mattia**, **Pauline**, **Florian**, **Anselmo, Devkee, Francisco, Floriane** et tous ceux que j'aurais oubliés, pour les bons moments passés ensemble.

Je tiens à remercier énormément **mes parents** sans qui cette aventure n'aurait jamais commencé. Ils m'ont offert la possibilité de faire ces études et m'ont toujours soutenu sur cette voie. La fierté qu'ils m'ont témoignée m'a toujours poussé à continuer et à persévérer dans les moments difficiles. Merci à mon **frère** et à ma **sœur** pour leur soutien sans faille tout au long de ces années.

Je finirai par remercier la personne qui compte le plus à mes yeux, ma femme **Ophélie**. Son soutien, ses encouragements, sa grande patience et sa tolérance ne sont qu'une petite partie de son implication dans mes études et dans mon doctorat. Elle m'a toujours poussé à donner le meilleur de moi-même et elle m'a surtout consolé dans les moments difficiles. Elle m'a également aidé à maintes reprises grâce à la confiance et à la fierté qu'elle me donne à chaque instant. Je lui dois énormément pour l'aboutissement de ce travail. Merci mon amour.

Résumé

La maladie d'Alzheimer est la forme la plus fréquente de démences séniles. Elle affecte environ 30 millions de personnes à travers le monde et le nombre de patients risque de doubler tous les 20 ans si aucun traitement efficace n'est trouvé pour enrailler la maladie. Le peptide amyloïde (Aβ) est produit à partir de son précurseur, l'APP. Outre son rôle dans la production de l'Aβ et les conséquences associées à la formation des oligomères toxiques et des plaques amyloïdes, l'APP régule d'autres fonctions physiologiques dans le système nerveux central. Il semble jouer un rôle important dans le maintien de l'activité neuronale par divers mécanismes encore non élucidés. La modulation de l'activité neuronale par l'APP pourrait passer par son habilité à réguler l'expression de gènes « cibles » via la signalisation nucléaire de son domaine intracellulaire (AICD). La perte de ses régulations transcriptionnelles pourrait contribuer au développement et à l'aggravation de certains symptômes de la maladie d'Alzheimer.

Dans ce travail, nous avons tout d'abord évalué la pertinence du fragment AICD comme régulateur transcriptionnel dans des modèles *in vitro*. Nos résultats indiquent que l'AICD est peu détectable en condition physiologique et que son processus de dégradation par les compartiments acides rend difficilement concevable l'idée qu'il puisse réguler l'expression de gènes « cibles ». Ensuite, grâce à l'analyse du transcriptome, nous avons identifié que l'expression du gène induit par l'activité neuronale, *Npas4*, est diminuée dans les neurones déficients en APP. Cette altération de l'expression de *Npas4*, indépendante de l'AICD, engendre une augmentation des marqueurs de la transmission GABAergique (GAD65) et du neurotransmetteur GABA. De plus, la transmission glutamatergique diminuée en l'absence d'APP corrèle avec l'expression diminuée de *Grik1*, une sous-unité du récepteur au glutamate de type kaïnate et avec la réponse réduite des neurones APPKO à l'acide kaïnique. En l'absence d'APP, la perte du contrôle de l'expression de *Npas4* induirait la modification de l'équilibre excitateur/inhibiteur via la modulation de la transmission GABAergique. Nos observations fournissent de nouvelles pistes pour mieux comprendre le rôle physiologique de l'APP dans l'activité synaptique et sa dérégulation dans la maladie d'Alzheimer.

Sommaire

Sommaire 11
Abréviations 15
Introduction 19
Avant-propos 19
L'histoire de la maladie d'Alzheimer 19
Démence et maladie d'Alzheimer en chiffres 20
Etiologie de la maladie 21
Les formes héréditaires 21
Les formes sporadiques 22
Symptomatologie et histopathologie de la maladie d'Alzheimer 24
Les plaques amyloïdes 26
Les dégénérescences neurofibrillaires 28
La protéine Tau 28
Propagation des lésions au cours de la maladie 31
L'hypothèse de la cascade amyloïde 33
Le précurseur du peptide amyloïde (APP) 34
Le clonage, le gène et la structure 34
Expression, localisation subcellulaire et métabolisme de l'APP 38
Expression 38
Localisation et transport intracellulaires 38
Métabolisme de l'APP 40
Fonctions générales de l'APP 45
L'APP et la prolifération, la différenciation et la migration des précurseurs neuronaux 47
L'APP et la croissance neuritique 48

L'APP et la fonction synaptique, l'apprentissage et la mémoire 51
Les mécanismes qui sous-tendent les fonctions de l'APP 53
Similarité structurelle avec un récepteur, domaines fonctionnels et dimérisation de l'APP 54
Le domaine intracellulaire de l'APP (AICD) 57
Le domaine intracellulaire de l'APP 58
Structure de l'AICD 58
La production et la dégradation de l'AICD 61
Partenaires d'interactions et rôle de l'AICD dans la régulation transcriptionnelle 63
X11/Mints 64
Numb et la protéine Notch 65
Fe65 et la régulation transcriptionnelle dépendante de l'AICD 65
Gènes cibles de l'AICD 68
Objectifs 75
Résultats 77
Chapitre I 77
Analyse de la région extracellulaire du CTFβ impliquée dans la régulation du clivage γ-sécrétase et la production d'Aβ et d'AICD 77
Optimisation de la détection de l'AICD par l'analyse de sa production et de sa dégradation 82
Chapitre II 91
Analyse des régulations transcriptionnelles dépendantes de l'APP et leurs implications dans le contrôle de la balance excitatrice/inhibitrice. 91
Chapitre III 145
Etude du rôle de l'APP dans la transmission GABAergique via la modulation de l'expression du co-transporteur au chlore KCC2 145

Discussion générale 149
Production, dégradation et localisation nucléaire de l'AICD 151
Régulations transcriptionnelles dépendantes de l'APP indépendamment du clivage ε 155
Le rôle de l'APP dans la neurotransmission excitatrice et inhibitrice 159
Implication d'une modification de la transmission GABAergique et de l'expression de Npas4 dans la maladie d'Alzheimer 162
Pour conclure 165
Bibliographie 166
Annexe I : CV scientifique 200
Annexe II : Publications en collaboration 204
β-sheet structure within the Extracellular Domain of C99 Regulates Amyloidogenic Processing 204
Cortical cells reveal APP as a new player in the regulation of GABAergic neurotransmission 215

Abréviations

11β-HSD1	11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1
AchE	Acetylcholinesterase
ADAM10	A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
AFT	Complexe AICD/Fe65/Tip60
AICD	Domaine intracellulaire du précurseur du peptide β-amyloïde
Akt	Protéine kinase B
AMPA	Acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
APH1	Anterior Pharynx defective 1
APLP	APP like protein
ApoE	Apolipoprotéine E
APP	Amyloid Precursor Protein
Aβ	Peptide β amyloïde
BACE1	β-site APP cleaving enzyme 1
CHO	Cellules ovariennes d'hamster chinois
CHO-hAPP$_{695}$	CHO surexprimant l'APP695 humain
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CSL	CBF1, Suppressor of Hairless, Lag-1
CTFα	Fragment C-terminal de l'APP dérivé du clivage α-sécrétase
CTFβ	Fragment C-terminal de l'APP dérivé du clivage β-sécrétase
CuBD	Domaine de liaison au cuivre
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester
DNF	Dégénérescences neurofibrillaires
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Egr1	Early growth response protein 1
EOAD	Forme précoce de la maladie d'Alzheimer
EPSC	Courant postsynaptique excitateur
Fe65	APP protein-binding, family B, member 1
GABARα1	Sous-unité alpha 1 du récepteur au GABA$_A$
GAD65	Glutamic acid decarboxylase 2
GFLD	Domaine ressemblant au facteur de croissance
GluN2A	Sous-unité 2A du récepteur ionotropique au glutamate de type NMDA

GluN2B	Sous-unité 2B du récepteur ionotropique au glutamate de type NMDA
GRIK1	Glutamate receptor, ionotropic, kainate 1
GSK3β	Glycogen synthase Kinase 3 beta
HBD	Domaine de liaison à l'héparine
hESC	Cellules souches embryonnaires humaines
HMGCR	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase
IDE	Insulin degrading enzyme
IPSC	Courant postsynaptique inhibiteur
JNM	Jonction neuromusculaire
KAI	Metastasis Suppressor Kangai-1
KAR	Kaïnate receptor
KCC2	Potassium-chloride transporter member 5
KD	Knock-down
KO	Knock-out
KPI	Domaine inhibiteur de protéase Kunitz
LRP1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
LOAD	Forme tardive de la maladie d'Alzheimer
MA	Maladie d'Alzheimer
MAM	Mastermind proteins
MAPT	Gène codant la protéine Tau
MCI	Déficience cognitive légère
MG132	N-Benzyloxycarbonyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal
NCT	Nicastrine
NEP	Neprylisine
NGF	Nerve Growth Factor
NGS	Séquençage à haut débit
NICD	Domaine intracellulaire de la protéine Notch
NKCC1	Na-K-Cl cotransporter
NMDA	Acide N-méthyl-D-Aspartique
NPAS4	Neuronal PAS Domain Protein 4
NPSC	Cellules souches et progénitrices neurales
Numb	NUMB endocytic adaptor protein
o-PNT	ortho-phénantroline
PDZ	Domaine retrouvé dans les protéines PSD95, Dlg1 et Zo-1
PEN2	Presenilin enhancer 2
PI3K	Phosphoinositide 3 Kinase

PKA	Protéine Kinase A
PLT	Potentialisation à long terme
PS	Préséniline
PSEN	Gène codant les présénilines
PTB	Domaine de liaison aux phosphotyrosines
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RE	Réticulum endoplasmique
sAPPα	Fragment soluble de l'APP dérivé du clivage α-sécrétase
sAPPβ	Fragment soluble de l'APP dérivé du clivage β-sécrétase
SH-SY5Y	Cellules de neuroblastome humain
SNC	Système nerveux central
TFCP2	Transcription Factor CP2
Tip60	Histone Acétyltransferase KAT5
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
USF1	Upstream stimulatory factor 1
X11	APP protein-binding, family A, member 2

Introduction

Avant-propos

La maladie d'Alzheimer (MA) est une dégénérescence progressive du système nerveux central. Elle représente la forme la plus fréquente de démences séniles affectant plus de 30 millions de personnes à travers le monde (Prince, Wimo et al. 2015). Elle est donc un enjeu majeur de recherche médicale et de santé publique, du fait du nombre inexorablement croissant de patients, des coûts sociétaux gigantesques qu'elle entraîne et de l'absence de traitement curatif à l'heure actuelle. L'enjeu est donc d'approfondir nos connaissances des mécanismes pathologiques entraînant l'apparition de la maladie dans l'espoir d'y révéler de nouvelles cibles thérapeutiques pour proposer à terme, aux millions de personnes atteintes dans le monde, un remède efficace.

L'histoire de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer a été décrite et étudiée pour la première fois en 1906 chez une femme de 51 ans par le neuropathologiste et psychiatre allemand Alois Alzheimer. En 1901, une patiente du nom de Auguste Deter atteinte de profondes pertes de mémoire, d'hallucinations, de comportements délirants et obsessionnels est prise en charge par le Dr. Alois Alzheimer. La patiente décède après 5 années de suivi. L'analyse post-mortem de son cerveau révèle des caractéristiques pathologiques tout à fait particulières : le cortex est anormalement mince et présente des dépôts décrits comme foyers miliaires actuellement connus sous le nom de plaques séniles, de même que des enchevêtrements protéiques dans les neurones qui correspondent aux dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Malgré le manque d'intérêt de la part de ses pairs lors de la présentation de ses découvertes au 37ème Congrès des Psychiatres à Tübingen, ces découvertes sont publiées un an plus tard et deviennent le point de départ de la recherche réalisée dans le domaine (Alzheimer 1907). Ces travaux suscitent cependant l'enthousiasme d'Emil Kraepelin, considéré comme le fondateur de la psychiatrie scientifique moderne, qui associe dans son traité de

psychiatrie de 1910 le nom d'Alzheimer à la pathologie nouvellement décrite. La maladie d'Alzheimer est née.

Démence et maladie d'Alzheimer en chiffres

La démence est une atteinte le plus souvent irréversible des fonctions cognitives telles que la mémoire, la pensée, les comportements et les émotions. Elle constitue une cause importante d'invalidité et de dépendance chez les personnes âgées. Il existe plusieurs dizaines de démences différentes dont les plus connues sont la maladie d'Alzheimer, la démence vasculaire cérébrale, la démence à corps de Lewy et la démence frontotemporale. La maladie d'Alzheimer constitue à elle seule, entre 50 et 75% des cas de démences (Prince, Wimo et al. 2015). Les démences ne sont toutefois pas mutuellement exclusives. Ainsi, la maladie d'Alzheimer et les démences vasculaires cérébrales sont responsables de près de 90% des cas identifiés.

En 2015, les estimations indiquent que 46,8 millions de personnes dans le monde vivent avec une démence et que ce nombre doublera presque tous les 20 ans, atteignant 74,6 millions en 2030 et 131,5 millions de personnes en 2050 (Prince, Wimo et al. 2015). Le principal facteur de risque étant l'âge, la prévalence de la démence double environ tous les 5 ans à partir de l'âge de 60 ans. Ainsi, elle passe de 0,9% pour les personnes de 60 à 65 ans à 24,7% pour les personnes âgées de 85 ans et plus. Par ailleurs, la mesure de l'incidence de la maladie indique que chaque année plus de 9,9 millions de personnes sont atteintes par la démence, impliquant un nouveau cas toutes les 3,2 secondes.

Le sexe est également déterminant dans la survenue de la maladie. En effet, les femmes sont plus exposées au risque de développer la maladie d'Alzheimer. Le risque de développer la maladie à l'âge de 65 ans est de 1 sur 6 pour les femmes, alors qu'il est de 1 sur 11 pour les hommes. Les estimations indiquent que près de deux tiers des personnes atteintes de la maladie sont des femmes. L'explication la plus simple serait liée au fait que l'espérance de vie des femmes est plus importante que celle des hommes. Cet argument ne peut toutefois pas expliquer l'entièreté de ces observations. Des mécanismes pathogénétiques sont vraisemblablement à

l'œuvre pour expliquer cette différence de genre. Des études génétiques récentes ont d'ailleurs montré que les femmes porteuses d'un même facteur de risque génétique que des hommes (ApoE4), étaient plus à risque de développer la maladie d'Alzheimer (Altmann, Tian et al. 2014). Ces effets incrimineraient le rôle du métabolisme, la réponse aux hormones sexuelles, l'œstrogène en particulier (Yaffe, Haan et al. 2000) mais également la présence de facteurs de risques génétiques liés aux chromosomes sexuels. Davantage d'études sont nécessaires afin d'identifier les mécanismes sous-jacents à cette différence liée au sexe.

Etiologie de la maladie

La maladie d'Alzheimer peut être classée en deux formes distinctes : les formes « sporadiques » ou en anglais *Late Onset Alzheimer's disease* (LOAD) et les formes héréditaires ou en anglais *Early Onset Alzheimer's disease* (EOAD). L'âge auquel se déclenche la maladie est la caractéristique la plus immédiate de l'une ou l'autre forme. En effet, pour les patients LOAD, l'âge d'apparition est de >60 ans alors qu'il est de <60 ans pour les patients EOAD. Les patients LOAD représentent la grande majorité des cas (> 90%) alors que les patients EOAD représentent entre 5% et 10% des cas (Cacace, Sleegers et al. 2016). Parmi ceux-ci, l'étude génétique des patients porteurs de mutations rares autosomiques dominantes a permis de mieux comprendre les fondements moléculaires de la pathologie.

Les formes héréditaires

Les formes héréditaires de la maladie d'Alzheimer représentent un nombre restreint de cas. Les cas EOAD sont composés de formes sporadiques, familiales et de formes rares autosomiques dominantes représentant 5 à 10% des cas EOAD. Les mutations autosomiques dominantes ont été identifiées dans trois gènes impliqués dans la production du peptide β amyloïde ou (Aβ). Celui-ci est le constituant majeur des plaques séniles et sera décrit ultérieurement dans le manuscrit. Parmi ces mutations, 221 mutations pathogéniques ont été décrites dans le gène codant la préséniline 1 (PSEN1, chromosome 14q24.2), 32 mutations dans le gène codant le précurseur du peptide amyloïde (APP, chromosome 21q21.3) et 18 mutations dans le gène codant la préséniline 2 (PSEN2 chromosome

1q42.13) (AlzForum 2018). Les présénilines 1 et 2 sont les sous-unités catalytiques du complexe γ-sécrétase impliqué dans le catabolisme de l'APP. La plupart des mutations identifiées ont pour effet d'augmenter la production du peptide Aβ, particulièrement la forme constituée de 42 acides aminés ($A\beta_{42}$) qui est plus encline à l'agrégation et donc à entraîner la formation de plaques amyloïdes. Plus précisément, les mutations vont soit augmenter le ratio d'$A\beta_{42}/A\beta_{40}$, où l'$A\beta_{40}$ est normalement la forme majoritaire produite par le métabolisme de l'APP soit modifier les propriétés d'agrégations de ce peptide. La plupart de ces mutations entraînent chez les patients EOAD l'apparition des premiers symptômes entre 30 et 65 ans et la majorité d'entre eux sont diagnostiqués entre 45 et 60 ans. Parmi l'ensemble des mutations découvertes, une seule mutation protectrice de la maladie a été rapportée dans la population Islandaise (Jonsson, Atwal et al. 2012).

En plus des mutations autosomales dominantes, une copie supplémentaire du gène de l'APP obtenue par duplication d'un locus ou par triplication complète du chromosome 21 (Syndrome de Down) provoque également des formes précoces de maladie d'Alzheimer apparentées aux EOAD. Des mutations, non plus dans la région codante mais dans le promoteur du gène de l'APP, induisant une augmentation de l'expression de celui-ci, provoquent également le développement précoce de la maladie d'Alzheimer (Cacace, Sleegers et al. 2016).

Les résultats obtenus par l'analyse génétique des formes héréditaires mettent en exergue l'importance considérable du peptide Aβ et de son précurseur (APP) dans le déclenchement des mécanismes pathologiques de la maladie d'Alzheimer.

Les formes sporadiques

Les formes sporadiques, ou LOAD, constituent la grande majorité des cas d'Alzheimer et sont indépendantes de mutations autosomiques dominantes. Le profil des patients LOAD est plus complexe que celui des patients EOAD, notamment car les facteurs de risques génétiques se combinent aux facteurs environnementaux et au vieillissement dans le déclenchement de la maladie. Parmi les facteurs génétiques, le gène de

l'apolipoprotéine E (APOE) est considéré comme le facteur de risque le plus important dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Chez l'homme, il existe trois isoformes principales qui diffèrent chacune d'entre elles par 2 acides aminés : l'APOE2 (Cys112 et Cys158), l'APOE3 (Cys112 et Arg158) et l'APOE4 (Arg112 et Arg158). La prévalence de chaque allèle est de 6,5% pour l'APOE2, 76% pour l'APOE3 et 17,5% pour l'APOE4 dans la population mondiale (Corbo and Scacchi 1999). Des études génétiques ont démontré que posséder un allèle de l'APOE4 (hétérozygote) triple le risque de développer la maladie d'Alzheimer et ce risque est multiplié par douze lorsque l'on est homozygote pour l'APOE4 (Farrer, Cupples et al. 1997). Inversément, posséder un allèle ou plusieurs allèles de l'APOE2 semble protéger contre la maladie d'Alzheimer (Corder, Saunders et al. 1994). L'APOE est une protéine impliquée principalement dans le catabolisme des acides gras mais différentes études ont démontré son implication dans la clairance et le dépôt du peptide amyloïde et donc dans la formation des plaques « séniles ». Cette fonction serait dépendante de l'isoforme considérée avec une efficacité de clairance plus importante pour l'APOE2 et une capacité plus faible pour l'APOE4. L'avènement des technologies de séquençage à haut débit (NGS) a permis d'identifier pas moins de 20 loci génétiques associés à une forme sporadique de la maladie d'Alzheimer (Giri, Zhang et al. 2016). La plupart des gènes identifiés comme facteurs de risques sont associés à des degrés divers aux fonctions de la protéine Tau (voir ci-dessous) et/ou au peptide amyloïde (voir ci-dessous) en se regroupant de manière large dans 3 voies biologiques : le métabolisme des lipides, la réponse inflammatoire et l'endocytose.

Par ailleurs, un nombre croissant de données suggère que le diabète, l'obésité, le tabagisme, l'inactivité physique et mentale, l'hypertension et le faible niveau d'éducation (Prince, Albanese et al. 2014) se présentent comme des facteurs de risque dont la prévention contribuerait à diminuer l'incidence de la maladie d'Alzheimer de 30%. Ces données montrent à la fois l'importance des facteurs environnementaux dans le déclenchement de la maladie et le bénéfice important de la réduction de ces facteurs de risques mais elles démontrent également notre connaissance très partielle des

mécanismes déclenchant la maladie pour les 70% des cas restants (Norton, Matthews et al. 2014).

Symptomatologie et histopathologie de la maladie d'Alzheimer

Les symptômes associés à la maladie d'Alzheimer sont progressifs et évoluent avec le décours de la maladie en s'aggravant généralement à travers les différents stades de la maladie.

Les premières modifications pathologiques apparaissent des années avant les premiers symptômes de la maladie. Le premier stade de la maladie est défini comme asymptomatique ou « préclinique ». Les premiers symptômes sont associés à une dégradation de la mémoire à court terme et définissent le stade clinique de « *Mild Cognitive Impairment* ou *MCI* ». Les patients présentent des difficultés à retenir des mots familiers, oublient des conversations récentes ou la place de certains objets du quotidien. Toutefois, les malades restent totalement indépendants et la maladie n'affecte que très peu leurs activités quotidiennes. Les personnes présentant un MCI peuvent évoluer vers la démence, rester stables, voire retrouver leur fonction cognitive complète (Alzheimer'sAssociation 2017). Le MCI n'est donc pas propre à la maladie d'Alzheimer et n'est pas un indicateur absolu de l'évolution des personnes touchées vers une démence.

Lorsque ce stade évolue vers la démence, la maladie progressera en trois stades ; léger, modéré et avancé. Dans le stade léger, les personnes souffrent d'un déficit de mémoire à court terme prononcé et commencent à développer des troubles comportementaux. Le stade modéré est principalement caractérisé par une aggravation majeure des déficits de mémoires et comportementaux. La mémoire à long terme, auparavant épargnée, commence à défaillir. Les personnes à ce stade ne se souviennent plus par exemple, d'évènements majeurs de leur existence, de prénoms familiers. Elles éprouvent également des difficultés de langage, d'écriture et de lecture. Les activités du quotidien nécessitent de plus en plus d'assistance et de supervision. Les troubles comportementaux tels que l'agressivité, l'errance, l'irritabilité et les hallucinations se manifestent de plus en plus

régulièrement. Finalement, ces personnes évoluent vers le stade avancé de la maladie et montrent des troubles de la mémoire, du langage et du comportement très importants. La détérioration physique est prononcée et les patients sont complètement dépendants d'une assistance médicale. La maladie d'Alzheimer conduit inexorablement au décès du patient (Alzheimer'sAssociation 2017) par des complications opportunistes se présentant souvent comme des déficits respiratoires ou des accidents cérébraux facilités par les lésions du tissu cérébral.

Au niveau macroscopique, l'atrophie corticale, particulièrement visible au niveau du lobe temporal, est une caractéristique évidente d'un cerveau de patient atteint de la maladie d'Alzheimer. L'atrophie corticale se manifeste notamment par le rétrécissement des gyri et l'élargissement des sulci. Une atrophie très marquée de l'hippocampe et une dilatation ventriculaire sont également observables (Figure 1) (Mott and Hulette 2005). Bien que ces manifestations macroscopiques puissent aider au diagnostic initial, aucune de ces caractéristiques macroscopiques n'est spécifique à la maladie d'Alzheimer.

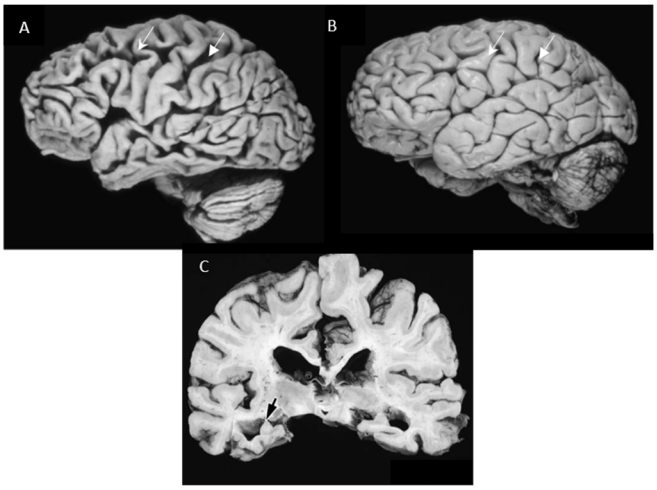


Figure 1 ***Atrophie corticale dans la maladie d'Alzheimer****. A) Atrophie corticale typique d'un cerveau dans un stade avancé de la maladie d'Alzheimer. B) Apparence normale du cortex cérébral. Les flèches indiquent les sulci et les gyri (flèche élancée). C) Coupe frontale d'un cerveau atteint par la maladie d'Alzheimer démontrant une atrophie hippocampique (flèche noire), une réduction de la matière blanche et grise du cortex ainsi qu'un élargissement des ventricules cérébraux. Adaptée de (Mott and Hulette 2005).*

Au niveau microscopique, le cerveau des patients atteints de la maladie se caractérise par l'apparition et la propagation de plaques dites « amyloïdes » et de dégénérescences neurofibrillaires à mesure que la maladie progresse.

Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes forment des dépôts extracellulaires de taille de 10 à 160 µm de diamètre. Elles sont mises en évidence par des colorations d'histologie classiques (hémalun-éosine, coloration à l'argent, au rouge congo,…) mais sont particulièrement immuno-réactives aux anticorps dirigés contre le peptide beta amyloïde (Aβ). Celui-ci constitue le composant principal des plaques amyloïdes et dérive du catabolisme du précurseur du peptide amyloïde, en anglais **A**myloid **P**recursor **P**rotein ou APP. On distingue principalement deux types de plaques amyloïdes : les plaques « neuritiques » et les plaques « diffuses » (Figure 2).

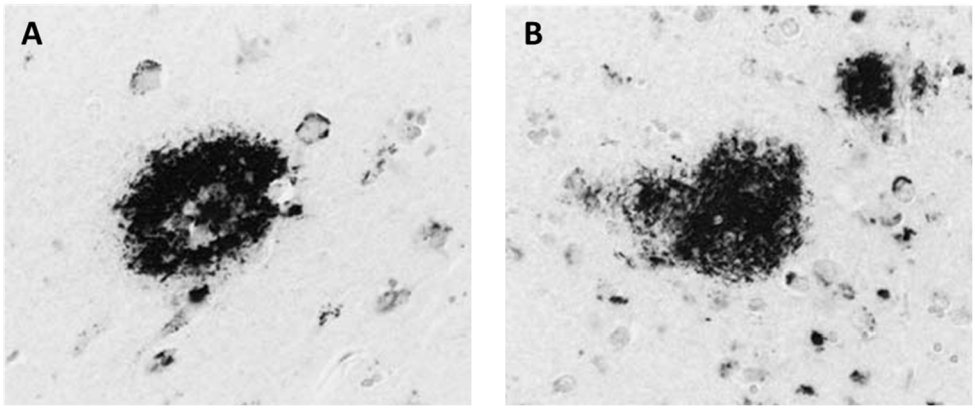


Figure 2 ***Les plaques Amyloïdes****. A) Plaque amyloïde « neuritique » B) Plaque amyloïde « diffuse ». Les plaques amyloïdes sont mises en évidence par un immunomarquage à l'anticorps 4G8 reconnaissant l'Aβ. Image agrandie 400X. Adapté de (Mott and Hulette 2005).*

Les plaques neuritiques sont composées d'un noyau dense d'Aβ entouré par des neurites dystrophiques et des cellules gliales réactives. Les plaques amyloïdes sont des structures complexes et l'on y retrouve d'autres protéines que l'Aβ telles que l'α1 antichymotrypsine, l'ApoE, des produits de glycation avancée, des facteurs de croissances, du complément, des

héparanes sulfates et des ions métalliques (Atwood, Martins et al. 2002). Contrairement aux plaques neuritiques, les plaques diffuses ne contiennent pas de corps dense, de neurites dystrophiques ou de cellules gliales réactives à leurs abords (Serrano-Pozo, Frosch et al. 2011). Les plaques amyloïdes ne sont pas suffisantes à elles seules pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer car elles sont fréquemment retrouvées dans le cerveau de personnes âgées sans déficits cognitifs avérés (Villemagne, Pike et al. 2011). La maladie d'Alzheimer est caractérisée par la présence d'une seconde lésion, les dégénérescences neurofibrillaires (DNF).

Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires sont la première lésion observée et identifiée en tant que telle par Alois Alzheimer dans l'autopsie du cerveau d'Auguste Deter. Contrairement aux plaques amyloïdes, les DNF sont des agrégats intracellulaires de protéines formant des paires hélicoïdales de filaments (PHF). On distingue différentes formes de DNF selon le stade morphologique (Figure 3) : (A) les DNF « diffuses » caractérisées par un marquage ponctiforme de la protéine Tau dans le cytoplasme d'un neurone d'aspect normal, (B) les DNF « fibrillaires » ou matures, constituées d'agrégats filamenteux de la protéine Tau dans le cytoplasme déplaçant le noyau neuronal en périphérie, (C) les DNF « extraneuronales » formées par la dégradation de l'entité cellulaire libérant les DNF « intracellulaires » à l'extérieur du neurone (Su, Cummings et al. 1993, Braak, Braak et al. 1994, Augustinack, Schneider et al. 2002, Serrano-Pozo, Frosch et al. 2011). Les composants majeurs des DNF sont des formes anormalement conformées et phosphorylées de la protéine associée au microtubule, Tau.

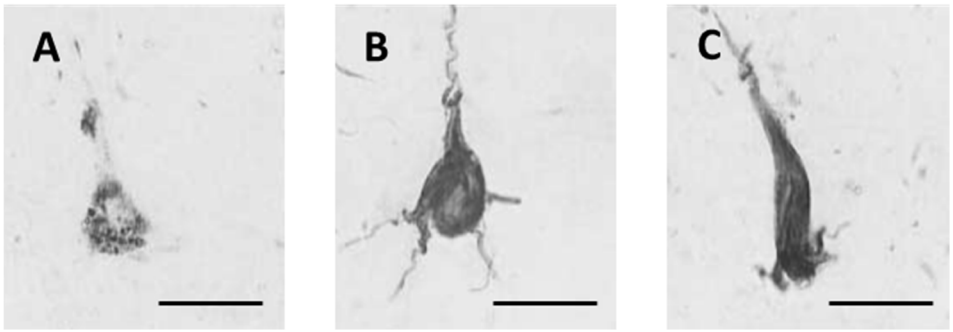


Figure 3 ***Les dégénérescences neurofibrillaires****. A) Les dégénérescences neurofibrillaires « diffuses » ou immatures. B) Les dégénérescences neurofibrillaires « fibrillaires» ou matures. C) Les dégénérescences neurofibrillaires « extraneuronales ». Les DNF sont mises en évidence par un immuno-marquage à l'anticorps TG3 reconnaissant Tau phosphorylé. Barre d'échelle = 25µm. Adapté de (Augustinack, Schneider et al. 2002).*

La protéine Tau

Tau est une protéine encodée par le gène Microtubule-Associated Protein Tau (MAPT) présent sur le chromosome 17q21 (Neve, Harris et al. 1986), qui contient 16 exons et dont les épissages alternatifs donnent naissance à six isoformes différentes. Structurellement, les différentes isoformes de Tau se

différencient par le nombres d'inserts dans le domaine N-terminal (0N, 1N ou 2N) et par le nombre de répétition des domaines de liaison aux microtubules (3R ou 4R) du côté C-terminal (Figure 4).

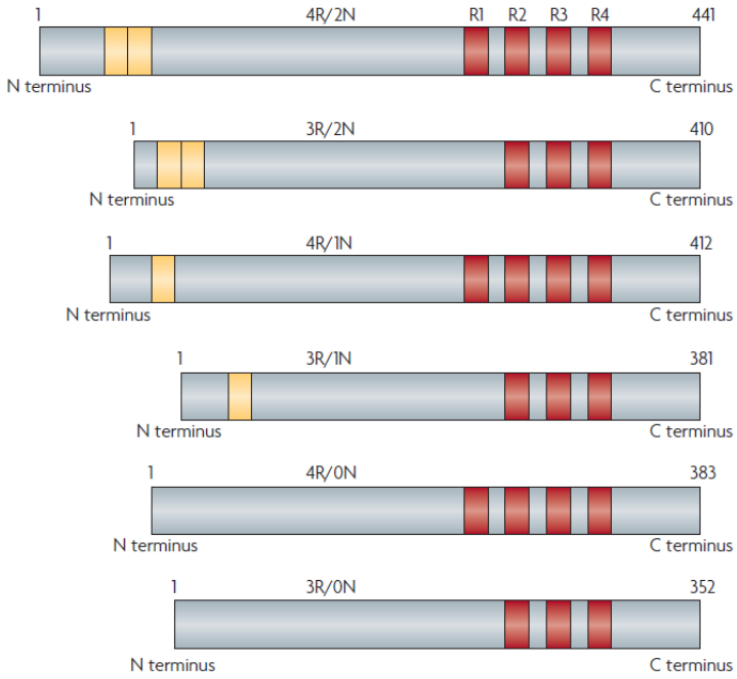


Figure 4 ***Structure des différentes isoformes de la protéine Tau exprimées dans le cerveau humain adulte****. D'une part, les différentes isoformes de Tau se différencient par leur nombre de domaine de liaison aux microtubules (en rouge) de 3 ou 4 (R1 à R4) du côté C-terminal. D'autre part, les isoformes se différencient par leur nombre d'insert (0N, 1N ou 2N) composé de séquence de 29 acides aminés (en jaune) du côté N-terminal dans le domaine de projection. Figure reprise de (Ballatore, Lee et al. 2007).*

Ainsi, l'isoforme la plus longue, Tau4R/2N, contient 441 acides aminés et la plus courte, Tau3R/0N en compte seulement 352. Chacune des isoformes pourrait jouer un rôle spécifique compte tenu du fait que leurs expressions sont régulées au cours du développement dans le système nerveux central (SNC). La fonction principale attribuée à Tau est de réguler la dynamique du cytosquelette microtubulaire en stabilisant l'assemblage des hétérodimères

de *Tubulines* (Weingarten, Lockwood et al. 1975). De plus, Tau peut réguler le transport axonal (Stamer, Vogel et al. 2002, Dixit, Ross et al. 2008) et être impliquée dans l'activité neuronale nécessaire à la plasticité synaptique et à la formation de la mémoire (Ahmed, Van der Jeugd et al. 2014, Kimura, Whitcomb et al. 2014). La phosphorylation de Tau, qui peut se produire sur plus de 80 sérines ou thréonines, régule finement l'affinité de celle-ci pour les microtubules (Hanger, Anderton et al. 2009). Dans la maladie d'Alzheimer, l'hyperphosphorylation de Tau ou sa phosphorylation sur de nouveaux résidus favorise sa dissociation des microtubules et son agrégation, induisant un déficit dans le transport axonal et dans l'activité synaptique (Alonso, Zaidi et al. 2001). Malgré la découverte de mutations dans le gène MAPT responsables de maladies neurodégénératives appelées taupathies (Démence fronto-temporale, paralysie supranucléaire, dégénérescence cortico-basale), aucune mutation causale à l'heure actuelle n'a été identifiée pour la maladie d'Alzheimer (Ghetti, Oblak et al. 2015). Pour une revue sur la protéine Tau voir (Wang and Mandelkow 2016).

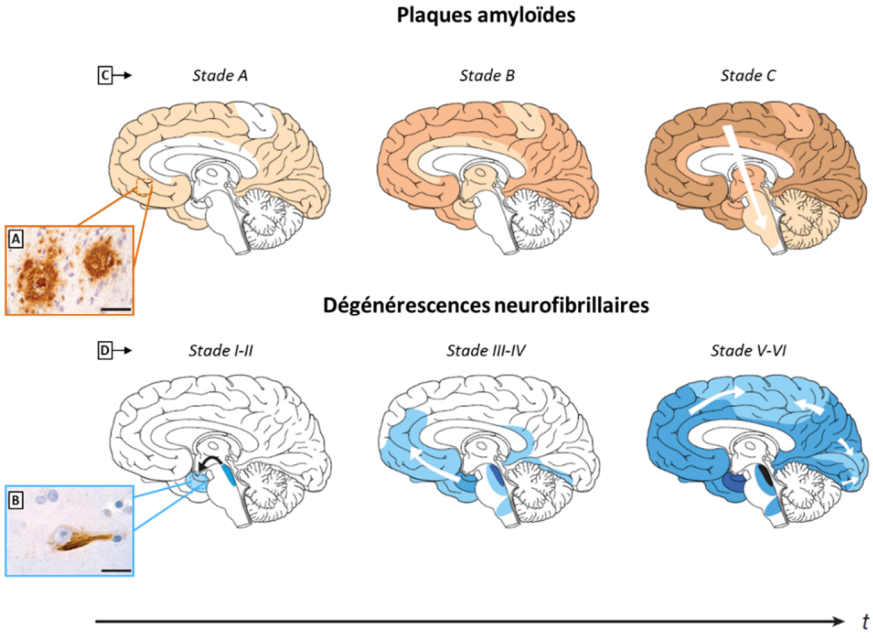


Figure 5 ***Propagation des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires durant le décours de la maladie d'Alzheimer****. A) Plaques amyloïdes dans le cerveau d'un*

patient Alzheimer. B) Dégénérescences neurofibrillaires dans le cerveau d'un patient Alzheimer. C et D) Progression spatio-temporelle caractéristique des plaques amyloïdes (C), du cortex associatif jusqu'aux zones subcorticales, et des dégénérescences neurofibrillaires (D), du cortex transentorhinal jusqu'aux zones corticales. Adapté (Jucker and Walker 2013).

Propagation des lésions au cours de la maladie

La progression des lésions dans la maladie d'Alzheimer (Figure 5) présente un décours progressif et un modèle spatial prévisible qui reflète la connectivité neuronale, particulièrement pour les DNF. Suite à l'examen neuropathologique post-mortem de nombreux cerveaux de patients Alzheimer, la progression des lésions amyloïdes et des DNF a été classifiée selon deux échelles différentes (Braak and Braak 1991, Thal, Rub et al. 2002, Braak, Alafuzoff et al. 2006), de manière simplifiée, les stades A à C pour les plaques amyloïdes et les stades I à VI pour les dégénérescences neurofibrillaires.

Les plaques amyloïdes apparaissent avant l'apparition des dégénérescences neurofibrillaires dans les zones basales des lobes frontaux, temporaux et occipitaux. L'hippocampe, le siège de la mémoire, est encore dépourvu de dépôts amyloïdes. Ceci constitue le premier stade de progression ou stade A. Dans le stade ultérieur ou stade B, les plaques amyloïdes se retrouvent dans la plupart des régions corticales associatives avec comme exceptions les aires sensorielles et motrices primaires. L'hippocampe est légèrement affecté à ce stade par des plaques amyloïdes principalement dans le subiculum et dans la région CA1 des cornes d'Ammon. Les régions CA2 à CA4 contiennent peu de dépôts amyloïdes. Dans le stade final de progression ou stade C, les plaques amyloïdes sont plus denses et se retrouvent virtuellement dans toutes les régions du cortex associatif incluant les régions sensorielles et motrices primaires. L'hippocampe est affecté de manière similaire au stade B. En outre, les plaques amyloïdes atteignent les structures profondes subcorticales telles que le thalamus, l'hypothalamus et le striatum.

Les dégénérescences neurofibrillaires suivent un motif de progression différent des plaques amyloïdes mais leur progression (et la perte neuronale associée) présente une meilleure corrélation avec la sévérité des déficiences cognitives observées (Arriagada, Growdon et al. 1992). Les DNF apparaissent

d'abord, au stade I et II dans le locus coeruleus et la région transentorhinale avec une atteinte faible de l'hippocampe où des agrégats peuvent être observés dans la région CA1. Ensuite, les DNF se répandent au niveau du subiculum de l'hippocampe et dans l'amygdale constituant le stade limbique ou III-IV. Les derniers stades ou stade V-VI de la maladie voient une aggravation des lésions dans les régions précédemment affectées (Région transentorhinale, cortex entorhinal, et hippocampe) et une affection généralisée des régions corticales (Braak and Braak 1991).

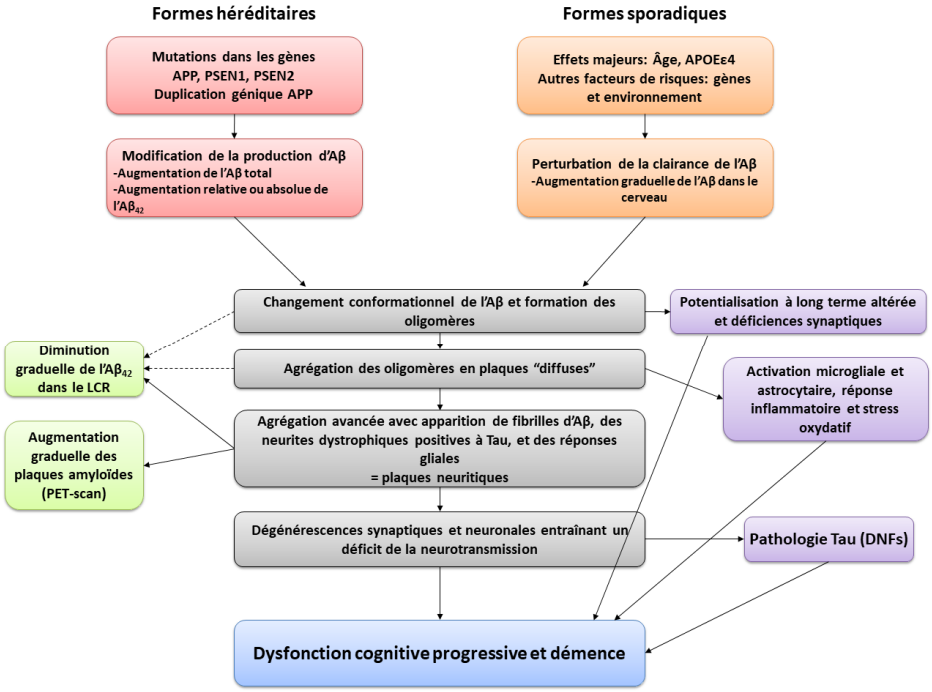


Figure 6 ***Hypothèse de la cascade amyloïde****. C'est l'hypothèse majeure expliquant l'étiologie de la maladie d'Alzheimer et qui positionne comme évènement central le déséquilibre entre la production et la clairance du peptide Aβ. Dans les formes familiales ou EOAD, des mutations génétiques provoquent une perturbation de la production d'Aβ ou génèrent des formes plus enclines à l'agrégation. Dans les formes sporadiques, l'âge et le génotype APOE4 constituent le facteur de risque majeur de développer la maladie d'Alzheimer. Le dénominateur commun dans la pathogenèse est le changement conformationnel de l'Aβ qui initie la formation d'oligomères, suivie par l'accumulation de fibrilles en plaques et à un stade ultérieur, en plaques neuritiques. Les déficits cognitifs semblent être causés par les oligomères inhibant la fonction synaptique, ainsi que par la réponse inflammatoire, le stress*

oxydatif et les dégénérescences synaptiques et neuronales. Adapté de (Blennow, Mattsson et al. 2015).

L'hypothèse de la cascade amyloïde

L'observation des lésions caractéristiques de la maladie, leur progression, les arguments génétiques et biochimiques sont à la base d'une hypothèse sur le mécanisme représentant le moteur essentiel de la progression de la maladie. L'identification du peptide amyloïde β (Aβ) dans les plaques séniles ainsi que les mutations dans les gènes de l'APP, PSEN1 et PSEN2 entraînant une accumulation de l'Aβ et conduisant aux formes héréditaires de la maladie sont à l'origine de l'hypothèse de la cascade amyloïde. Cette hypothèse, formulée initialement par Hardy et Allsop en 1991 (Hardy and Allsop 1991), régulièrement revue, reformulée, débattue postule qu'un défaut de métabolisme de l'APP et l'accumulation d'Aβ sont l'évènement déclencheur de la maladie, induisant la phosphorylation anormale de Tau et la formation des DNF à l'origine de la mort neuronale (Figure 6). Soutenue par l'accumulation importante de données précliniques et d'études cliniques, et par une convergence de données expérimentales, la cascade amyloïde reste à ce jour le modèle le plus pertinent et abouti pour expliquer l'étiologie de la maladie d'Alzheimer.

La première étape de la cascade amyloïde serait l'augmentation des quantités de peptides amyloïdes (augmentation de sa production ou une diminution de sa dégradation). Ceci est largement soutenu par les études génétiques des cas EOAD (production accrue d'Aβ) ou par l'observation que les patients atteints d'une duplication du gène de l'APP (Syndrome de Down) développent précocement la maladie d'Alzheimer. L'augmentation de la production d'Aβ observée chez ces patients est associée à l'augmentation de l'expression de son précurseur (APP). Près de 50% des cas sporadiques de la MA seraient imputables au génotype APOE4 (Ashford 2004, Raber, Huang et al. 2004) ayant pour conséquence une diminution de la clairance de l'Aβ et une augmentation des dépôts amyloïdes (Holtzman, Bales et al. 2000, Deane, Sagare et al. 2008).

L'accumulation d'Aβ (principalement l'Aβ42) favorise l'assemblage de l'Aβ organisé en feuillet-β pour former des oligomères. Ceux-ci peuvent évoluer vers la formation de fibrilles amyloïdes qui sont le composant principal des plaques amyloïdes. Les oligomères et les dépôts amyloïdes entraîneraient un stress neurotoxique conduisant à la formation des DNF, à une réaction inflammatoire médiée par les cellules gliales et au dysfonctionnement synaptique des neurones. L'ensemble de ces évènements moléculaires (plaques amyloïdes, DNF et inflammation) aboutirait à la neurodégénérescence observée dans le cerveau des patients et par conséquent à la dysfonction cognitive symptomatique de la maladie d'Alzheimer.

Le précurseur du peptide amyloïde (APP)

Le clonage, le gène et la structure

Glenner et Wong purifient pour la première fois en 1984, à partir de fibres torsadées β-plissées retrouvées dans le cerveau de patients atteints de la MA, un peptide de 4,2 kDa qu'ils appelleront « beta- amyloid peptide » ou peptide β-amyloïde (Aβ) en référence à sa structure tertiaire (Glenner and Wong 1984). La séquence en acides aminées de l'Aβ a été déterminée (Masters, Simms et al. 1985) et cela a constitué une étape déterminante dans l'identification du gène codant son précurseur protéique.

Le gène de l'APP a été cloné en 1987 (Kang, Lemaire et al. 1987, Robakis, Ramakrishna et al. 1987, Tanzi, Gusella et al. 1987) et localisé sur le bras long du chromosome 21 (*APP*, 21q21.3) (Goldgaber, Lerman et al. 1987, Kang, Lemaire et al. 1987). Le gène de l'APP contient 18 exons et s'étend sur plus de 170kb (Yoshikai, Sasaki et al. 1990). Il existe plusieurs isoformes de l'APP générées par épissage alternatif. Trois isoformes majeures ont été identifiées : l'APP_{770}, l'APP_{751} et l'APP_{695} (Figure 7). Chacune de ces isoformes est nommée suivant le nombre d'acides aminés constituant la protéine. L'APP_{770} contient donc 770 acides aminés et résulte de la traduction d'un ARN messager contenant les 18 exons du gène. L'APP_{751} est

traduit à partir d'un transcrit dont l'exon 8 est manquant alors que l'ARN messager de l'APP_{695} ne contient pas les exons 7 et 8.

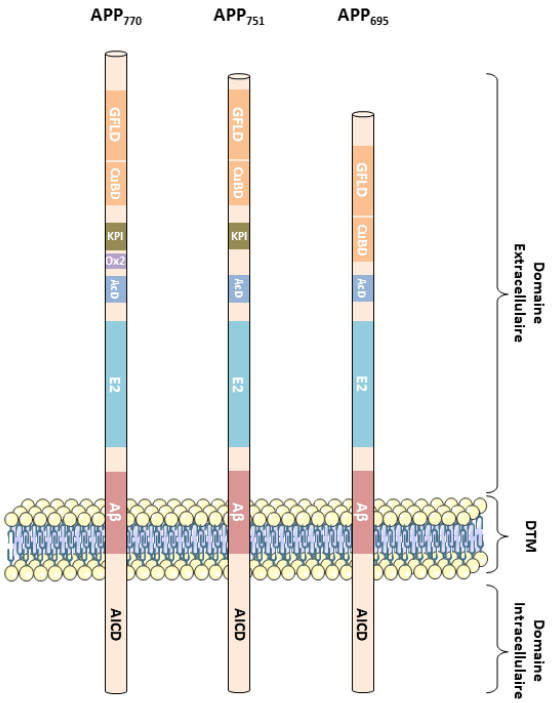


Figure 7 ***Structure des trois isoformes majeures de l'APP****. La structure et les domaines des principales isoformes de l'APP sont représentés. Le domaine extracellulaire contient le domaine E2, le domaine riche en résidus acides (AcD), le domaine E1 subdivisé en domaine GFLD (littéralement domaine ressemblant au facteur de croissance) et en domaine CuBD (littéralement domaine liant le cuivre), tous conservés à travers les espèces. Un domaine KPI (littéralement Kunitz protease inhibitor) et Ox2 se retrouvent uniquement sur l'APP770 alors que l'épissage alternatif d'un ou des deux domaines formera l'APP751 et/ou l'APP695. La séquence du peptide amyloïde (Aβ) est juxtamembranaire et se retrouve dans toutes les isoformes. Le domaine intracellulaire (AICD) est relativement court comparé au domaine extracellulaire, il contient 50 acides aminés.*

Le gène de l'APP est un membre d'une famille de gènes conservés par l'évolution, la famille dans laquelle se retrouvent également l'APL-1 chez *C-Elegans*, l'APPL chez la *drosophile*, l'APPa et l'APPb chez le *Zebra Fish* et les gènes paralogues APLP1 et APLP2 chez les mammifères. Ces gènes codent des protéines à un domaine transmembranaire de type 1 avec un large domaine extracellulaire et un court domaine intracellulaire. La structure des

domaines de l'APP humain (*H.Sapiens*) et de ces homologues chez la souris (*M.Musculus*), le poisson zèbre (*D.Rerio*), le nématode (*C. Elegans*) et la drosophile (*D.Melanogaster*) est représentée en figure 8. La partie extracellulaire est composée de deux grandes régions E1 et E2. Tout d'abord, la région E1 est subdivisée en domaine GFLD (littéralement, *Growth factor like domain*) contenant un domaine de liaison à l'héparine HBD (littéralement, *Heparin Binding Domain*) et un domaine CuBD (littéralement, *Copper binding domain)*. Le domaine de liaison à l'héparine est formé d'une hélice-α, d'un feuillet β antiparallèle et d'une boucle riche en résidus basiques capables de fixer l'héparine (Rossjohn, Cappai et al. 1999). Le domaine CuBD est composé d'une hélice-α et d'un feuillet β court. Il peut fixer plusieurs ions mais sa fonction principale serait la réduction du cuivre (II) en cuivre (I) (Multhaup, Schlicksupp et al. 1996). Ensuite, la région E1 est suivie d'une région riche en résidus acides (AcD), principalement l'acide glutamique et aspartique dont l'importance reste encore mal connue. L'isoforme longue de l'APP (770) contient un domaine KPI (littéralement, *Kunitz Protease Inhibitor*) et un domaine apparenté à l'antigène Ox2 (Ox2). Ces deux derniers sont soumis à l'épissage alternatif donnant lieu à la formation respective des isoformes 751 et 695 (voir figure 7). La région E2 précède directement la séquence du peptide amyloïde (Aβ) et est riche en hélices-α potentiellement importantes pour l'homodimérisation de l'APP. Cette région contient également un second domaine de liaison à l'héparine (Clarris, Cappai et al. 1997) ainsi que plusieurs sites de liaison aux ions métalliques suggérant un rôle de l'APP dans l'homéostasie des métaux (Duce, Tsatsanis et al. 2010). La région juxtamembranaire des membres de la famille de l'APP a particulièrement divergé au cours de l'évolution et rend la séquence de l'Aβ unique pour l'APP des mammifères et des poissons. La séquence de l'Aβ contient trois motifs de type GXXXG consécutifs impliqués dans la dimérisation de l'APP et des fragments membranaires (CTFs), qui sont également impliqués dans la formation des oligomères pathogéniques (Kienlen-Campard, Tasiaux et al. 2008, Decock, Stanga et al. 2016). Finalement, le domaine intracellulaire ou AICD pour APP IntraCellular Domain contient environ 50 acides aminés et constitue la région la plus conservée à travers l'évolution. Ainsi, des motifs particuliers, tel que YENPTY sont conservés depuis C. Elegans jusqu'aux mammifères et suggèrent

l'importance de ce domaine intracellulaire dans la fonction physiologique de l'APP (discuté dans « le domaine intracellulaire de l'APP »).

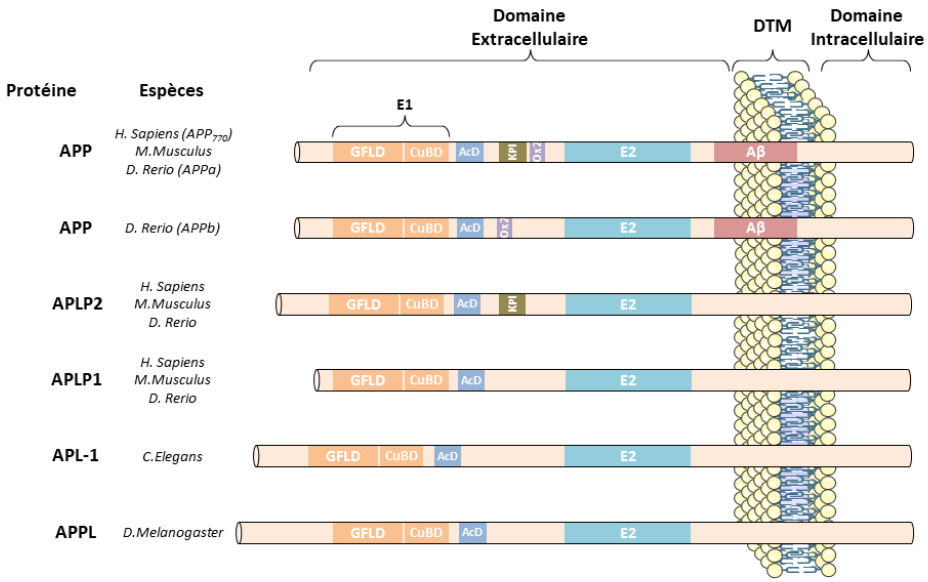


Figure 8 ***La structure des membres de la famille de l'APP à travers les espèces****. La structure des domaines de l'APP humain (H.Sapiens) et de ces homologues chez la souris (M.Musculus), le poisson zèbre (D.Rerio), le ver (C. Elegans) et la drosphile (D.Melanogaster) sont représentés. Le domaine extracellulaire contient le domaine E2, le domaine riche en résidus acides (AcD) et le domaine E1 subdivisé en domaine GFLD (littéralement domaine ressemblant au facteur de croissance) et en domaine CuBD (littéralement domaine liant le cuivre), tous conservés à travers les espèces. Les domaines KPI (littéralement Kunitz protease inhibitor) et Ox2, soumis à l'épissage alternatif, se retrouvent aussi dans l'APP et/ou l'APLP2. La séquence du peptide amyloïde (Aß) est uniquement retrouvée dans l'APP humain, murin et du poisson. Le domaine intracellulaire contient 50 acides aminés et est la région la plus conservée à travers l'évolution.*

Expression, localisation subcellulaire et métabolisme de l'APP

Expression

Chez la souris, l'ARNm de l'APP est détectable à partir du jour embryonnaire 7.5 (E7.5) (Ott and Bullock 2001). À des stades plus avancés, l'ARNm de l'APP_{695} est exprimé dans l'ectoderme neural, l'épithélium nasal, dans la rétine, dans l'oreille interne ainsi que dans les ganglions crâniens (Salbaum and Ruddle 1994, Sarasa, Sorribas et al. 2000). Chez la souris adulte, l'expression de l'APP et de l'APLP2 est ubiquiste et leurs expressions sont particulièrement fortes dans le système nerveux central (SNC) et dans les jonctions neuromusculaires (JNM). L'expression de l'APLP1 se restreint essentiellement au SNC. Dans le SNC, les neurones excitateurs et les interneurones inhibiteurs (GABAergiques) expriment l'APP avec une expression importante dans le cortex et l'hippocampe. Les neurones expriment principalement l'APP_{695}, alors que les isoformes APP_{751} et APP_{770} semblent être exprimées principalement dans les cellules gliales et les tissus périphériques. Bien que des études *in vitro* aient pu mettre en évidence l'expression des trois isoformes dans les astrocytes et la microglie (Haass, Hung et al. 1991, LeBlanc, Chen et al. 1991), l'expression *in vivo* de l'APP dans ces populations cellulaires n'a pas encore été indiscutablement détectée (Guo, Li et al. 2012).

Localisation et transport intracellulaires

L'APP est traduit dans le réticulum endoplasmique (RE) et est transloqué directement dans le lumen de celui-ci. Le côté N-terminal de l'APP est dirigé vers le lumen du RE, tandis que le domaine C-terminal fait face au cytoplasme. Après sa synthèse, l'APP est transporté du RE vers l'appareil de golgi (1) d'où il sera exporté dans les vésicules sécrétoires vers la membrane plasmique (2), où son large domaine N-terminal sera extracellulaire (Figure 9). Durant son transit dans la voie sécrétoire, l'APP est soumis à différentes modifications post-traductionnelles comprenant la protéolyse (voir « Métabolisme de l'APP »), la glycosylation, la sulfatation et la phosphorylation. L'APP subit d'abord le clivage de son peptide signal par une signal peptidase et est N-glycosylé sur certains résidus asparagine (Sato, Liu

et al. 1999) dans le RE. Après son passage dans l'appareil de Golgi, l'ectodomaine est soumis à l'O-glycosylation (Halim, Brinkmalm et al. 2011). Dans les derniers compartiments du Golgi (*trans*-Golgi), l'APP est soumis à la sulfatation (Weidemann, Konig et al. 1989) de résidus tyrosines présents dans l'ectodomaine. La phosphorylation de l'APP apparaît dans sa région cytoplasmique, particulièrement sur la thréonine 668 (numérotation de l'APP_{695}) (Suzuki and Nakaya 2008) et sur les tyrosines du motif GYENPTY. Les modifications post-traductionnelles semblent jouer un rôle important dans le transport cellulaire de l'APP mais également dans la régulation du catabolisme de l'APP notamment en modifiant la production de l'Aβ (Feyt, Pierrot et al. 2007).

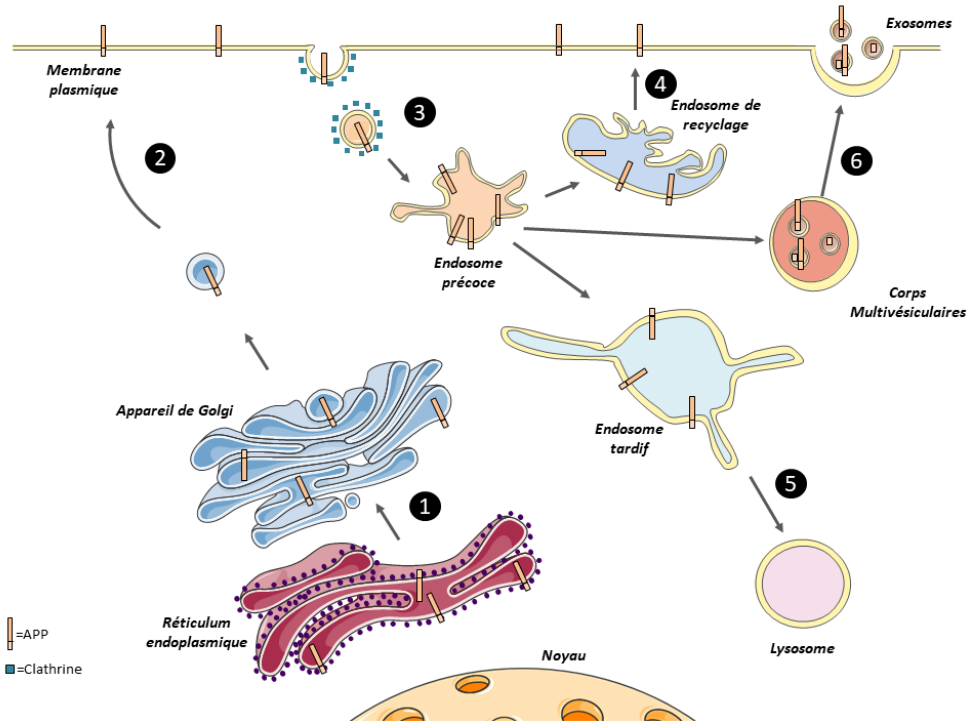


Figure 9 ***Synthèse et transport intracellulaire de l'APP****. L'APP naissant mature au cours de son passage dans la voie sécrétoire (1) pour être envoyé à la membrane plasmique (2). Une fois la membrane plasmique atteinte, l'APP peut être métabolisé (clivage préférentiellement non-amyloïdogène) ou réinternalisé par les puits tapissés de clathrine et être envoyé vers le système endosomal (3). Ensuite, l'APP peut être renvoyé à la membrane plasmique après son recyclage (4) ou dégradé par le système endoso/lysosomal (5). Le clivage amyloïdogène*

se déroule principalement dans les compartiments intracellulaires acides. De plus, l'APP et certains de ses métabolites se retrouveront dans les corps multivésiculaires ainsi que dans les exosomes où ils seront excrétés de la cellule (6).

Une faible fraction (10%) de l'APP réside dans la membrane plasmique, alors que la majorité de l'APP se trouve dans les compartiments intracellulaires (RE, Golgi, endosomes, lysosomes). L'APP qui n'est pas clivé à la surface est internalisé (Figure 9) via le signal d'internalisation YENPTY dans les puits tapissés de Clathrines et est acheminé dans les endosomes (3). L'APP dans les endosomes peut ensuite être recyclé vers la membrane plasmique (4) ou être envoyé pour dégradation dans les lysosomes (Jiang, Li et al. 2014) (5). De plus, l'APP et ses catabolites peuvent également se retrouver dans les corps multivésiculaires. Ceux-ci forment des entités du système endocytaire se retrouvant au croisement de mécanismes comme le recyclage membranaire et la dégradation protéique. Ils donnent notamment naissance aux exosomes dans lesquels on retrouve l'APP, l'Aβ et les fragments membranaires issus de son catabolisme (Vingtdeux, Hamdane et al. 2007) (6).

Dans les neurones, l'APP est retrouvé dans les compartiments somato-dendritiques et axonaux. L'APP axonal est principalement transporté depuis l'appareil de Golgi vers la zone « active » de la synapse et peut se retrouver dans les vésicules synaptiques ainsi que dans la membrane plasmique. Néanmoins, les mécanismes régulant le transport axonal et dendritique jusqu'à la terminaison présynaptique restent encore mal compris ou controversés (Groemer, Thiel et al. 2011, Haass, Kaether et al. 2012).

Le transport et la distribution subcellulaire de l'APP ont une importance considérable dans la régulation de son métabolisme (voir « Métabolisme de l'APP »). En effet, une accumulation de l'APP à la membrane plasmique favorise le métabolisme non-amyloïdogène (ne produisant pas d'Aβ), alors que la rétention de l'APP dans les compartiments acidiques favorise le métabolisme amyloïdogène.

Métabolisme de l'APP

L'étude de la production du peptide amyloïde (Aβ) a permis de décrire 2 grandes voies par lesquelles l'APP est métabolisé. La voie non-

amyloïdogène, qui ne génère pas l'Aβ et la voie amyloïdogène qui le produit. Le métabolisme de l'APP fait intervenir différentes enzymes, appelées sécrétases. Il est particulièrement complexe car il ne génère pas moins de 8 métabolites dans la voie canonique (Figure 10) et plus encore dans les voies alternatives récemment découvertes. Le métabolisme de l'APP génère des fragments dont le plus étudié est le peptide β-amyloïde (Aβ). La fonction biologique de ses autres fragments n'est que partiellement élucidée, mais ils pourraient intervenir dans des processus aussi divers que la survie et l'apoptose cellulaire, la plasticité synaptique et la régulation transcriptionnelle. La protéolyse est un évènement constitutif et explique notamment la demi-vie relativement courte de l'APP : de 20 à 30 minutes dans les cellules PC12 (Weidemann, Konig et al. 1989) et environ 45 minutes dans les neurones, les astrocytes et la microglie *in vitro* (Haass, Hung et al. 1991, Allinquant, Hantraye et al. 1995).

La voie amyloïdogène fait intervenir, dans un premier temps un clivage au niveau de l'acide aminé Asp597 de l'APP par la β-sécrétase libérant le fragment soluble APP beta (sAPPβ) et le fragment membranaire beta (CTFβ, encore appelé C99) (Figure 10). Le clivage β est exécuté par une aspartyl protéase dont 2 paralogues ont été identifiés, BACE (littéralement, β-site APP cleaving enzyme) 1 et 2 (Vassar, Kuhn et al. 2014). BACE1 est considérée comme la β-sécrétase majeure. Elle se retrouve dans divers organites, mais son activité est maximale dans les vésicules *trans*-Golgi et les endosomes. Ceux-ci constituent d'ailleurs le site principal de clivage de l'APP par BACE1 (Vassar, Kuhn et al. 2014). Le fragment membranaire CTFβ est protéolysé par un complexe protéique appelé γ-sécrétase. Celui-ci est constitué de 4 sous-unités formées par la nicastrine (NCT), l'anterior pharynx defective 1 (APH1) dont il existe 2 isoformes différentes APH1a et APH1b, le presenilin enhancer 2 (PEN-2) et la sous-unité catalytique constituée par la préséniline 1 (PS1) ou 2 (PS2). À la suite de l'assemblage de ces différentes sous unités (NCT, APH1, Pen2 et PS1/2), quatre complexes γ-sécrétase différents peuvent être formés chez l'homme. Chez la souris, une troisième isoforme d'APH1 (APH1c) a été identifiée permettant virtuellement l'assemblage de six γ-sécrétases différentes. Des études d'invalidation (KO) des différentes isoformes menées chez les souris ont révélées des phénotypes distincts. Le

phénotype APH1a KO est létal au stade embryonnaire, alors que les sours APH1b et APH1c KO sont viables (Serneels, Dejaegere et al. 2005). Ceci indique clairement que du fait de leur distribution tissulaire, des différents assemblages de ses sous-unités, chaque γ-sécrétase possède des propriétés intrinsèques qui nécessitent d'être étudiées en détail, et ne peuvent être englobées dans le concept de γ-sécrétase unique.

In vivo, les complexes γ-sécrétases semblent avoir des spécificités de clivages différentes pour leurs subtrats (Stanga, Vrancx et al. 2018) suggérant qu'ils puissent assurer des fonctions physiologiques particulières (De Strooper, Iwatsubo et al. 2012) notamment vis-à-vis de la voie de signalisation dépendante de Notch. Ces aspects ne seront pas détaillés dans la suite du manuscrit mais il convient de garder à l'esprit qu'il ajoute un niveau de complexité supplémentaire dans de la compréhension du clivage et de la fonction des métabolites de l'APP.

Le complexe γ-sécrétase est actif principalement dans la voie endo/lysosomale avec une distinction pour les complexes formés par PS1 ou PS2. En effet, une étude récente semble indiquer que les complexes γ-sécrétases contenant la PS2 sont particulièrement localisés dans les endosomes tardifs alors que les complexes formés avec la PS1 sont distribués de manière plus homogène dans la cellule (Sannerud, Esselens et al. 2016). L'Aβ serait donc principalement produit dans les compartiments endocytaires formés par les endosomes et lysosomes, et dans une moindre mesure à la membrane plasmique. La production des formes d'Aβ résidant dans les cellules serait liée aux γ-sécrétases contenant PS2, l'Aβ extracellulaire serait produit principalement par la γ-sécrétase contenant PS1.

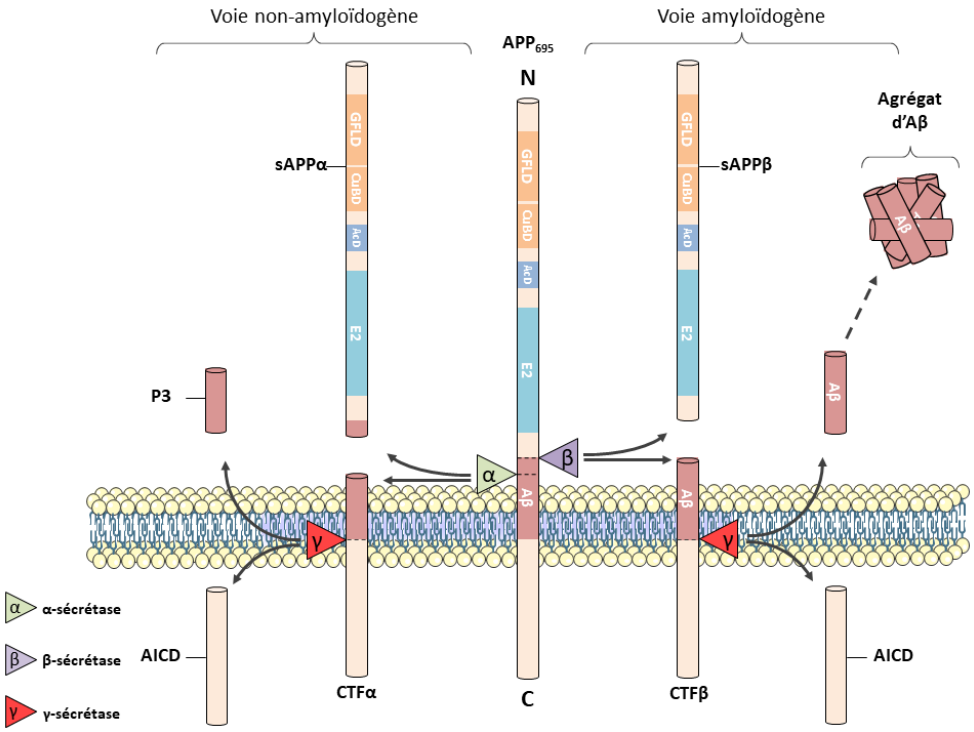


Figure 10 ***Le métabolisme canonique de l'APP par les voies (non)-amyloïdogènes****. La voie non-amyloïdogène (à gauche) débute avec le clivage de l'APP par l'α-sécrétase (triangle vert) dans la séquence de l'Aß produisant la libération du fragment soluble APP alpha (sAPPα) et le fragment C-terminal alpha (CTFα). Dans la voie amyloïdogène, le premier clivage est exécuté par la ß-sécrétase (triangle mauve) libérant le fragment soluble APP beta (sAPPß) et le fragment C-terminal beta (CTFß). Dans les deux voies, la γ-sécrétase va cliver les fragments membranaires CTFα et CTFß pour libérer le fragment p3 et le peptide amyloïde beta (Aß) respectivement. Un fragment intracellulaire (AICD) est libéré dans les deux voies suite au clivage par la γ-sécrétase.*

Le clivage initial du CTFβ par la γ-sécrétase intervient au site de clivage ε, correspondant au résidu Leu645 de l'APP (Weidemann, Eggert et al. 2002) proche de l'interface entre la membrane plasmique et le cytoplasme (activité protéolytique). Ce clivage libère le domaine intracellulaire de l'APP (AICD). Ensuite, la γ-sécrétase « rognera » le peptide Aβ par des clivages successifs à l'intérieur de la membrane vers le côté N-terminal (activité carboxypeptidase) produisant les différentes formes du peptide amyloïde (Steiner, Fluhrer et al. 2008). Deux axes de production majeure ont été décrits. Après le premier clivage ε aux résidus Leu49 ou Thr48 (numérotation

de l'Aβ), les clivages successifs (ζ et γ) surviennent tous les 3 ou 4 acides aminés menant à la production majoritaire de l'Aβ40 dans l'un et à l'Aβ42 dans l'autre axe de production. Toutefois, des « sauts » de clivages surviennent et complexifient la gamme des Aβ générés, en ajoutant notamment l'Aβ37, 38 et 39 (Qi-Takahara, Morishima-Kawashima et al. 2005, Takami, Nagashima et al. 2009).

A contrario, la voie non-amyloïdogène débute par un premier clivage de l'APP médié par l'α-sécrétase identifiée comme ADAM10 (littéralement, A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10) (Kuhn, Wang et al. 2010). Ce clivage entraîne la libération du fragment soluble APP alpha (sAPPα) et du fragment membranaire alpha (CTFα, encore appelé C83) (figure 10). Ce clivage intervient au niveau du résidu Leu613 de l'APP à l'intérieur de la séquence du peptide amyloïde empêchant ainsi sa production. La localisation d'ADAM10 indique que la voie non-amyloïdogène débute principalement à la membrane plasmique. Sans distinction et selon le même processus, le complexe γ-sécrétase va alors cliver le CTFα au site ε pour libérer l'AICD et produire un peptide de 3KDa appelé fragment p3.

Bien que l'APLP1 et l'APLP2 ne contiennent pas la séquence de l'Aβ, ils sont métabolisés selon les mêmes voies canoniques et avec les mêmes sécrétases menant donc à la production de larges fragments sécrétés de l'ectodomaine, de peptides apparentés à l'Aβ et à la libération de fragments intracellulaires appelés ALIDs (Scheinfeld, Ghersi et al. 2002, Eggert, Paliga et al. 2004, Endres, Postina et al. 2005).

En plus, des voies canoniques décrites précédemment, plusieurs autres voies récemment identifiées interviennent dans la protéolyse de l'APP. L'APP est clivé par la caspase dans l'AICD produisant un fragment appelé C31 qui serait impliqué dans l'apoptose neuronale (Bertrand, Brouillet et al. 2001). En outre, le clivage de l'APP par les voies δ, η et des méprines mène à la production de nouveaux fragments N-terminaux (Jefferson, Causevic et al. 2011, Willem, Tahirovic et al. 2015, Zhang, Song et al. 2015). Ces fragments ont été détectés dans le cerveau des souris et leur production est considérablement diminuée dans les knockouts génétiques pour ces enzymes (δ=Asparagine endopeptidase (APE), η= Matrix metallopeptidase

24 (MMP24), MeprinA subunit β (MEP1B)) indiquant que ces voies de protéolyses sont physiologiques et pertinentes. Néanmoins, le rôle de ces fragments n'est pas encore bien connu mais certains pourraient être impliqués dans la pathogenèse de la MA (Andrew, Kellett et al. 2016).

Fonctions générales de l'APP

La connaissance des fonctions physiologiques de l'APP reste encore incomplète. Bien que la perte de l'APP ou de ses homologues ait été étudiée dans de nombreux modèles, aucune image définitive de leurs fonctions n'a pu émerger. Parfois appelé « All Purpose Protein », l'APP a été associé à de nombreuses fonctions cellulaires comme l'adhésion, la prolifération, la migration, la formation des synapses mais aussi le contrôle de la plasticité synaptique et la régulation de la coagulation sanguine. Cependant comprendre le(s) rôle(s) physiologique(s) de l'APP n'est pas trivial car (1) l'APP appartient à une famille de gènes très conservés par l'évolution et dont les interactions génétiques et les similitudes structurelles indiquent qu'ils possèdent vraisemblablement des fonctions redondantes mais également des fonctions uniques (Shariati and De Strooper 2013). Les compensations fonctionnelles peuvent expliquer les phénotypes subtils observés chez la souris lorsqu'un seul membre de la famille est invalidé, alors que certaines fonctions peuvent être révélées en invalidant plusieurs membres de la famille. (2) Beaucoup de données concernant les fonctions de l'APP et de ses paralogues restent contradictoires, nous en retiendrons donc les fonctions pour lesquelles les arguments expérimentaux existants sont les plus solides.

Les souris dont le gène codant un membre de la famille a été invalidé (APP-/-, APLP1-/- ou APLP2-/-) sont viables et fertiles et présentent des phénotypes en apparence subtils. Les souris APP-/- ont été les plus étudiées et montrent une réduction du poids cérébral et corporel, une réduction de la force de préhension, une diminution de l'activité locomotrice, la présence de gliose cérébrale, une susceptibilité accrue aux traumas, aux crises épileptiformes et à l'hypoxie et un déficit dépendant de l'âge au niveau de la morphologie neuronale, de la plasticité synaptique et de la mémoire (Muller, Deller et al. 2017). Par ailleurs, les souris APLP1-/- montrent

seulement une diminution du poids corporel de 10% sans aucun autre déficit (Heber, Herms et al. 2000). Les souris APLP2-/- quant à elles ne montrent aucun phénotype particulier (von Koch, Zheng et al. 1997). Si les membres de la famille de l'APP partagent les mêmes fonctions, on s'attendrait à ce que les phénotypes des souris knock-out (KO) pour n'importe quel membre soient identiques, or il n'en est rien. Cette disparité indique donc que les protéines de cette même famille peuvent avoir des fonctions spécifiques (Shariati and De Strooper 2013).

La combinaison de plusieurs délétions génétiques a permis de mettre en évidence d'autres fonctions dans lesquelles l'APP semble avoir un rôle prépondérant. L'expression de l'APLP2 semble suffisante pour la survie des souris ce qui signifie que la double invalidation de l'APP et de l'APLP1 est viable. En l'absence d'APLP2 (APLP2-/-), les souris ne survivent que si l'APP et l'APLP1 sont exprimés. Ceci suggère que l'APLP2 contrôle une fonction dominante qui ne peut être compensée en l'absence d'un des autres membres de la famille (démasquage), mais comblée par les deux autres membres si l'APLP2 est absent (complémentation). Tout comme les doubles KO impliquant l'APLP2 (APP-/- APLP2-/- et APLP1-/- APLP2-/-), les souris triplement invalidées (APP-/-APLP1-/-APLP2-/-) meurent rapidement après la naissance – fort probablement du fait d'un déficit sévère des jonctions neuromusculaires (JNM). En effet, lorsque l'APP est invalidé dans le background génétique APLP2-/-, une altération importante de la libération des neurotransmetteurs au niveau de la plaque motrice est observée. Ce déficit dans la formation des JNM a également été observé chez les souris APP-/- et KO conditionnelles dans lesquelles l'APP a été invalidé spécifiquement dans les neurones ou dans les myocytes. Ceci indique clairement que l'APP joue un rôle prépondérant dans la formation des JNMs dans les compartiments pré- et post-synaptiques (Wang, Wang et al. 2009, Stanga, Zanou et al. 2016).

La fonction principale de l'APP dans le système nerveux central et périphérique l'impliquerait dans la prolifération, la différenciation et la migration des progéniteurs neuronaux, la croissance neuritique, la synaptogenèse et la plasticité synaptique.

L'APP et la prolifération, la différenciation et la migration des précurseurs neuronaux

Le rôle de l'APP dans la prolifération et la différenciation a été suggéré car son expression dans les neuroblastes au niveau des zones ventriculaires et sous-ventriculaires coïncide avec la période de prolifération et de différenciation des précurseurs neuronaux (Salbaum and Ruddle 1994, Lopez-Sanchez, Muller et al. 2005). Ainsi, plusieurs études ont montré que l'APP, en particulier les fragments solubles étaient capables d'induire la prolifération des cellules souches et des progéniteurs neuronaux NSPC (littéralement, Neural Stem or Progenitor Cell) (Hayashi, Kashiwagi et al. 1994, Ohsawa, Takamura et al. 1999, Demars, Bartholomew et al. 2011). Dans le cerveau de souris adulte, le fragment sAPPα peut se fixer au récepteur de l'*Epidermal Growth Factor* (EGFR) exprimé sur les NSPC de la zone sous-ventriculaire et induire leurs proliférations (Caille, Allinquant et al. 2004). Certaines études ont montré que la neurogenèse dans les souris transgéniques surexprimant l'APP humain muté augmente dans les zones sous-ventriculaires et dans le gyrus denté (Jin, Galvan et al. 2004, Hu, Hung et al. 2013). À contrario, certaines études observent une diminution de la neurogenèse hippocampique dans d'autres souris surexprimant l'APP humain muté ou sauvage (Donovan, Yazdani et al. 2006, Naumann, Alpar et al. 2010). Par ailleurs, l'absence de l'APP endogène dans le cerveau des souris (APP-/-) semble diminuer la prolifération des NSPCs (Hu, Hung et al. 2013).

L'APP, via le fragment sAPPα, régule la prolifération des précurseurs neuronaux mais semble aussi réguler la différentiation des cellules NSPCs. En effet, des cellules souches embryonnaires humaines hESCs (littéralement human Embryonic Stem Cells) dans lesquelles l'APP est surexprimé montrent une différenciation neuronale rapide et robuste vraisemblablement via la production des fragments solubles sAPPα et sAPPβ (Freude, Penjwini et al. 2011). Les NSPCs dérivées des souris transgéniques surexprimant l'APP ont également un plus grand potentiel de différenciation neuronale contrairement à celles dérivées des souris APP-/- (Hu, Hung et al. 2013). Finalement, diminuer l'expression *in utero* de l'APLP2 dans des souris déficientes pour l'APP et l'APLP1 (APP-/- ;APLP1-/-) retarde la différenciation

des précurseurs neuronaux en les maintenant dans leur phase prolifération (Shariati, Lau et al. 2013).

Dans le système nerveux central, la migration garantit la position finale des neurones post-mitotiques pour l'établissement d'un réseau fonctionnel. Ces neurones dérivent des progéniteurs neuronaux en multiplication dans les couches ventriculaires et sous-ventriculaires et migrent vers les couches superficielles ou corticales grâce aux prolongements des cellules radiales. La migration de ces neurones vers la couche corticale est bloquée suite à la diminution aiguë d'expression de l'APP *in utero (Young-Pearse, Bai et al. 2007).* Par ailleurs, l'invalidation génétique des trois paralogues (APP-/- ; APLP1-/- ; APLP2-/-) résulte en une létalité périnatale et en une migration anormalement importante des neurones dans la couche corticale (Herms, Anliker et al. 2004). Bien que contradictoires, ces données indiquent que l'APP et les autres membres de la famille (APLP1 et APLP2) jouent un rôle important dans le développement cortical en altérant notamment la migration neuronale. Un phénotype similaire est observé dans les souris déficientes pour Fe65, une protéine grandement étudiée pour sa capacité d'interaction avec l'AICD (voir « le domaine intracellulaire de l'APP »), suggérant que l'APP et Fe65 forment un complexe signalisant et capable de fonctionner comme un récepteur de guidance neuronal (Guenette, Chang et al. 2006).

L'APP et la croissance neuritique

Les neurites définissent l'ensemble des prolongements cellulaires qui se projettent depuis le corps d'un neurone durant sa maturation. Ces projections peuvent être des dendrites ou l'axone. On utilise fréquemment le terme « neurite » dans le cadre de l'étude des stades de maturation neuronale (Figure 11). La maturation neuronale est un processus temporel complexe qui aboutit à la formation des contacts entre les neurones et à leur communication synchrone et spontanée à l'image du réseau neuronal *in vitro*. Durant le processus de maturation, les neurones commencent par développer des petites protrusions appelées lamellipodes (stade 1) qui donneront naissance quelques heures plus tard aux neurites immatures (stade 2). Ces neurites se spécialisent notamment avec l'apparition du cône

de croissance axonal qui va s'allonger rapidement pour former l'axone (stade 3). Ensuite, les neurites restants formeront les dendrites avec une arborescence de plus en plus grandissante (stade 4). Finalement, la maturation se termine par l'apparition et la formation des contacts synaptiques au niveau des épines dendritiques et des terminaisons axonales pour former le réseau neuronal (stade 5).

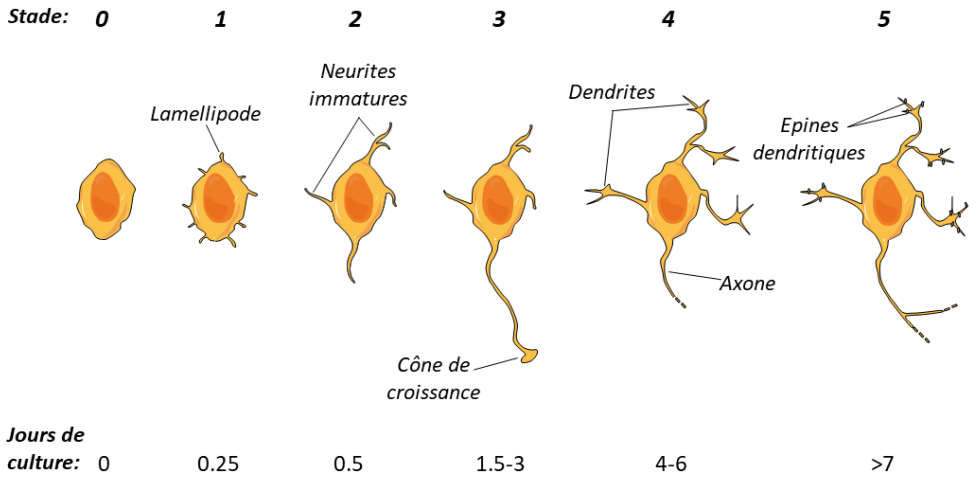


Figure 11 ***Représentation schématique des stades de développement des neurones in vitro****. Modèle de développement neuronal selon 5 stades de maturation au cours de la culture in vitro. Le* ***stade 1*** *survient quelques heures après l'ensemencement et se caractérise par l'apparition de lamellipodes à la surface du corps du neurone. Le* ***stade 2*** *se caractérise par la transformation des lamellipodes en neurites immatures qui en quelques heures grandissent rapidement. Les neurites immatures se spécifient dans le* ***stade 3****, notamment par l'apparition de l'axone qui s'allonge beaucoup plus rapidement que les autres neurites. Celui-ci est clairement identifiable par la présence du cône de croissance. Les dendrites se forment et s'allongent à partir du quatrième jour in vitro et caractérisent le* ***stade 4*** *de maturation. A partir du septième jour in vitro, les neurones forment les contacts synaptiques grâce notamment aux épines dendritiques et aux terminaisons axonales pour établir un réseau neuronal. Ceci constitue le stade final de maturation ou* ***stade 5****.*

Plusieurs études ont établi que l'APP jouait un rôle important dans le développement des neurites au niveau dendritique mais aussi axonal. Cependant, les résultats sont parfois inconsistants pour savoir si l'APP promeut ou inhibe la croissance neuritique. Par exemple dans les neurones *in vitro,* la perte de l'APP par délétion génétique (KO) ou par interférence ARN (Knock-Down) induit une augmentation de la croissance neuritique (Young-Pearse, Chen et al. 2008). Celle-ci serait en partie médiée par l'interaction de l'APP avec la sous-unité β1 de l'intégrine. De plus, l'APP holoprotéine aurait un effet inhibiteur sur la croissance neuritique expliquant notamment l'augmentation de la longueur de l'axone, du nombre de ramifications axonales, des neurites immatures et de la longueur totale des neurites dans les neurones embryonnaires hippocampiques dérivés de souris APP-/- (Billnitzer, Barskaya et al. 2013). A contrario, d'autres études ont démontré que surexprimer ou diminuer l'expression de l'APP induisait respectivement une augmentation et une diminution de la croissance neuritique dans les neurones hippocampiques *in vitro* (Hoe, Lee et al. 2009, Deyts, Clutter et al. 2016). Par ailleurs, des neurones différenciés à partir de cellules souches embryonnaires déficients pour l'APP, l'APLP1 et l'APLP2 (APPtKO) se différencient et développent des prolongements neuritiques à la manière des neurones contrôles (Bergmans, Shariati et al. 2010).

In vivo, les souris déficientes pour l'APP (APP-/-) ou mutées au niveau de leur domaine intracellulaire montrent une altération de l'arborisation dendritique (Tyan, Shih et al. 2012, Weyer, Zagrebelsky et al. 2014). Ce phénotype semble d'ailleurs dépendant de l'âge car il est visible seulement dans les souris âgées d'au moins 13 mois et pas dans leurs homologues de 3 mois (Tyan, Shih et al. 2012). L'épine dendritique est une excroissance de la membrane dendritique constituant le site de contact entre l'axone du neurone présynaptique et le neurone post-synaptique. Elle est donc le siège de la transmission synaptique, où sa dynamique, sa forme et sa densité sont des éléments déterminants pour l'activité et la plasticité neuronale. Bien que les neurones APP-/- *in vitro* montrent en général une diminution de la densité des épines évidente, les résultats *in vivo* restent plus subtils et se révèlent chez les souris APP-/- âgées uniquement (Lee, Moussa et al. 2010,

Tyan, Shih et al. 2012, Weyer, Zagrebelsky et al. 2014). En accord avec les études précédentes, la surexpression de l'APP dans les neurones en culture ou *in vivo* induit dès lors, une augmentation de la densité des épines dendritiques (Lee, Moussa et al. 2010). Contrairement aux études précédentes, *Bittner et al.* ont montré que les souris APP-/- avaient une augmentation de la densité des épines dendritiques au niveau du cortex cérébral et que celle-ci était diminuée après l'inhibition du clivage de l'APP par le complexe γ-sécrétase (Bittner, Fuhrmann et al. 2009).

L'APP et la fonction synaptique, l'apprentissage et la mémoire

L'apprentissage et la mémoire sont associés étroitement avec l'efficacité de la transmission synaptique et avec sa capacité de modulation (plasticité). Un nombre croissant de données suggèrent que l'APP et les membres de sa famille jouent un rôle prépondérant dans ces mécanismes. Tout d'abord, l'APP, l'APLP1 et l'APLP2 sont exprimés à la synapse du côté pré- et post-synaptique (Lyckman, Confaloni et al. 1998, Hoe, Fu et al. 2009, Schilling, Mehr et al. 2017). L'APP semble avoir une action directe sur la transmission synaptique et sur la fonction des récepteurs/canaux synaptiques. En effet, l'APP contrôle l'expression du canal calcique de type L, Cav1.2 dans les neurones et la perte de l'APP ou son extinction induit une altération de la potentialisation à court de terme GABAergique (Yang, Wang et al. 2009). La surexpression de l'APP humain dans les neurones corticaux inhibe l'activité électrique spontanée du réseau à cause d'une augmentation des courants calciques de type L (Santos, Pierrot et al. 2009).

In vivo, les tranches d'hippocampes de souris APP-/- montrent une diminution de la dépression synaptique dépendante des courants inhibiteurs GABA (Seabrook, Smith et al. 1999). L'APP pourrait également moduler la transmission synaptique excitatrice en altérant l'expression ou le transport des récepteurs AMPA et NMDA. En effet, l'APP_{695} transfecté dans les cellules HEK293 peut interagir avec les sous-unités GluN2A et GluN2B des récepteurs NMDA (Cousins, Hoey et al. 2009). Dans les neurones hippocampiques *in vitro*, éteindre l'expression de l'APP diminue (et à l'inverse, surexprimer l'APP augmente) les courants excitateurs post-

synaptiques en recrutant davantage de récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B (Hoe, Fu et al. 2009). De plus, d'autres études montrent que surexprimer l'APP dans les neurones hippocampiques augmente de manière spécifique l'expression totale et membranaire de la sous-unité GluA2. À part l'APP holoprotéine, certains fragments issus de son métabolisme sont capables de réguler la transmission synaptique. Infuser le fragment sAPPα dans l'hippocampe favorise les courants NMDA, facilite la potentialisation à long terme (PLT) et contribue à améliorer la mémoire spatiale des rongeurs (Taylor, Ireland et al. 2008, Xiong, Jones et al. 2017). La PLT constitue un des mécanismes cellulaires qui sous-tend à l'apprentissage et à la mémoire. À l'inverse, infuser l'hippocampe avec des anticorps neutralisant le sAPPα endogène induit une diminution de la PLT d'environ 50% (Taylor, Ireland et al. 2008). La sécrétion de ce fragment est directement proportionnelle à l'activité neuronale (Nitsch, Slack et al. 1992, Mills and Reiner 1999). Ceci suggère donc que le sAPPα est produit par les neurones actifs afin de supporter la plasticité synaptique.

De plus en plus d'études suggèrent que l'Aβ, à part son implication dans la formation des oligomères et des plaques amyloïdes, jouerait un rôle dans la physiologie neuronale. En effet, l'Aβ produit tout au long de la vie se trouve en concentration de l'ordre du picomolaire dans le liquide céphalo-rachidien et le plasma des individus sains (Seubert, Vigo-Pelfrey et al. 1992). L'hypothèse est que l'Aβ, tout comme le sAPPα, est produit suite à l'augmentation de l'activité neuronale (Kamenetz, Tomita et al. 2003, Cirrito, Yamada et al. 2005, Cirrito, Kang et al. 2008), et qu'à son tour l'Aβ aiderait à maintenir l'activité neuronale dans une gamme physiologique en diminuant l'activité synaptique (Kamenetz, Tomita et al. 2003). D'ailleurs, des études ont montré que des concentrations physiologiques d'Aβ améliorent la PLT et la mémoire chez la souris via son action sur les récepteurs cholinergiques de type nicotinique (Puzzo, Privitera et al. 2008, Garcia-Osta and Alberini 2009).

L'ensemble de ces données démontrent que l'APP ou certains de ces dérivés protéolytiques modulent la transmission synaptique (inhibitrice et excitatrice) avec une implication directe sur certaines formes de plasticités synaptiques, telles que la facilitation ou dépression synaptique et la

potentialisation à long terme. Ces données sont clairement appuyées par le fait que des déficits de potentialisation à long terme, de mémoire spatiale de travail et de résistance au stress hypoxique et épileptique sont observés chez les souris âgées déficientes pour l'APP (Steinbach, Muller et al. 1998, Dawson, Seabrook et al. 1999, Ring, Weyer et al. 2007, Hefter, Kaiser et al. 2016). De plus, des modèles *in vivo* dans lesquels le métabolisme de l'APP est altéré en défaveur de l'Aβ, par une perte des présénilines ou du clivage β-sécrétase, montrent également des déficits cognitifs associés à une altération de la plasticité synaptique (Saura, Choi et al. 2004, Laird, Cai et al. 2005). Finalement, la réexpression du sAPPα dans les souris APP-/- est suffisante pour restaurer leurs déficits synaptiques, de PLT et de mémoires (Ring, Weyer et al. 2007).

Les mécanismes qui sous-tendent les fonctions de l'APP

À l'heure actuelle, les mécanismes grâce auxquels l'APP exerce ses fonctions physiologiques au niveau du système nerveux central (croissance neuritique, synaptogenèse et activité synaptique) restent encore mal compris. L'idée que l'APP puisse être un récepteur cellulaire à un domaine transmembranaire remonte à plusieurs années, et est principalement basée sur sa ressemblance structurelle avec les récepteurs membranaires de type I (Kang, Lemaire et al. 1987). Depuis, il a été montré que l'APP peut agir comme un récepteur et un ligand grâce à des similarités fonctionnelles avec des facteurs de croissance et des molécules d'adhésion cellulaire. Toutefois, la demi-vie faible de l'APP laisse à croire que son rôle est probablement plus comparable à celui d'un récepteur (interaction avec le ligand, dimérisation, internalisation, recyclage), qu'à celui d'une protéine de structure (jonction cellulaire). Bien que l'APP ne possède pas d'activité enzymatique *per se*, il peut former des dimères (cis et trans), à l'instar d'un récepteur, et transmettre un signal extracellulaire vers l'intérieur de la cellule en activant différentes voies de signalisation. Cette propriété pourrait être régulée par son domaine intracellulaire via différentes interactions avec des protéines adaptatrices et effectrices. De plus, sa signalisation intracellulaire pourrait ressembler à celle de la protéine Notch qui après plusieurs clivages, orchestrés par la furin-convertase, l'α-sécrétase et la γ-sécrétase, libère son

domaine intracellulaire (NICD) qui migre dans le noyau et modifie l'expression de gènes cibles.

Les paragraphes suivants aborderont en détail les aspects mécanistiques (les aspects structurels, les interactions fonctionnelles, la dimérisation et la signalisation intracellulaire) liés aux fonctions de l'APP.

Similarité structurelle avec un récepteur, domaines fonctionnels et dimérisation de l'APP

Bien que la structure tridimensionnelle de l'APP n'ait pas encore été entièrement résolue, différents domaines (décrits dans « le clonage, le gène et la structure de l'APP ») ont été identifiés. Parmi ceux-ci, les domaines HBD de la région E1 (aussi appelés GFLD) et de la région E2 sont d'un intérêt particulier puisque leurs structures ressemblent aux sites de reconnaissance des ligands retrouvés dans les facteurs de croissances et les récepteurs membranaires. Ils ont toutefois une affinité différente pour l'héparine avec une haute affinité pour le GFLD et une faible affinité pour l'HBD de la région E2 (Reinhard, Borgers et al. 2013). L'interaction du domaine E1 avec les protéoglycanes à héparane sulfate semble requise pour l'induction de la croissance neuritique dépendante de l'APP (Small, Nurcombe et al. 1994). De plus, la séquence penta-peptidique RERMS située dans la région E2 promeut également l'extension neuritique *in vitro* (Jin, Ninomiya et al. 1994). L'APP peut également interagir avec le collagène de type I dont le site de fixation se situe entre les résidus 448 et 465 de l'APP_{695} (Beher, Hesse et al. 1996). Sur base de ses caractéristiques structurelles, l'APP semble donc avoir un rôle dans l'interaction avec différentes protéines de la matrice extracellulaire mais également avec toute une série de protéines transmembranaires (Figure 12-5), à la manière d'un récepteur et de son ligand, pour moduler une grande variété de fonctions cellulaires (signalisation, internalisation et adressage, activité de récepteurs canaux à la synapse,…) (pour revue (Muller, Deller et al. 2017)).

La dimérisation de l'APP est une autre caractéristique comparable aux récepteurs membranaires tels que les récepteurs à tyrosine kinase (Lemmon and Schlessinger 2010). Ce type de récepteurs s'associent en dimère à la membrane plasmique pour activer les voies de signalisations cellulaires.

L'APP dimérise grâce à deux sites, l'un du coté N-terminal et l'autre au niveau du domaine juxta/transmembranaire. La dimérisation de l'APP holoprotéine semble être dépendante principalement de la région E1. Celle-ci contient une boucle stabilisée par la présence de ponts disulfures nécessaires à la conformation favorisant l'homodimérisation de l'APP (Rossjohn, Cappai et al. 1999, Dahms, Hoefgen et al. 2010). D'autres études ont montré que la région E2 est capable de dimériser dans une orientation antiparallèle *in vitro* (Wang and Ha 2004) (Figure 12-1). La région E2 de l'APP peut d'ailleurs former des interactions *trans* avec le death receptor 6 (DR6) qui appartient à la famille des récepteurs du facteur de la nécrose tumorale TNFR (littéralement, Tumor Necrosis Factor Receptor) (Figure 12-6). Cette interaction entraine, à l'interface entre des cellules tumorales exprimant l'APP et les cellules endothéliales, l'activation des caspases et la mort cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Strilic, Yang et al. 2016). Auparavant, il a été suggéré que cette interaction contribuait à la neurodégénérescence dans la maladie d'Alzheimer (Nikolaev, McLaughlin et al. 2009). Des études récentes ont montré que la présence des domaines KPI de l'APP_{751} augmente la dimérisation *cis* de l'APP (Ben Khalifa, Tyteca et al. 2012, Ben Khalifa, Tyteca et al. 2012) (Figure 12-2). Ces dimères se forment principalement au sein de la voie sécrétoire et régulent le métabolisme de l'APP en favorisant la voie non-amyloïdogène. *Soba et. al* ont démontré que l'APP et ces paralogues peuvent former des homo- et hétérodimères en orientation *trans* afin de promouvoir l'adhésion intercellulaire *in vivo* (Soba, Eggert et al. 2005). Des co-cultures HEK293/neurones ont montré que la formation de *trans* dimères d'APP induisait la spécialisation présynaptique dans les neurones. Ces études ont identifié l'APP comme une nouvelle classe de molécules d'adhésion synaptique. Des études récentes *in vitro* et *in vivo* montrent que la dimérisation de l'APP joue un rôle essentiel dans la synaptogenèse et que cette fonction pourrait être dépendante de la présence de cuivre (Wang, Wang et al. 2009, Baumkotter, Schmidt et al. 2014). La dimérisation de l'APP au niveau de ces domaines E1 et E2 peut être régulée par de la fixation aux protéines de la matrice extracellulaire ou à l'héparine (Dahms, Hoefgen et al. 2010, Hoefgen, Coburger et al. 2014) ainsi que par le fragment soluble sAPPα (Gralle, Botelho et al. 2009). Il a été montré que le fragment sAPPα fixe l'APP holoprotéine (Figure 12-4) afin d'activer une signalisation

dépendante d'Akt pour la survie cellulaire (Milosch, Tanriover et al. 2014). En outre, il entre en compétition avec l'APP pour la régulation de la croissance neuritique dépendante de l'intégrine β1 (Young-Pearse, Chen et al. 2008).

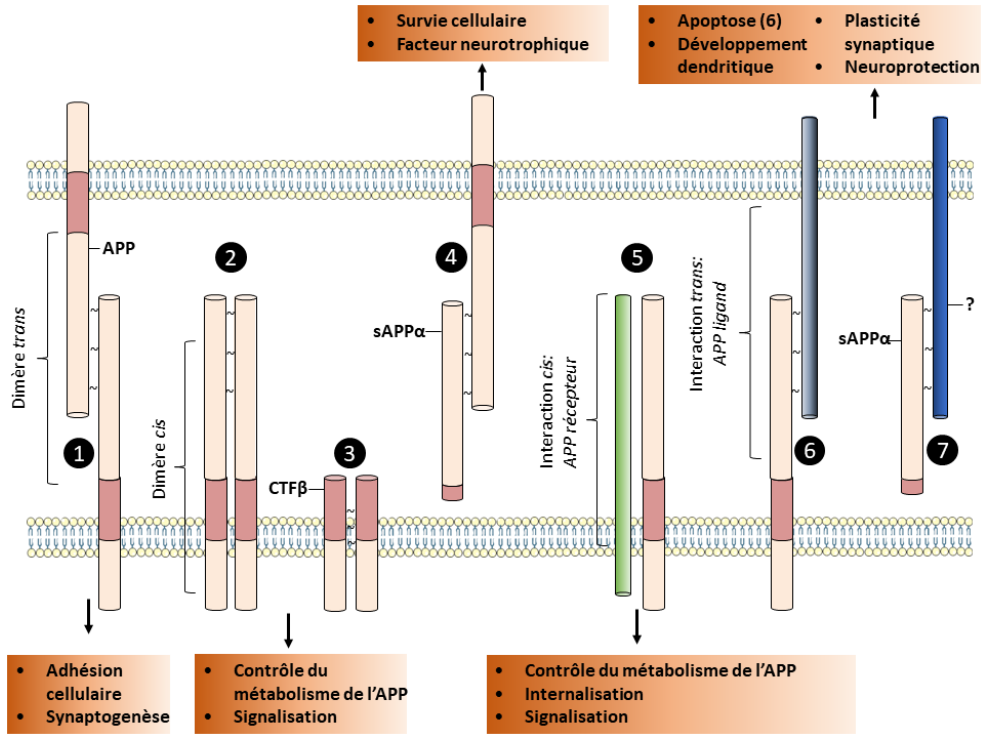


Figure 12 ***Rôles des interactions (cis et trans) des membres de la famille de l'APP (et leurs métabolites) et les fonctions cellulaires associées****. La formation des dimères trans (**1**) et cis (**2**) peut se produire de façon homophilique (entre deux molécules d'APP ou d'APLPs) ou hétérophilique (entre une molécule d'APP et d'APLPs). Ce type d'interactions joue un rôle dans l'adhésion cellulaire et la synaptogenèse. La dimérisation cis des fragments CTFβ dépend des motifs GXXXG situés dans la région juxtamembranaire (**3**) et pourrait moduler les clivages successifs par la γ-sécrétase. Le fragment sAPPα produit et sécrété par la voie non-amyloïdogène fixe l'APP holoprotéine et stimule la survie et la croissance neuronale (**4**). À la manière d'un récepteur, l'APP peut interagir avec d'autres protéines transmembranaires (**5**) qui modifieront son métabolisme, son internalisation et ses fonctions de signalisation. L'APP holoprotéine peut fixer en orientation trans des récepteurs cellulaires (**6**) et induire leur activation (par exemple : l'apoptose cellulaire par l'activation du récepteur DR6). Le fragment sAPPα peut également fixer d'autres protéines membranaires encore non-identifiées (**7**) pour expliquer ces fonctions dans la plasticité synaptique et la neuroprotection. Adapté de (Muller, Deller et al. 2017).*

Le domaine transmembranaire de l'APP contient également 3 motifs GxxxG non conservés par les autres membres de la famille. Ces motifs forment une interface étendue au sein de la membrane plasmique qui favoriserait ou renforcerait la *cis* dimérisation de l'APP et du C99 (Munter, Voigt et al. 2007, Kienlen-Campard, Tasiaux et al. 2008) (Figure 12-3). L'importance de ces motifs dans la dimérisation des protéines transmembranaires reste controversée (Teese and Langosch 2015) et peut paraitre marginale dans le cas de l'APP holoprotéine (Ben Khalifa, Tyteca et al. 2012). Toutefois, ces motifs jouent un rôle important dans le contexte du métabolisme des fragments C-terminaux de l'APP à travers la voie amyloïdogène (Munter, Voigt et al. 2007, Kienlen-Campard, Tasiaux et al. 2008, Decock, El Haylani et al. 2015) et dans la production et l'agrégation de l'Aβ toxique (Decock, Stanga et al. 2016).

Le domaine intracellulaire de l'APP (AICD)

Les mécanismes de transduction du signal recruté par l'APP restent encore très mal caractérisés. Etant dépourvu d'activité enzymatique, l'APP pourrait modifier des voies de signalisations grâce à sa capacité d'interaction avec des protéines effectrices partenaires. Le domaine C-terminal de l'APP, aussi appelé AICD (littéralement APP IntraCellular Domain), abrite plusieurs motifs d'interactions de protéines. Ces motifs contrôlent l'interaction de l'APP holoprotéine ou de l'AICD (fragment) avec des protéines telles que Fe65, Mint/X11, Numb et Dab1 qui induisent respectivement des régulations transcriptionnelles (Muller, Meyer et al. 2008, Pardossi-Piquard and Checler 2012), la formation des synapses (Ashley, Packard et al. 2005, Wang, Wang et al. 2009), le développement et la migration neuronale (Young-Pearse, Bai et al. 2007).

Dans la suite du manuscrit, je décrirai en détail la structure de l'AICD, sa production et sa dégradation, son rôle dans la régulation transcriptionnelle dépendante de l'APP.

Le domaine intracellulaire de l'APP

Structure de l'AICD

La séquence de l'AICD contient 50 acides aminés, commence au résidu Val646 et se termine au résidu Asn695 (numérotation de l'APP_{695}) (Figure 13). Les trois premiers acides aminés sont localisés dans la région membranaire, les autres dans le cytoplasme. Sa structure tridimensionnelle semble peu ordonnée et instable mais contiendrait une hélice naissante (Asp664-Ala666) ainsi qu'un repli β (Asn684-Tyr687) et une *helix-capping box* (Val667-Arg672) (Ramelot, Gentile et al. 2000). Des éléments que l'on retrouve dans d'autres domaines intracellulaires de protéines et qui joueraient un rôle prépondérant dans la reconnaissance des sites d'interactions sur les protéines partenaires. La phosphorylation de certains résidus comme la Thr668 modifie la structure de l'AICD et influence l'interaction avec des protéines partenaires (Ando, Iijima et al. 2001, Ramelot and Nicholson 2001). La séquence de l'AICD renferme trois principaux motifs : les séquences ^{653}YTSI, ^{667}VTPEER et ^{681}GYENPTY (Figure 13).

La Tyr653 du premier motif ^{653}YTSI est impliquée dans le transport basolatéral de l'APP dans les cellules MDCK (Lai, Gibson et al. 1998). Par contre, ce motif ne semble pas être impliqué dans le transport de l'APP neuronal vers les dendrites ou l'axone (Back, Haas et al. 2007). Ce premier motif contient trois résidus phosphorylables (YTS). Parmi ceux-ci, la Thr654 et la Ser655 sont phosphorylées dans le cerveau de rat (Oishi, Nairn et al. 1997). Le deuxième motif ^{667}VTPEER contient le résidu Thr668 décrit pour son implication dans le métabolisme amyloïdogène de l'APP. La phosphorylation de la Thr668 semble spécifique du tissu neuronal (Iijima, Ando et al. 2000) et se retrouve principalement dans la forme mature de l'APP (Figure 13). La phosphorylation de la Thr668 de l'APP_{695} diminue la production de l'Aβ *in vitro* (Feyt, Pierrot et al. 2007). Dans les neuroblastomes SH-SY5Y surexprimant l'APPsw, la phosphorylation des CTFs sur la Thr668 facilite leur dégradation par la γ-sécrétase (Vingtdeux, Hamdane et al. 2005). Contrairement aux données *in vitro*, les souris knock-in exprimant un APP muté sur ce résidu en Alanie ($APP_{TA/TA}$), ne montrent

pas d'altérations de la localisation, du métabolisme et de la production d'Aβ, ce qui questionne donc l'importance physiologique de cette phosphorylation (Sano, Nakaya et al. 2006). Dans les neurones, la glycogène synthase kinase-3β (GSK3β) et la cycline-dépendante kinase 5 (CDK5) phosphorylent la Tyr668 (Müller and Klemens 2012). Au cours de la différenciation ou maturation neuronale *in vitro*, la c-Jun N-terminal Kinase 3 (JNK3) phosphoryle la Tyr668 ce qui diminue les niveaux d'AICD détectable au sein du noyau (Kimberly, Zheng et al. 2005). Dans les cellules en division ou exposées à un stress la phosphorylation est exécutée par les kinases CDK1/2 et par la JNK (Müller and Klemens 2012).

Le dernier motif ^{681}GYENPTY est probablement le plus étudié car il est le seul à être conservé par les différents membres de la famille (APP, APLP1 et APLP2). Il contient notamment le motif NPXY bien connu pour être un motif d'internalisation des protéines membranaires. Le signal NPXY permet l'internalisation rapide des protéines telles que les récepteurs au LDL (LDLR), l'intégrine β et les récepteurs tyrosines kinases par l'endocytose clathrine-dépendant (Pandey 2009). À part cela, le motif NPXY est connu pour interagir avec les protéines contenant les domaines fixant la phosphotyrosine, PTB (littéralement, PhosphoTyrosine-Binding). Ce motif est également présent dans les protéines lysosomales endocytées et adressées aux lysosomes. Dans l'AICD, ce motif est complété du côté N-terminal par les résidus ^{681}GYE, dont la phosphorylation de la Tyr682 (Figure 13) jouerait un rôle important dans la fonction de l'AICD en tant que régulateur transcriptionnel. En effet, cette tyrosine phosphorylée déstabilise également l'interaction de la protéine adaptatrice Fe65 avec l'AICD. In vitro, la phosphorylation est induite par l'activation du *nerve growth factor receptor* TrKA et par la kinase Abl1. La phosphorylation de cette Tyr682 favoriserait le métabolisme amyloïdogène de l'APP par la relocalisation de celui-ci vers la voie endocytaire (Müller and Klemens 2012). Ainsi, une souris transgénique exprimant un APP muté non phosphorylable (APPYG/YG) voit un déplacement important du métabolisme de l'APP vers la voie non amyloïdogène avec une augmentation des fragments sAPPα, CTFα et une diminution des sAPPβ et Aβ (Barbagallo, Weldon et al. 2010). De plus, la

phosphorylation de la Tyr682 est requise ou déstabilise la fixation des différents partenaires avec l'AICD (Müller and Klemens 2012) (Figure 13).

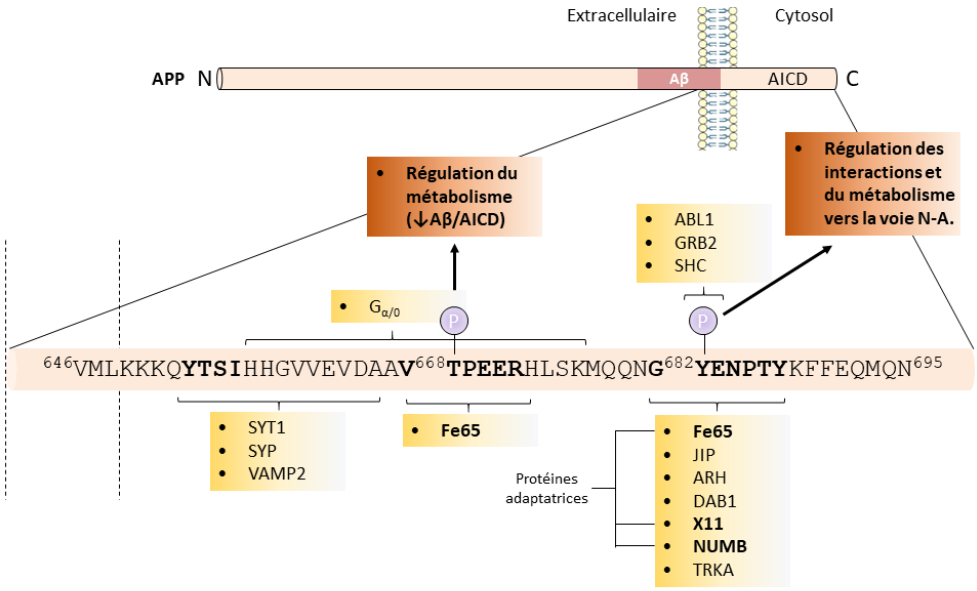


Figure 13 ***Structure, motifs et protéines interagissant avec le domaine intracellulaire de l'APP.*** *Représentation schématique de l'APP695 et de son domaine intracellulaire (AICD) comportant la séquence en acides aminés de l'AICD et les motifs YTSI, VTPEER et GYENPTY indiqués en gras. Certaines protéines et leur site d'interaction connu sur l'AICD sont représentés dans les encadrés jaunes. Les protéines surlignées en gras sont des protéines adaptatrices qui lient l'APP à d'autres protéines non illustrées ici. La phosphorylation des résidus Thr668 et Tyr682 est représentée par les cercles mauves. Les encadrés orange indiquent le rôle de ces phosphorylations dans la production de l'Aß et dans la fixation des protéines avec l'AICD (N-A,* ***N****on-****A****myloïdogène). ABL1, c-abl oncogen 1 ; ARH, autosomal recessive hypercholesterolemia protein ; DAB1, disabled homologue 1 ; Fe65, amyloid-beta A4 precursor protein-binding family B member 1 ; GRB2, growth factor receptor-bound protein 2 ; Gα0, G-protein subunit Gα0 ; JIP, c-Jun N-terminal kinase-interacting protein ; NUMB, Numb homolog ; SHC, Src homoly 2 domain-containing-transforming protein 1 ; SYP, synaptophysin ; SYT1, synaptotagmin 1 ; TRKA, tyrosine kinase receptor A ; VAMP2, vesicul-associated membrane protein 2 ; X11 (MINT1), Munc 18 interacting protein 1.*

La production et la dégradation de l'AICD

Il faut différencier le domaine cytoplasmique de l'APP holoprotéine et le peptide AICD soluble. Les fonctions de la région AICD de l'APP holoprotéine et du peptide AICD généré par la γ-sécrétase sont vraisemblablement des fonctions différentes (pour revues voir (Müller and Klemens 2012, Pardossi-Piquard and Checler 2012, Muller, Deller et al. 2017). Le peptide AICD, ci-dessus mentionné comme « AICD » est issu du clivage successif de l'APP par l'α- ou la β-sécrétase suivi d'un clivage par le complexe γ-sécrétase le libérant dans le cytosol (voir section « métabolisme de l'APP »). Dans cette section j'aborderai principalement sa production et sa dégradation dans le cadre de sa fonction proposée de régulateur transcriptionnel.

L'AICD est décrit pour la première fois par *Passer et al.* comme un peptide pro-apoptotique généré en même temps que l'Aβ par le clivage γ-sécrétase. Celui-ci était formé intuitivement de 57 ou 59 acides aminés et issu du clivage sur le site γ de l'APP ou du fragment CTFβ (ou C99) (Passer, Pellegrini et al. 2000). Un nouveau site de clivage nommé site ε a été rapidement identifié comme premier site de clivage de la γ-sécrétase libérant l'AICD (Gu, Misonou et al. 2001, Sastre, Steiner et al. 2001, Weidemann, Eggert et al. 2002). Dès lors, la forme principale détectable est l'AICD50 (Yu, Kim et al. 2001) mais l'AICD48 et 51 ont également été détectés, résultant d'un clivage alternatif au niveau du site ε (Yu, Kim et al. 2001, Sato, Dohmae et al. 2003). L'homologie du clivage ε avec le clivage S3 de la protéine NOTCH a donné le premier indice quant à la fonction potentielle de l'AICD dans la régulation transcriptionnelle à l'instar du NICD (littéralement **N**otch **I**ntra**C**ellular **D**omain) (Bray 2016). L'APP peut également être clivé au niveau de l'Asp664 du site ^{661}VEVDA par les caspases 8 et 9 pour produire un fragment C-terminal contenant les 31 derniers résidus de l'APP (AICD31). Celui-ci se retrouve dans les préparations de synaptosomes de cerveaux de patients Alzheimer et pourrait contribuer à l'induction de la dégénérescence synaptique (Lu, Rabizadeh et al. 2000). Les clivages aux sites ε et γ sont orchestrés par la même activité protéolytique dépendant des présénilines. Ainsi, une production stœchiométrique de l'Aβ et de l'AICD peut être détectée dans un modèle *in vitro* d'activité γ-sécrétase sur des membranes solubilisées (Kakuda, Funamoto et al. 2006). De plus, des mutations

familiales de la maladie d'Alzheimer dans l'APP, PS1 et PS2 augmentent la production de peptides Aβ42 et d'AICD de manière concomitante (Sato, Dohmae et al. 2003). En outre, l'utilisation du DAPT, un inhibiteur de γ-sécrétase, abolit la production d'Aβ, d'AICD et entraine une augmentation des fragments CTFs démontrant la dépendance de l'activité γ-sécrétase pour leur production respective (Hage, Marinangeli et al. 2014). Néanmoins, de plus en plus de données suggèrent que les clivages ε et γ peuvent être modulés indépendamment l'un de l'autre en affectant de manière différente la production d'Aβ et d'AICD. D'ailleurs dans des modèles *in vitro*, des mutations familiales sur l'APP ou la PS1 induisent une augmentation de la production d'Aβ42 et une diminution d'AICD (Chen, Gu et al. 2002). Plus récemment, d'autres études ont montré des effets différents sur la production d'AICD et d'Aβ de modulateurs tels que TMP21 (littéralement, 21kDa transmembrane protein), GSAP (littéralement, *Gamma secretase activating protein*) et Fe65 (Chen, Hasegawa et al. 2006, Wiley, Smith et al. 2007, He, Luo et al. 2010).

Théoriquement, les voies non- et amyloïdogènes produiraient de l'AICD via le clivage respectif de CTFα (C83) et de CTFβ (C99). Bien que l'AICD ait été détecté après clivage du CTFα *in vitro* (Kume, Maruyama et al. 2004), il semble être préférentiellement produit à partir de la voie amyloïdogène et donc à partir du clivage γ-sécrétase du fragment CTFβ. Plusieurs études tendent à le prouver ; le clivage au site ε peut être modulé par le pH (Fukumori, Okochi et al. 2006). Les compartiments endocytaires ont un pH généralement acide requis pour une activité optimale des différentes protéases (BACE1 et des présénilines (Checler 2001)). La production d'AICD à partir du C83 est moins importante qu'à partir du C99 lorsque ces fragments sont directement transfectés dans les cellules (Passer, Pellegrini et al. 2000) ou dans un modèle de membranes solubilisées (Flammang, Pardossi-Piquard et al. 2012). Sa production et sa translocation au sein du noyau sont dépendantes de la voie amyloïdogène (Goodger, Rajendran et al. 2009). D'ailleurs, l'AICD transcriptionnellement actif dériverait principalement de l'APP_{695}, l'isoforme neuronale, métabolisé préférentiellement par la voie amyloïdogène (Belyaev, Kellett et al. 2010) afin de réguler l'expression de gènes cibles.

L'AICD est un peptide dont la durée de vie est très courte dans le cytosol lorsqu'il est libéré par le clivage ε. L'AICD59, avec une demi-vie d'environ 5 minutes, est très rapidement dégradé lorsqu'il est surexprimé dans les cellules BHK (Cupers, Orlans et al. 2001). Par ailleurs, la métalloprotéinase IDE (littéralement, *Insulin Degrading Enzyme*) a été identifiée comme étant l'enzyme responsable de la dégradation rapide de l'AICD dans le cytosol *in vitro* (Edbauer, Willem et al. 2002) mais également *in vivo* où l'AICD est considérablement augmenté dans les souris déficientes pour l'IDE (Farris, Mansourian et al. 2003). La voie de dégradation du protéasome dégraderait également l'AICD (Nunan, Williamson et al. 2003). Neutraliser l'acidification des endosomes et/ou des lysosomes induit également une accumulation importante de l'AICD suggérant un rôle important de cette voie de dégradation dans l'accumulation de ses métabolites cellulaires (Vingtdeux, Hamdane et al. 2007). Ces données sont confortées par celles de *Asai et al.* montrant que l'inhibition d'enzymes lysosomales, les cathepsines B, induit l'accumulation des CTFs et de l'AICD (Asai, Yagishita et al. 2011). Finalement, l'interaction de l'AICD avec la protéine adaptatrice Fe65 augmente sa stabilité et favoriserait donc sa fonction de régulateur transcriptionnel (Kimberly, Zheng et al. 2001, Müller and Klemens 2012, Pardossi-Piquard and Checler 2012).

Partenaires d'interactions et rôle de l'AICD dans la régulation transcriptionnelle

L'interactome de l'APP comporte plus de 200 protéines qui interagissent avec les régions extracellulaires et intracellulaires de l'APP. La pertinence de ces interactions *in vivo* reste incertaine dès lors que la plupart de celles-ci ont été étudiées dans le contexte de la production du peptide Aβ à l'aide de modèle *in vitro*. Certaines d'entre elles ont été étudiées plus en détail et mettent en évidence que l'APP est « connecté » aux fonctions cellulaires comme la transmission synaptique par interaction avec les récepteurs NMDA, aux protéines des vésicules synaptiques (SYP, SYT1, VAMP2, SNAREs, …), mais aussi à la migration neuronale (Dab1), à la neurogenèse (DISC1), à la signalisation intracellulaire (Gαs), à la régulation transcriptionnelle (Fe65, Tip60, MED12,…) en interagissant avec des protéines intracellulaires.

Étant donné sa production faible (moins de 10% de l'APP passe par la voie amyloïdogène) et sa dégradation rapide, les fonctions attribuées à l'APP via son domaine intracellulaire nécessitent vraisemblablement la coopération de protéines partenaires. Aujourd'hui pas moins de 25 protéines interagissant avec l'AICD ont été décrites (Muller, Deller et al. 2017). Certaines sont représentées dans la figure 12 avec leur site d'interaction connu. Parmi celles-ci, on distingue les protéines adaptatrices (Figure 13) qui permettent l'association de l'APP avec d'autres protéines comme Tip60, LRP1, Notch,… complexifiant d'autant plus le réseau d'interactions de l'APP et les fonctions dans lesquelles il peut jouer un rôle.

Le motif GYENPTY est le site préférentiel d'interactions pour les protéines adaptatrices X11, NUMB et Fe65. Celles-ci sont les plus étudiées parmi les protéines interactrices car elles influencent par divers mécanismes la fonction controversée de régulateur transcriptionnel de l'AICD.

X11/Mints

Les protéines Mints sont au nombre de trois dont Mint1 et Mint2 qui sont exprimées exclusivement dans le cerveau alors que Mint3 est exprimée de manière ubiquiste. Elles sont composées d'une région N-terminale spécifique de chaque isoforme, et d'une région C-terminale présentant un domaine PTB et deux domaines PDZ (littéralement, *PSD95, Dlig1, Zo-1*). Les trois Mints peuvent fixer l'APP (Biederer, Cao et al. 2002). Dans les cellules HEK293 surexprimant l'APPSw (APP KM670/671NL) et les Mints, le clivage amyloïdogène est diminué (Borg, Yang et al. 1998, Sastre, Turner et al. 1998). Il semble donc que la fixation des Mints à l'APP réduit la production et la sécrétion de peptide Aβ. Dans le cerveau de souris déficiente pour X11, l'APP est davantage clivé par la β-sécrétase et la γ-sécrétase au niveau des radeaux lipidiques (lipid rafts). Ceci induit donc une augmentation de la production des fragments sAPPβ et du peptide Aβ et suggère que la fixation de X11 à l'APP empêche la translocation de l'APP vers les compartiments où les clivages par la β- et la γ-sécrétase se produisent, notamment les radeaux lipidiques, diminuant le métabolisme amyloïdogène (Saito, Sano et al. 2008).

Numb et la protéine Notch

De manière surprenante, la fixation de Numb sur l'AICD inhibe la signalisation de Notch dans un système de gènes rapporteurs in vitro (Roncarati, Sestan et al. 2002) suggérant une interaction fonctionnelle entre l'APP et Notch. Comme l'APP, la protéine Notch subit une série de clivages protéolytiques. Le clivage de Notch par la γ-sécrétase aboutit à la libération du fragment intracellulaire (NICD) et à sa migration dans le noyau. Dans celui-ci, il s'associe avec les coactivateurs CSL et MAM pour activer la transcription de gènes cibles. Bien qu'il existe des différences structurelles notables entre l'AICD et le NICD (50aa vs 788aa, absence de signal de localisation nucléaire), cette analogie entre le clivage de l'APP et de Notch, et le rôle de régulateur transcriptionnel du NICD a contribué à ouvrir un nouveau champ d'investigations concernant le rôle potentiel de l'AICD dans la régulation transcriptionnelle.

Fe65 et la régulation transcriptionnelle dépendante de l'AICD

Actuellement, la fonction de régulateur transcriptionnel attribuée à l'AICD est corrélée à son association à la protéine adaptatrice Fe65. Celle-ci a été initialement identifiée et caractérisée comme un activateur transcriptionnel (Duilio, Zambrano et al. 1991). La famille de Fe65 comporte trois membres Fe65, Fe65L1 et Fe65L2. Alors que Fe65 est enrichi dans le cerveau, les profils d'expression de Fe65L1 et Fe65L2 sont plus étendus. Chacun des membres contient un domaine WW et deux domaines PTB (Minopoli, Gargiulo et al. 2012). Fe65 s'associe au domaine intracellulaire de l'APP via son domaine PTB2 (Fiore, Zambrano et al. 1995, Borg, Ooi et al. 1996, Guenette, Chen et al. 1996, McLoughlin and Miller 1996). La présence de l'AICD dans le noyau est un prérequis logique pour sa fonction de régulateur transcriptionnel. Les travaux de *Cao et Sudhöf* ont apporté les premières évidences de principe d'une activité transcriptionnelle de l'AICD dans un système rapporteur. En utilisant l'APP fusionné dans sa partie C-terminale au domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4 de la levure (APP-Gal4), ils ont observé que l'AICD-Gal4, associé à Fe65 et à une histone acétyltransférase Tip60 était capable d'activer la transcription du gène rapporteur Gal4RE-luciférase (Cao and Sudhof 2001). Plusieurs études ont montré par la suite

que l'AICD et Fe65 (et Tip60) sont retrouvés dans le noyau cellulaire (von Koch, Zheng et al. 1997, Kimberly, Zheng et al. 2001, Muresan and Muresan 2004, Pardossi-Piquard, Petit et al. 2005, Goodger, Rajendran et al. 2009). Le complexe formé de l'**A**ICD, **F**e65 et **T**ip60 (AFT) se trouverait essentiellement dans des zones de transcription active du noyau les mêmes où l'on retrouve le NICD (von Rotz, Kohli et al. 2004, Goodger, Rajendran et al. 2009, Konietzko, Goodger et al. 2010).

Le modèle des régulations transcriptionnelles dépendantes de l'AICD décrit ici est représenté en figure 14. Des données expérimentales suggèrent que tous les AICD produits dans la cellule ne sont pas transcriptionnellement « actifs ». L'AICD impliqué dans la régulation génique provient principalement du clivage de l'APP_{695}, l'isoforme neuronale. La surexpression de l'APP695 dans les cellules SH-SY5Y provoque une augmentation de l'AICD nucléaire. De plus, la voie amyloïdogène serait à l'origine d'une production plus importante d'AICD « actif » du point de vue transcriptionnel. *Belyaev et al.* ont montré que l'inhibition des β- et γ-sécrétases contrairement à l'inhibition de l'α-sécrétase, abolit l'induction du gène NEP (Belyaev, Kellett et al. 2010). L'invalidation génétique de BACE1 ou l'inhibition de son endocytose *in vitro* mène à une diminution drastique de la translocation de l'AICD et de la formation des complexes AFT (Goodger, Rajendran et al. 2009). Cela suggère que l'AICD produit à la membrane dans la voie non-amyloïdogène est rapidement dégradé dans le cytosol alors que celui produit dans la voie amyloïdogène dans les endosomes est stabilisé et peut migrer dans le noyau avec Fe65 (Figure 14). Une fois dans le noyau le complexe AICD/Fe65 s'associe à Tip60, une histone acétyle transférase, pour fixer le promoteur et activer la transcription de gènes cibles.

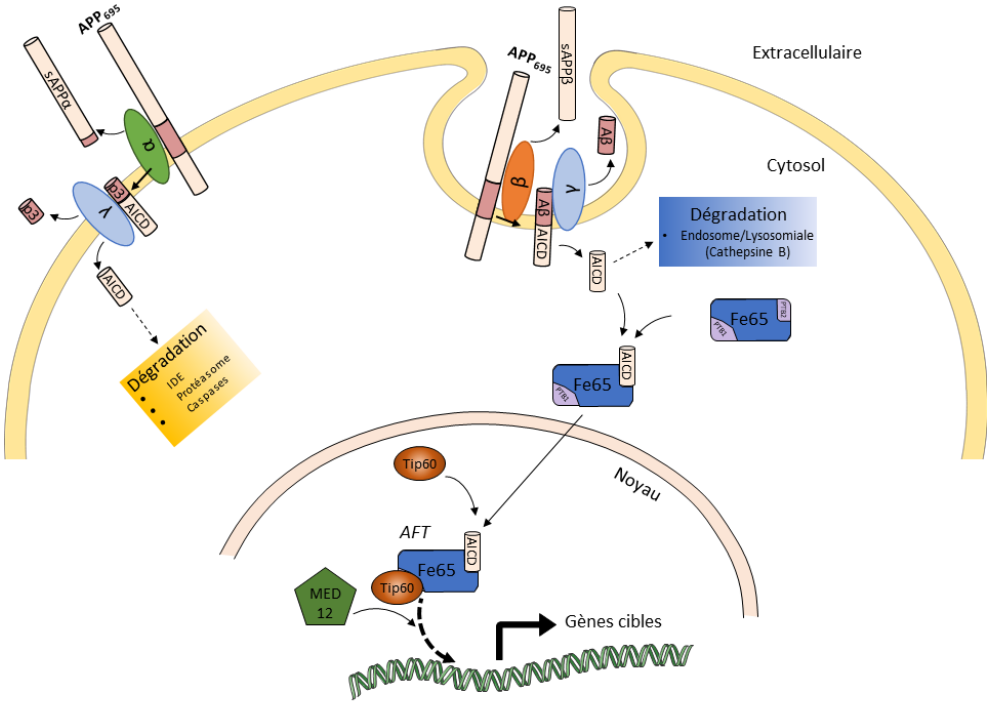


Figure 14 ***Modèle proposé de la régulation transcriptionnelle dépendante du domaine intracellulaire de l'APP (AICD)****. Les deux voies de catabolisme de l'APP (non-amyloïdogène et amyloïdogène) opèrent à des localisations subcellulaires différentes. La voie non-amyloïdogène est principalement active à la membrane plasmique alors que la voie amyloïdogène qui fait intervenir les clivages par la β- et γ-sécrétases est active dans les endosomes. L'AICD généré par la voie non-amyloïdogène est rapidement dégradé par le protéasome, l'IDE et les caspases. À contrario, celui produit par la voie amyloïdogène dans les endosomes peut être stabilisé par la fixation de Fe65 et est acheminé dans le noyau où Fe65 s'associe à Tip60 pour former le complexe AFT. Ce dernier interagit avec les promoteurs de gènes « cibles » pour réguler leur transcription. Adapté de (Grimm, Mett et al. 2013).*

Outre la formation du complexe AFT, l'AICD peut également s'associer à d'autres protéines adaptatrices et effectrices. On retiendra notamment le facteur de transcription TFCP2 qui interagit avec Fe65 et se lie à la région promotrice de gènes cibles de l'AICD (Zambrano, Minopoli et al. 1998, Kim, Kim et al. 2003). En revanche, JIP peut s'associer à l'AICD, migrer dans le noyau et s'associer à Tip60 formant le complexe AJT (**A**ICD/**J**IP/**T**ip60) activant la transcription de gènes indépendamment de Fe65 (Scheinfeld, Matsuda et al. 2003). Un élément supplémentaire a été récemment

découvert dans le mécanisme de la régulation transcriptionnelle dépendant de l'AICD. *Xu et al.* ont montré, *in vitro,* que la protéine MED12 (*Mediator complex subunit 12*) interagirait avec Fe65 uniquement lorsque le complexe AFT se trouve fixé au promoteur du gène afin de recruter la machinerie transcriptionnelle (Xu, Zhou et al. 2011).

Gènes cibles de l'AICD

Les régulations transcriptionnelles dépendantes de l'AICD seraient impliquées dans les mécanismes pathophysiologiques de la maladie d'Alzheimer pour plusieurs raisons. La première est que la voie amyloïdogène semble être la seule à pouvoir produire l'AICD transcriptionnellement « actif ». La voie amyloïdogène est fortement impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Fukumoto, Rosene et al. 2004, Holsinger, McLean et al. 2004) où une augmentation de son activité dans les cerveaux des patients augmenterait la production d'Aβ et de facto la production d'AICD. L'AICD est par exemple directement impliqué dans la régulation transcriptionnelle de la Néprilysine (NEP), connue pour dégrader le peptide Aβ (Pardossi-Piquard and Checler 2012, Grimm, Mett et al. 2013). La production d'AICD et dès lors de ses cibles peut être modifiée dans la maladie d'Alzheimer. En effet, les mutations de l'APP et des présénilines (PS1 et PS2) affectent différemment la production d'Aβ et d'AICD avec dans la majorité des cas une augmentation de la production d'Aβ42 et une diminution concomitante de la production d'AICD (Wiley, Hudson et al. 2005, Shen and Kelleher 2007). Finalement, des souris surexprimant l'AICD et Fe65 montrent une activation anormale de GSK3β, une hyperphosphorylation de la protéine Tau, de la neurodégénerescence ainsi qu'un déficit de mémoire de travail (Ryan and Pimplikar 2005, Ghosal, Vogt et al. 2009).

L'identification des gènes cibles de l'AICD constitue un nouveau champ d'opportunités thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer. Au cours des deux dernières décennies, plus de 20 gènes candidats ont été identifiés (voir tableau 1) grâce à une multitude d'approches expérimentales rendant l'analyse des données et la pertinence des résultats hautement controversées. Parmi ceux-ci, le gène suppresseur de métastases tumorales

KAI fut le premier découvert (Baek, Ohgi et al. 2002, von Rotz, Kohli et al. 2004). Une interaction directe du complexe AFT sur le promoteur du gène induit l'activation de la transcription. Ensuite, d'autres gènes tels que GSK3β ont été identifiés suggérant un lien étroit entre le métabolisme de l'APP et la phosphorylation de Tau dans la MA (Kim, Kim et al. 2003, von Rotz, Kohli et al. 2004, Ryan and Pimplikar 2005). L'APP et Tip60 sont également induits par l'AICD, ce qui induirait une boucle de rétrocontrôle positif (feed forward) séduisante pour expliquer la pathologie. La régulation du gène de la Néprilysine (NEP) par l'AICD reste probablement la mieux décrite dans le domaine. Sa régulation dépend de la fixation directe de l'AICD neuronal (dérivé de l'APP_{695} par la voie amyloïdogène) au promoteur du gène (pour revues voir Pardossi-Piquard and Checler 2012 et Grimm et al. 2013). La protéine NEP dégrade l'Aβ et dès lors constitue une cible thérapeutique intéressante puisque son expression tend à diminuer dans le cerveau des patients et pourrait expliquer un risque augmenté de développer la maladie d'Alzheimer. Il est donc intéressant de constater que l'AICD, produit par la voie amyloïdogène, peut induire l'expression de la NEP et augmenter la dégradation du peptide Aβ.

L'identité des cibles de l'AICD et leurs rôles dans la pathologie restent malgré tout sujet à controverse pour les raisons suivantes : (i) la pertinence de l'AICD en tant que régulateur transcriptionnel reste débattue, notamment sa capacité à s'associer directement à l'ADN pour contrôler la transcription de ses gènes cibles, (ii) la variété des modèles cellulaires utilisés dans les études, incluant des systèmes de surexpressions, des systèmes de gènes rapporteurs, (iii) la reproductibilité des données dans des modèles déficients en AICD (iv) le manque de données obtenues dans certains modèles *in vitro* comme les cultures primaires de neurones, *in vivo* chez le rongeur voire chez l'homme (Hebert, Serneels et al. 2006, Chen and Selkoe 2007, Waldron, Isbert et al. 2008, Aydin, Filippov et al. 2011).

Tableau 1 ***Gènes cibles potentiellement régulés par le domaine intracellulaire de l'APP (AICD)****. Le nom des gènes, le sens de la régulation induite par l'AICD, un résumé du modèle expérimental et la référence bibliographique associée sont représentés dans le tableau. Adapté de Pardossi-Piquard and Checler 2012, Grimm et al. 2013 et Müller et al. 2008.*

Gène	**Régulation (↓ ou ↑)**	**Modèle expérimental**	**Référence**
Retinoic acid-responsive genes	↓	Luciferase assay; CV1 cells ; AICD59/57 - GFP fused	(Gao and Pimplikar 2001)
KAI1/CD82	↑	Recruitment of AFT complex to KAI promoter in APP Tg mice; inducible AICD-Citrine overexpression in HEK293 cells	(Baek, Ohgi et al. 2002, von Rotz, Kohli et al. 2004)
Glycogensynthasekinase -3b (GSK3β)	↑	Inducible AICD-Citrine overexpression in HEK293 cells; FLAG-AICD31/57/59 transfection in PC12 cells and rat primary neurons; Stimulation of GSK3 beta activity without changes in mRNA and protein level in AICD-Tg mice	(Kim, Kim et al. 2003, von Rotz, Kohli et al. 2004, Ryan and Pimplikar 2005)
Amyloid precursor protein (APP)	↑	Inducible AICD-Citrine overexpression in HEK293 cells	(von Rotz, Kohli et al. 2004)
β-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1)	↑	Inducible AICD-Citrine overexpression in HEK293 cells	(von Rotz, Kohli et al. 2004)
Tip60	↑	Inducible AICD-Citrine overexpression in HEK293 cells	(von Rotz, Kohli et al. 2004)
Neprilysin (NEP)	↑	Cell lines (MEF PSsKO, BD8 PSsKO; MEF APPKO/APLP2KO; MEF NCTKO) + rescue experiments and inhibitors treatment ; PSsKO, APPKO; APP/APLP2 KO mouse brain; Electrophoretic mobility shift assay. SH-SY5Y-APP overexpressing, NB7 cells + inhibitor treatment.	(Pardossi-Piquard, Petit et al. 2005, Belyaev, Nalivaeva et al. 2009)
p53	↑	Cell lines (MEF PSsKO, BD8 PSsKO, HEK293, MEF APLP2KO and APP/APLP2KO) + rescue experiments with AICD50/59; Luciferase assay	(Alves da Costa, Sunyach et al. 2006)

Fibronectin1 (FN1); α2-Actin; Transgelin (TAGLN); Tropomyosin (TPM1); Flavoprotein oxidoreductase (MICAL2); Ras-associated protein (RAB3B); Insulin growth factor binding protein 3 (IGFBP3); Solute carrier family member 5 (SLC7A5)	↑	Microarray and qPCR validation in inducible AICD and AICD/Fe65 Tet21 cell line	(Muller, Concannon et al. 2007)
Epidermal growth factor receptor	↓	MEF PSsKO and APP/APLP2KO; PS1+/-PS2-/-, PScDKO and APP/APLP2KO mouse brain; ChIP assay; luciferase assay	(Zhang, Wang et al. 2007)
Lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1)	↓	Cell lines (MEF APP, APP/APLP2KO, PSsKO, U87, BHK570) + rescue experiments with AICD50/57/59; APP, APP/APLP2KO and PSsKO mouse brain; Luciferase assay; ChIP assay	(Liu, Zerbinatti et al. 2007)
Cyclin B1 and D1	↑	PC12 cells and primary rat cortical neurons overexpressing APPSwe or AICD	(Ahn, Joo et al. 2008)
Vesicular glutamate transporter 2 (VGLUT2)	↑	mESC glutamatergic derived neurons APP/APLP2 KO + rescue experiments with AICD and inhibitor treatment.	(Schrenk-Siemens, Perez-Alcala et al. 2008)
C/EBP homologous protein (CHOP)	↑	HEK293 overexpressing APP-FLAG, C83-FLAG or AICD-FLAG; SH-SY5Y siRNA>APP; ChIP assay	(Takahashi, Niidome et al. 2009)
Aquaporin 1 (AQP1)	↑	Cell line: MEF APPKO, PSsKO, rescued APP and APPdeltaC or PS2.	(Huysseune, Kienlen-Campard et al. 2009)
S100a9	↑	AICD-Tg mouse brain; BV2 microglia cells transfection of AICD50 and C99.	(Ha, Chang et al. 2010)
Clusterin (CLU)	↓	Inducible AICD and AICD/Fe65 SHEP neuroblastoma cell line	(Kogel, Concannon et al. 2012)

Patched homolog 1 (Ptch1)	↑	Ts65DN neurosphere (APP and AICD increased)	(Trazzi, Mitrugno et al. 2011)
Alkyl-dihydroxyacetone phosphate-synthase (AGPS)	↑	Cell lines: MEF PS1KO, PS2KO, APP/APLP2KO, APPdeltaC; APP-/-, APP+/-,APP+/-/APLP2-/- mouse brain.	(Grimm, Kuchenbecker et al. 2011)
Serine-palmitoyl transferase ong chain base subunit 2 (SPTLC2)	↓	Cell lines: MEF PSsKO, APP/APLP2KO, APPdeltaC + treatment with synthetic AICD (676K->695N); APP-/- mouse brain.	(Grimm, Grosgen et al. 2011)
Stathmin 1 (STMN1)	↓	Cell lines: AICD-EGFP/FE65/Tip60 overexpressing HEK293, APPs Knockdown (ShRNA) HEK293; Mass spectrometry.	(Muller, Schrotter et al. 2013)
Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α (PGC1α)	↑	Cell lines: MEF PSsKO, APP/APLP2KO, APPdeltaC + treatment with synthetic AICD (676K->695N); APP-/- , APPdelatC mouse brain.	(Robinson, Grosgen et al. 2014)
HES1	↑	Cell lines: AICD overexpressing HEK293 in HES1 luciferase reporter system	(Fischer, van Dijk et al. 2005)
Phosphatase and tensin homolog-induced kinase 1 (Pink1)	↑	Cell lines: HEK293/MEF APP-/-APLP1-/-APLP2-/- overexpressing NLS-AICD + inhibitor treatments; NLS-AICD overexpressing mouse brain (AAVs infected neonatal brain); AICD-Tg mouse brain; Luciferase reporter system	(Goiran, Duplan et al. 2018)
miR-663	↑	ChIP-seq for miR binding sites of AICD in SH-SY5Y-APP overexpressing; Increased miR-663 after AICD59 overexpression in hNSC;	(Shu, Wong et al. 2015)
Transthyretin (TTR)	↑	Cell lines: SH-SY5Y overexpressing APP695 + NH4Cl, Gleevec treatments; ChIP assay	(Kerridge, Belyaev et al. 2014)
Wasf1	↓	Cell lines: N2a cell line overexpressing APP, AICD50 + inhibitor treatments; Luciferase reporter system; ChIP APPsw/3xFLAG-AICD assay	(Ceglia, Reitz et al. 2015)

cMyc	↓	Cell lines: N2A overexpressing APP/AICD57, PC12, MEF NCTKO, HEK293; luciferase reporter system	(Zhou, Gong et al. 2012)

Objectifs

Les rôles de l'APP, hormis celui d'être le précurseur de l'Aβ, sont relativement vastes et semblent à l'heure actuelle encore mal compris. Une dérégulation de certaines de ses fonctions peut sans aucun doute contribuer à la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer voire déclencher des mécanismes pathologiques avant les effets toxiques du peptide amyloïde. Il est donc d'un intérêt capital de mieux comprendre ses rôles et fonctions afin d'identifier de nouvelles opportunités thérapeutiques pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Parmi ces fonctions, l'une d'entre elles nous a particulièrement intéressés dans le contexte de la physiologie neuronale.

La régulation transcriptionnelle dépendante de l'APP, plus précisément de son domaine intracellulaire (AICD), semble contrôler l'expression d'une vaste gamme de gènes associés directement à des mécanismes pathologiques de la maladie : le catabolisme de l'Aβ (NEP, TTR), l'apoptose cellulaire (p53) et la pathologie Tau (GSK3β). D'autres gènes sont associés à la physiologie neuronale : organisation du cytosquelette (α2-Actin), au cycle cellulaire (Cyclins), au métabolisme des lipides (LRP1, PGC1α),… Malgré la quantité importante des données publiées, la controverse règne en maître sur le sujet à cause d'un manque important de reproductibilité des données et surtout d'un manque de données issues de modèles plus pertinents compte tenu de la physiologie neuronale.

Ainsi, nous avons envisagé d'étudier les régulations transcriptionnelles dépendantes de l'AICD dans des cultures primaires de neurones par des approches permettant d'éviter au mieux les biais liés notamment à l'utilisation de systèmes de surexpression (d'APP ou d'AICD) dans des lignées cellulaires immortalisées. Les approches utilisées sont basées sur le séquençage à haut débit de la chromatine associée à l'AICD (ChIP@AICD-Seq) et sur l'analyse en parallèle du transcriptome de neurones APP-/-, afin d'identifer les gènes régulés directement et indirectement par l'association de l'AICD à l'ADN.

Dans un premier temps, nous avons essayé d'établir les conditions optimales de détection de l'AICD en vue d'immunoprécipiter la chromatine associée à

celui-ci. Nous avons évalué sa production mais également sa dégradation en utilisant une multitude d'inhibiteurs de ses voies connues de dégradations. De plus, l'expression plasmidique de différents fragments de l'APP (CTFα, CTFβ et AICD fusionné du côté C-terminal par le tag FLAG) a été utilisée. Les résultats obtenus (non publiés) qui sont discutés dans le **chapitre I,** nous ont indiqué que l'AICD n'est vraisemblablement pas un bon candidat pour l'approche de ChIP-Seq planifiée au préalable.

À la suite de cela, nous avons décidé d'analyser les régulations transcriptionnelles dépendantes de l'APP dans un modèle de cultures primaires de neurones au cours de leur maturation *in vitro* (neurones APP+/+ vs. APP-/-). Ces régulations peuvent dès lors être la cause directe d'une perte de régulation par l'APP (ou d'un de ses catabolites) ou découler d'un déficit fonctionnel induit par la perte de celui-ci. Nous avons identifié plusieurs gènes « cibles » de l'APP (mais pas de l'AICD) (*Npas4* et *Grik1*) étroitement associés à l'activité synaptique et au maintien de l'équilibre entre les afférences excitatrices et inhibitrices. La perte de l'APP semble induire une modification de cette homéostasie en faveur d'une augmentation des transmissions GABAergiques. Les données obtenues font l'œuvre d'une publication soumise et en révision dans le journal *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Opsomer et al.) et seront discutées dans le **chapitre II**.

En relation étroite avec les résultats du chapitre II, le rôle de l'APP a été investigué dans la régulation des transmissions GABAergiques dans des modèles de neurones déficients (neurones APP-/-) et surexprimant l'APP humain. L'APP, par le contrôle de l'expression du transporteur chlorure KCC2, régule le shift « GABA » rendant les transmissions GABAergiques déficientes. Les données ont fait l'objet d'une publication (Doshina, Gourgue et al. 2017) et seront discutées dans le **chapitre III** avec un intérêt porté sur ma contribution scientifique.

Résultats

Chapitre I

Analyse de la région extracellulaire du CTFβ impliquée dans la régulation du clivage γ-sécrétase et la production d'Aβ et d'AICD

L'AICD peut virtuellement être produit par les deux voies non- et amyloïdogènes. Toutefois, certaines données indiquent que l'AICD transcriptionnellement « actif » est produit essentiellement par la voie amyloïdogène, la même donc qui produit l'Aβ. Une question importante, et à l'heure actuelle sans réponse, est quels sont les mécanismes qui régulent le clivage opéré par la γ-sécrétase sur les fragments CTFs. Ces derniers constituent par extension les précurseurs de l'Aβ mais aussi de l'AICD. La régulation de ces clivages peut passer par la dimérisation en orientation *cis* des CTFs. Structurellement, les CTFα et les CTFβ contiennent trois motifs GXXXG, décrits précédemment, qui stabilisent la formation des dimères de C99 et qui, lorsqu'ils sont mutés sur les Gly, affectent préférentiellement la production d'Aβ sans modifier celle de l'AICD (Kienlen-Campard, Tasiaux et al. 2008).

Outre les motifs GXXXG, il a été suggéré que le motif ^{613}LVFFA^{617} faisait partie d'un motif inhibiteur qui module l'activité γ-sécrétase (Tian, Bassit et al. 2010). Les travaux du laboratoire en collaboration avec Steven O. Smith et ses collègues, ont permis de caractériser la structure tertiaire du domaine extracellulaire du C99 et d'identifier une structure en feuillet β formée par les motifs ^{613}LVFF^{616}. La mutation autosomale dominante A^{617}G (dite mutation *Flemish*) perturbe cette conformation et entraine une augmentation de la production d'Aβ (Tang, Hu et al. 2014).

L'article présenté ci-dessous est né de la collaboration de notre laboratoire avec Steven O. Smith et ses collègues. Il analyse en détail les éléments formant la structure en feuillet β précédemment identifiée (Tang, Hu et al. 2014) et l'impact de mutations séquentielles du domaine extracellulaire sur cette structure et sur le métabolisme du C99 dans la production d'Aβ et d'AICD.

β-sheet structure within extracellular domain of C99 regulates amyloidogenic processing

Yi Hu[1], Pascal Kienlen-Campard[2], Tzu-Chun Tang[1], Florian Perrin[2,3], **Rémi Opsomer[2]**, Marie Decock[2], Xiaoshu Pan[1], Jean-Noël Octave[2], Stefan N. Constantinescu[3] and Steven O. Smith[1].

[1]Department of Biochemistry and Cell biology, Stony Brook University, Stony Brook, NY 11794 USA
[2]Institute of Neuroscience, Université catholique de Louvain, Brussels, 1200 Belgium
[3]Ludwig Institute for Cancer Research and de Duve Institute, Université catholique de Louvain, Brussels, 1200 Belgium
Correspondance to : Stefan N. Constantinescu (stefan.constantinescu@bru.licr.org) and Steven O. Smith (steven.o.smith@stonybrook.edu).

Abstract :

Familial mutations in C99 can increase the total level of the soluble Aβ peptides produced by proteolysis, as well as the Aβ42/Aβ40 ratio, both of which are linked to the progression of Alzheimer's disease. We show that the extracellular sequence of C99 forms β-sheet structure upon interaction with membrane bilayers. Mutations that disrupt this structure result in a significant increase in Aβ production and, in specific cases, result in an increase in the amount of Aβ42 relative to Aβ40. Fourier transform infrared and solid-state NMR spectroscopic studies reveal a central β-hairpin within the extracellular sequence comprising Y10-E11-V12 and L17-V18-F19 connected by a loop involving H13-H14-Q15. These results suggest how familial mutations in the extracellular sequence influence C99 processing and provide a structural basis for the development of small molecule modulators that would reduce Aβ production.

Cette publication met en exergue la formation d'une structure en feuillet β antiparallèle extracellulaire par les motifs YEV et LVFF du C99. Le motif HHQK lie vraisemblablement ces motifs au moyen d'une boucle dans la structure β, pour former *in fine* une structure en épingle. Au sein de cette structure, les motifs LVFF et YEV interagissent et s'insèrent dans la membrane plasmique. Des mutations séquentielles de ces résidus extracellulaires en alanine montrent que les mutations (LVFF/AAAA et YEV/AAA) perturbent la structure en feuillet β et induisent en conséquence une augmentation de la production de l'Aβ sécrété.

Dans le cadre de cette collaboration, ma contribution a été d'évaluer, par Western blotting, la production des fragments C-terminaux (CTFα et CTFβ) dans les cellules CHO transfectées avec les constructions plasmidiques exprimant le C99 et les différents mutants pour les motifs LVFF, YEV et HHQK. Ensuite, grâce au système du gène rapporteur luciférase, j'ai évalué la production d'AICD à partir de ces constructions. Le système rapporteur utilisé se base sur la capacité de l'AICD à fixer Fe65 et Tip60 (complexe AFT) afin d'aller activer la transcription d'un gène rapporteur situé sur un plasmide d'expression. Il a d'ailleurs été largement utilisé afin d'identifier les gènes « cibles » de l'AICD décrits dans l'introduction. Le gène rapporteur est utilisé sous le contrôle d'un promoteur qui porte un élément de réponse au domaine de liaison à l'ADN de la protéine GAL4 (GAL-RE). Dans les cellules CHO, les plasmides codant le C99 (ou les différents mutants), Fe65, Tip60 fusionné avec le domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (Tip60-GAL4) et le plasmide rapporteur (GAL4-RE-luciférase) sont co-transfectés. Ainsi, après le clivage du C99 par la γ-sécrétase, l'AICD libéré peut s'associer à Fe65 et Tip60. À partir du moment où Tip60 contient le domaine GAL4, le complexe AFT formé va activer la transcription de la luciférase sur le plasmide rapporteur (Chap. I Figure 1). Dans ce test, la luciferase produit un signal lumineux qui est directement proportionnelle à la production et à la libération de l'AICD.

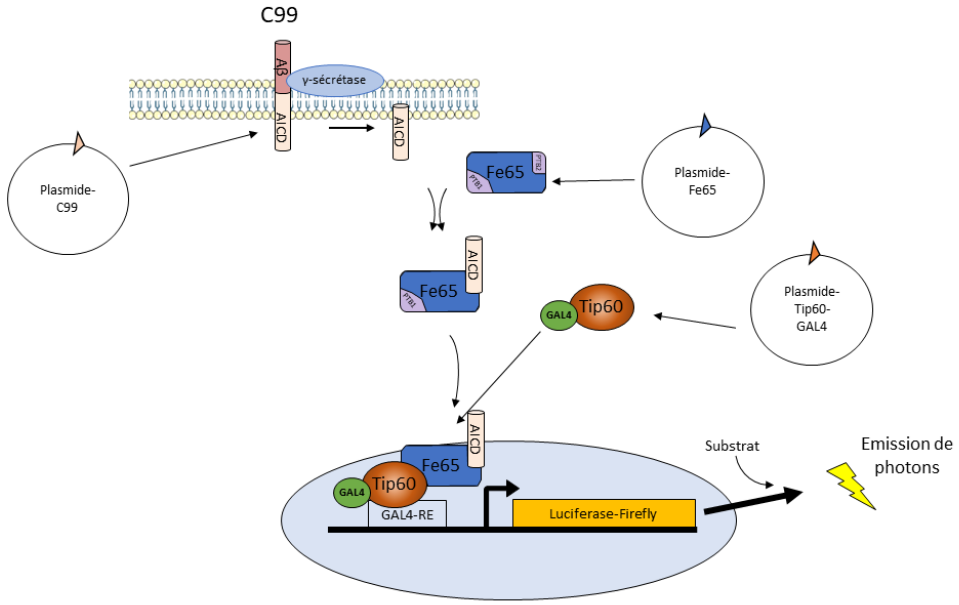


Figure 1 ***Mesure de la libération de l'AICD par un système de gène rapporteur****. Des plasmides codant le C99, Fe65 et Tip60-GAL4 sont co-transfectés dans les cellules avec un plasmide rapporteur GAL4-RE-luciférase. Après le clivage du C99, l'AICD produit peut s'associer à Fe65 et ensuite à Tip60 pour activer la transcription du gène de la luciférase. Plus précisément, Tip60 est fusionné au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 (Tip60-GAL4) et permet d'activer la transcription grâce à l'élément de réponse à GAL4 (GAL4-RE) se trouvant dans le promoteur du plasmide rapporteur. La quantité de lumière issue de la conversion de la luciférine par la luciférase est directement proportionnelle à la libération d'AICD.*

L'expression de ces constructions dans les cellules CHO est bien détectable par Western blotting (Chap. I Figure 2) et l'inhibition de la γ-sécrétase, par le traitement au DAPT, induit une augmentation des CTFs (principalement CTFα) (Chap. I Figure 2-A). L'activité luciférase augmente lorsque le plasmide du C99 est co-transfecté avec les plasmides Fe65, Tip60 et le plasmide rapporteur luciférase comparé au plasmide vide (CT). De plus, l'activité luciférase diminue lorsque la γ-sécrétase est inhibée par le DAPT, indiquant que l'activité luciférase est bien dépendante de la libération de l'AICD (Chap. I Figure 2-A). La mutation des motifs LVFF en Alanine (C99LVFF/AAAA) augmente l'activité luciférase comparée au C99 (Chap. I Figure 2-A).

Néanmoins, le niveau d'expression de chacune des constructions peut influencer l'activité luciférase. Ainsi, la correction de l'activité luciférase par le niveau d'expression des constructions C99 (Chap. I Figure 2-B) montre que l'activité luciférase est considérablement augmentée lorsque les motifs LVFF et HHQK sont mutés en Alanines (tendance non significative pour le YEV/AAA). Ces données corroborent donc les données obtenues sur la production d'Aβ.

En conclusion, la déstabilisation de la structure β du domaine extracellulaire du C99 par la mutation des motifs LVFF, YEV et HHQK affecte également la production de l'AICD à l'image de la production de l'Aβ. Globalement, la structure secondaire en feuillet β adoptée par le C99 et son insertion dans la membrane plasmique joue un rôle inhibiteur sur le clivage γ-sécrétase pour la production de l'Aβ et de l'AICD.

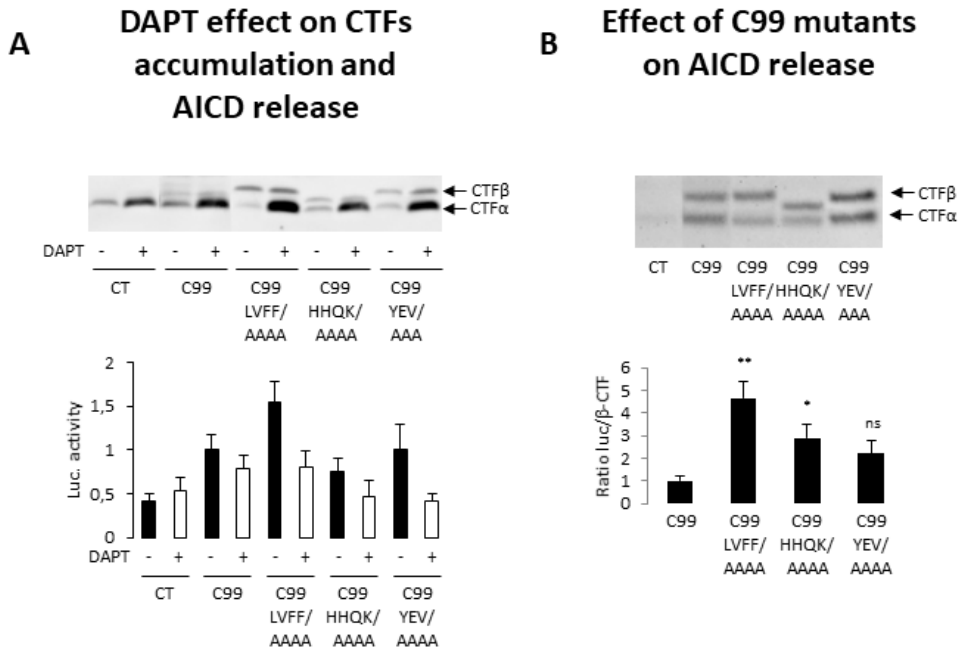


Figure 2 ***Effet des mutations des motifs LVFF, HHQK et YEV sur la production d'AICD dans un système de gènes rapporteurs. A****) Partie supérieure, Western blotting (anticorps anti-APP-C-ter) représentatif de l'expression des CTFs endogènes et des C99, C99LVFF/AAAA, C99HHQK/AAAA et C99YEV/AAA dans les cellules CHO 48h après la transfection. Les CHO ont été traitées avec un inhibiteur de γ-sécrétase (DAPT). L'accumulation des CTFs*

endogènes est visible dans chaque condition validant l'inhibition de la γ-sécrétase. Partie inférieure, les CHO sont transfectées avec les constructions CT (vecteur vide), C99LVFF/AAAA, C99HHQK/AAAA et C99YEV/AAA conjointement avec les plasmides Fe65, Tip60-GAL4, plasmides rapporteurs GAL4RE. Les cellules sont également traitées par le DAPT et l'activité luciférase est mesurée 48h après la transfection et corrigée sur l'activité du plasmide rapporteur Renilla. ***B****) Partie supérieure, Western blotting (anticorps anti-APP-c-terminal) représentatif de l'expression des CTFs endogènes et des C99, C99LVFF/AAAA, C99HHQK/AAAA et C99YEV/AAA dans les cellules CHO 48h après la transfection. Partie inférieure, les cellules CHO sont transfectées avec les constructions CT (vecteur vide), C99LVFF/AAAA, C99HHQK/AAAA et C99YEV/AAA conjointement avec les plasmides Fe65, Tip60-GAL4, plasmides rapporteurs GAL4RE. L'activité luciférase est mesurée 48h après la transfection. Les cellules sont également co-transfectées avec un plasmide codant un autre gène rapporteur (Renilla) afin de normaliser par rapport à l'efficacité de transfection. Les résultats luciférase sont donc un ratio des signaux luciférases sur les signaux Renilla.*

Optimisation de la détection de l'AICD par l'analyse de sa production et de sa dégradation

Pour identifier si l'expression de certains gènes est contrôlée par la fixation de l'AICD sur l'ADN, nous avons envisagé d'utiliser l'immunoprécipitation de la chromatine liée à l'AICD, suivi du NGS. Cette méthodologie (ChIP-seq) est extrêmement utile pour identifier les séquences génomiques fixées par les facteurs de transcription sans sélectionner au préalable des gènes « cibles ». Cette technique a malgré tout des limites telles que la quantité de matériel (cellules) à investir, la qualité des anticorps utilisés (spécificité et sensibilité) et évidemment la quantité de protéines cibles qui fixent l'ADN à immunoprécipiter. Dans ce contexte, nous avons essayé d'optimiser des conditions expérimentales nous permettant de détecter l'AICD en condition basale et d'envisager son immunoprécipitation. L'AICD est connu pour sa durée de vie très faible de l'ordre de 5 minutes lorsqu'il est surexprimé sous sa forme AICD59 dans les cellules BHK (Cupers, Orlans et al. 2001). Nous avons essayé de détecter l'AICD dans des cellules CHO (littéralement, Chinese Hamster Ovary) contrôles (CT) ou surexprimant de manière stable l'APP_{695} humain ($hAPP_{695}$) (Chap. I Figure 3-A). En condition basale, le lysat cellulaire total a été évalué par Western blotting en utilisant un anticorps dirigé contre les 17 derniers acides aminés de l'APP(C-ter-C17) (Sergeant, David et al. 2002). Il reconnait donc l'APP complet ainsi que les fragments CTFα, CTFβ et AICD. Dans les cellules CHO, l'APP est reconnu dans les deux conditions et voit son signal augmenté dans les cellules CHO hAPP695 (Chap.

I Figure 3-A). En effet, l'expression de l'APP_{695} humain transgénique s'ajoute à l'APP endogène dans ces cellules. Dans les CHO contrôles, les CTFs sont difficilement détectables contrairement au CHO $hAPP_{695}$. Malgré tout, l'AICD dont la taille attendue est de 5-6kDa, n'est pas détectable. Inhiber l'activité de l'*Insuline Degrading Enzyme* (IDE) ou du protéasome a permis d'induire l'accumulation de l'AICD dans différentes études (Edbauer, Willem et al. 2002, Nunan, Williamson et al. 2003, Gersbacher, Goodger et al. 2013). Nous avons donc traité les CHO contrôles et $hAPP_{695}$ pendant 16h avec 100µM d'ortho-phénantroline (*o*-PNT), 20µM de MG132 et 1µM de DAPT chacun étant des inhibiteurs respectifs de l'IDE, du protéasome et du complexe γ-sécrétase (Chap. I Figure 3-B). Nous n'avons pas pu observer d'accumulation de l'AICD en inhibant l'IDE ou le protéasome dans les CHO, qu'elles surexpriment ou non l'APP_{695} humain. Neutraliser l'activité du protéasome (MG132) induit l'accumulation des CTFs dans les deux types cellulaires, ce qui indique que celui-ci est impliqué dans leur catabolisme. Finalement, l'inhibition de la γ-sécrétase (DAPT) induit comme attendu l'accumulation de ses substrats, les CTFs (Chap. I Figure 3-B).

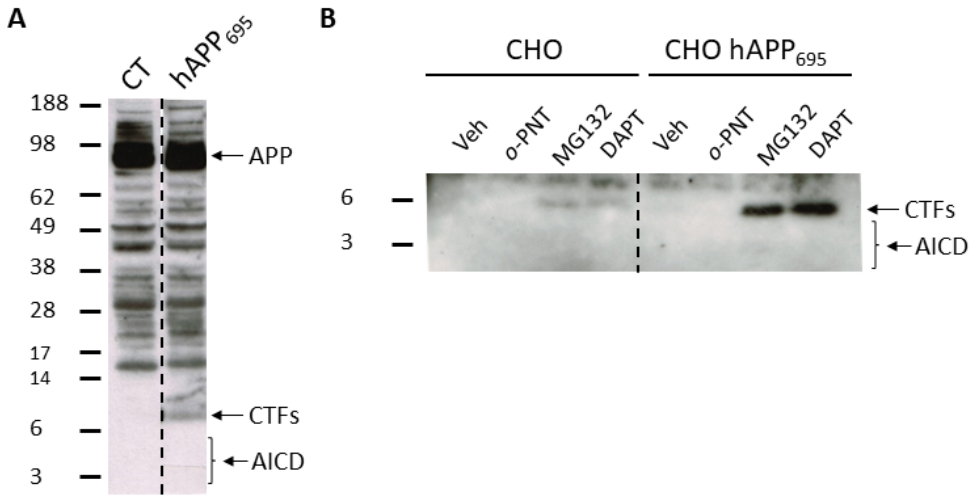


Figure 3 ***Détection de l'APP et des fragments C-terminaux dans les cellules CHO****.* ***A****) L'expression de l'APP et des CTFs dans un lysat cellulaire total de CHO contrôles (CT) et surexprimant l'APP_{695} humain (hAPP695) est analysée par Western blotting à l'aide de l'anticorps anti-APP, C-ter-C17.* ***B****) L'expression des CTFs dans un lysat cellulaire total de CHO*

contrôles (CT) et surexprimant l'APP_{695} humain (hAPP695) est analysée par Western blotting à l'aide de l'anticorps anti-APP C-ter-C17. Les cellules ont été traitées pendant 16h avec le DMSO (Veh), 100µM d'orthophénantroline (o-PNT), 20µM de MG132 ou 1µM de DAPT. La présence de l'APP et des CTFs est indiquée par des flèches. La taille attendue de l'AICD est indiquée par une accolade.

Diverses lignées cellulaires ont également été utilisées (HEK293, MEF) ainsi que l'utilisation d'autre molécule comme le CA074-Me, inhibant la cathepsine B décrite pour dégrader l'AICD (données non montrées) (Asai, Yagishita et al. 2011). Ces résultats ne nous ont pas permis de détecter l'AICD.

Dès lors, nous nous sommes tournés vers une approche d'expression transitoire des fragments CTFs (C99, C83) taggés du côté C-terminal avec la séquence DYKDDDDK (FLAG) afin de court-circuiter les clivages α et β sécrétases et d'augmenter la production de l'AICD-FLAG par le clivage γ-sécrétase. Le tag FLAG a de précieux avantages comme sa petite taille (8 acides aminés), son caractère hydrophile et surtout l'existence d'anticorps anti-FLAG validés pour les techniques de ChIP. Les C99- et C83-FLAG sont traduits et exprimés à la membrane plasmique grâce à la présence du peptide signal de l'APP cloné en amont des cadres ouverts de lecture (Chap. I Figure 4-A). Nous avons également cloné l'AICD-FLAG afin qu'il soit exprimé directement dans le cytosol (Chap. I Figure 4-A). La transfection de ces trois constructions dans les cellules HEK293 mène à l'expression et à la détection du C83- et C99-FLAG uniquement (Chap. I Figure 4 A, B et C). L'AICD-FLAG n'est détectable ni avec l'anticorps anti-FLAG ni avec l'anti-APP, Cter-C17 (Chap. I Figure 4 B et C). En outre, l'expression du C99-FLAG est moindre par rapport à celle du C83-FLAG. L'inhibition de la γ-sécrétase induit l'accumulation du C83-FLAG uniquement lorsqu'il est produit à partir du C99-FLAG. Ce clivage implique vraisemblablement l'α-sécrétase (Jager, Leuchtenberger et al. 2009). L'inhibition de l'IDE (o-PNT) ne permet pas d'accumuler l'AICD-FLAG exogène ou celui potentiellement produit à partir des constructions C83- et C99-FLAG (Chap. I Figure 4-B).

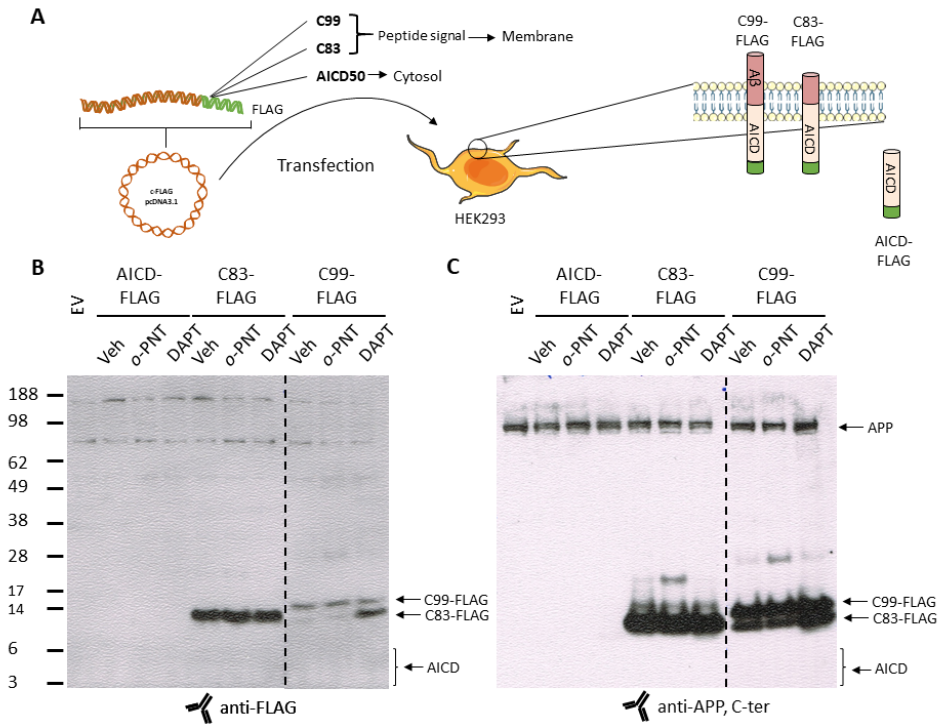


Figure 4 ***Expression des CTFs taggés FLAG dans les cellules HEK293****. **A**) Représentation schématique du clonage du C99, C83 et de l'AICD dans le plasmide d'expression cFLAG pcDNA3.1. Le peptide signal de l'APP est cloné dans les constructions C99 et C83 afin d'insérer les constructions traduites dans la membrane plasmique. L'AICD-FLAG est traduit directement dans le cytosol.* ***B***) *et* ***C***) *Analyse de l'expression des CTFs-FLAG dans un lysat total de cellules HEK293 par Western blotting à l'aide d'un anticorps anti-FLAG (B) ou anti-APP, C-ter C17 (C). Les HEK293 sont transfectées avec le plasmide vide (EV), l'AICD-FLAG, le C83-FLAG et le C99-FLAG. Les cellules sont traitées pendant 16h avec le DMSO (Veh), 100µM d'orthophénantroline (o-PNT) ou 1µM de DAPT. La présence de l'APP et des CTFs-FLAG est indiquée par des flèches. La taille attendue de l'AICD est indiquée par une accolade.*

Des agents alcalinisants tels que le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) et la chloroquine neutralisent l'acidification des endosomes et des lysosomes (de Duve, de Barsy et al. 1974, Gekle, Mildenberger et al. 1995) et permettent d'empêcher la dégradation de l'AICD dans des modèles de lignées cellulaires immortalisées (Vingtdeux, Hamdane et al. 2007). Nous avons donc traité les HEK293 transfectées avec les constructions CTFs-FLAG avec 10mM de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) dans le but d'optimiser la détection de l'AICD. Nous avons observé une accumulation importante des C83 endogènes et

dans une moindre mesure des C83- et C99-FLAG lorsque la voie endoso/lysosomale est inhibée (Chap. I Figure 5-A). De plus, une bande correspondant à l'AICD s'accumule en présence de NH_4Cl dans toutes les conditions de transfection, vecteur vide (EV) compris (Chap. I Figure 5-B). Ceci suggère que l'AICD que nous détectons dérive du clivage de l'APP endogène. Notons que l'anticorps anti-FLAG ne détecte pas de bande en-dessous de 6kDa (Chap. I Figure 5-C). La bande susmentionnée correspond donc vraisemblablement à de l'AICD, puisqu'inhiber le clivage γ-sécrétase avec le DAPT empêche sa production (Chap. I Figure 5).

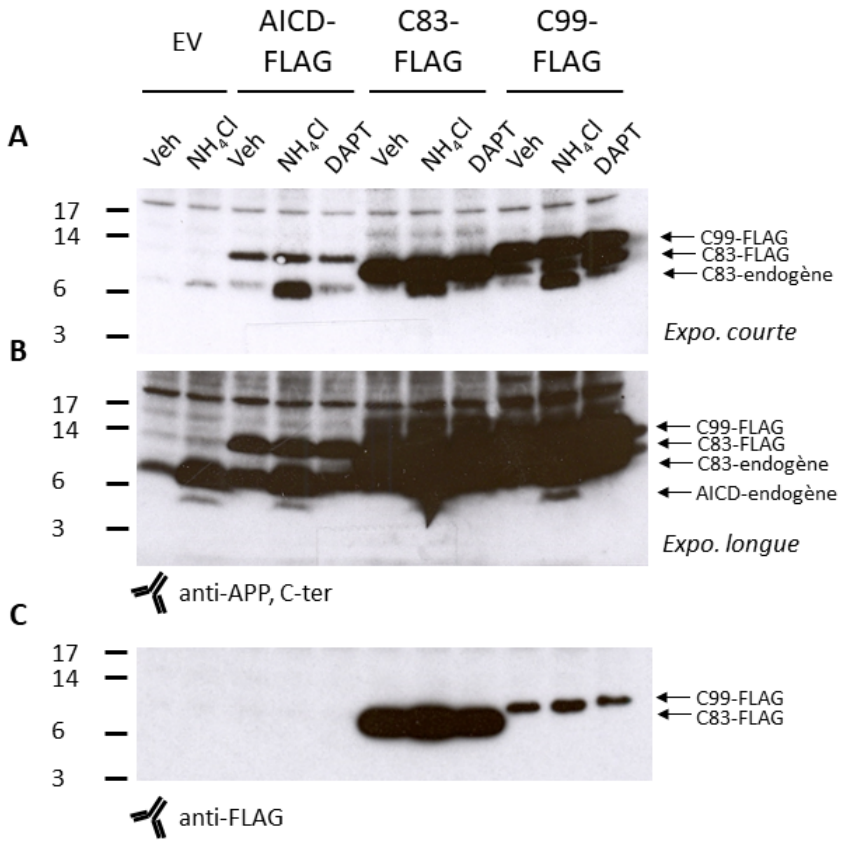


Figure 5 ***L'inhibition de la voie endoso/lysosomale par le NH_4Cl induit l'accumulation de l'AICD endogène****. **A**) Analyse de l'expression des CTFs-FLAG dans un lysat total de cellules HEK293 par Western blotting à l'aide d'un anticorps anti-APP, C-ter-C17 (**A**, exposition courte et **B**, exposition longue) ou anti-FLAG (**C**). Les HEK293 sont transfectées avec le plasmide vide (EV), l'AICD-FLAG, le C83-FLAG et le C99-FLAG. Les cellules sont traitées*

pendant 16h avec le DMSO (Veh), 10mM NH_4Cl et 1µM de DAPT. La présence du C99-FLAG, du C83-FLAG, du C83 endogène et de l'AICD endogène est indiquée par des flèches.

Ces données semblent indiquer que l'AICD produit dérive principalement du métabolisme de l'APP. Le fait d'inhiber la voie endoso/lysosomale avec le chlorure d'ammonium suggère que la dégradation de l'AICD opère dans ces compartiments. Toutefois, *Vingtdeux et al*. proposent que l'AICD détecté dans des conditions similaires peut en partie dériver d'un clivage de la γ-sécrétase sur le C83 qui s'accumule suite à une inactivation de la β-sécrétase dans les compartiments endocytaires (Vingtdeux, Hamdane et al. 2007).

Étant donné que nous avons envisagé d'utiliser un modèle de cultures primaires de neurones pour les expériences de ChIP-seq et d'analyse du transcriptome, nous avons tenté de détecter l'AICD dans ce modèle. Les cultures primaires de neurones ont été préparées à partir de cortex embryonnaire de souris *wild-type* (APP+/+), hétérozygotes (APP+/-) et homozygotes (APP-/-) pour l'invalidation génétique de l'APP. Après 7 jours de culture *in vitro*, l'expression de l'APP est analysée par Western blotting avec un anticorps anti-APP, C-ter-C17 (Chap. I Figure 6). Des neurones ont également été traités pendant 16h avec 10mM de chlorure d'ammonium (NH_4Cl) pour évaluer l'importance de la voie endoso/lysosomale dans la dégradation de l'AICD. Nous avons observé que l'expression de l'APP est diminuée dans les neurones APP+/- comparés aux neurones APP+/+ et complètement abolie dans les neurones APP-/-. Seuls les neurones APP+/+ montrent une quantité à peine détectable d'AICD en condition basale. L'inhibition induite par le NH_4Cl permet d'augmenter considérablement la détection de l'AICD dans les neurones APP+/+ et APP+/- (Chap. I Figure 6). Ceci suggère que la dégradation de l'AICD dans les neurones implique également la voie endoso/lysosomale.

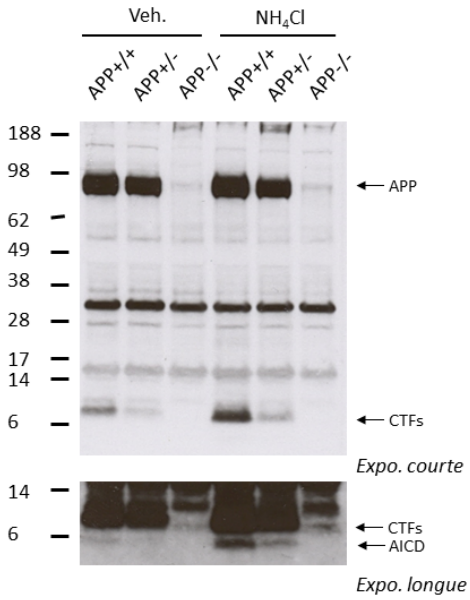


Figure 6 ***Détection de l'AICD dans les neurones corticaux en culture****. L'expression de l'APP et des CTFs dans un lysat cellulaire total de neurones après 7 jours de culture in vitro est analysée par Western blotting à l'aide d'un anticorps anti-APP, C-ter-C17. Les neurones dérivent de cortex embryonnaire E18 de souris wild-type (APP+/+), hétérozygotes (APP+/-) et homozygotes (APP-/-) pour l'invalidation génétique de l'APP. Les neurones sont traités pendant 16h avec de l'H_2O (Veh) ou 10mM NH_4Cl. Une exposition courte (panneau supérieur) et une exposition longue (panneau inférieur) sont représentées. La présence de l'APP, des CTFs et de l'AICD est indiquée par des flèches.*

Pour conclure, la détection de l'AICD en condition basale dans les lignées cellulaires immortalisées (CHO, HEK293) ainsi que dans les neurones primaires est très faible. Les inhibiteurs de l'IDE, du protéasome et des cathepsines B ne nous ont pas permis d'augmenter la détectabilité de l'AICD dans nos modèles (CHO, HEK293). Cependant, inhiber l'acidification des compartiments endocytaires et des lysosomes induit l'accumulation de l'AICD vraisemblablement par la réduction de sa dégradation. Finalement, l'AICD serait produit à partir de l'APP complet et non de fragments CTFs exogènes transfectés. Ces résultats nous indiquent qu'il serait difficile d'utiliser l'AICD comme cible en vue d'une immunoprécipitation de chromatine, compte tenu principalement de sa faible détectabilité et de son aspect très labile dans nos modèles cellulaires.

Par ailleurs, l'accumulation de l'AICD observé à la neutralisation de compartiments cellulaires acides (endosomes, lysosomes) ajoutent une question supplémentaire : comment un peptide s'accumulant dans des compartiments endosomaux ou lysosomaux exercerait-il des régulations transcriptionnelles ?

Chapitre II

Analyse des régulations transcriptionnelles dépendantes de l'APP et leurs implications dans le contrôle de la balance excitatrice/inhibitrice.

Après avoir abandonné les expériences de ChIP-seq envisagées à l'origine du projet à la suite des obstacles rencontrés et discutés dans le chapitre I, nous avons étudié l'implication de l'APP dans la régulation transcriptionnelle de gènes à l'aide d'une approche d'analyse du transcriptome. La fonction de régulateur transcriptionnel est principalement associée au domaine intracellulaire de l'APP (AICD) mais la controverse règne quant à l'identité des gènes cibles et la pertinence des modèles utilisés.

Dans cette étude, nous avons utilisé les cultures primaires de neurones dérivés du cortex embryonnaire (E18) de souris APP+/+ et APP-/-. L'analyse de l'expression différentielle des gènes en absence d'APP a été réalisée par la technologie de microarray® (gènes codants et non-codants) au cours de la différenciation/maturation neuronale. Les analyses du transcriptome ont été réalisées sur du cortex embryonnaire directement prélevé et sur des cultures primaires de neurones cultivés pendant 3 ou 7 jours. Ces conditions ont été choisies au vu des données montrant que la production du peptide AICD et sa localisation nucléaire étaient régulées temporellement dans les cultures primaires de neurones corticaux (Kimberly, Zheng et al. 2005). *In vitro,* l'AICD est détectable à partir du 6ème jour et se retrouve dans les fractions nucléaires jusqu'au 8ème jour de culture. Nos conditions de culture in vitro (3 et 7 jours) permettent donc virtuellement de séparer les régulations potentiellement dépendantes de l'AICD (3 vs. 7 jours).

Les résultats obtenus ont montré que l'absence de l'APP induisait de subtils changements dans l'expression génique globale. De plus, les gènes précédemment décrits comme « cibles » de l'AICD ne sont pas altérés dans nos conditions. Malgré tout, le gène *Npas4* dépendant de l'activité

neuronale et la sous-unité *Grik1* du récepteur ionotropique au glutamate sont réprimés dans les neurones déficients en APP (neurones APP-/- et Knock-Down CRISPR-Cas9>APP) après 7 jours de culture. Nos résultats montrent également que l'expression de *Npas4* n'est pas dépendante de la libération de l'AICD mais qu'elle est plutôt induite par le fragment sAPPα. Sa diminution d'expression contribuerait, par la modification de l'équilibre excitation/inhibition, au phénotype observé dans les neurones APP-/-. À savoir, l'expression de la glutamate décarboxylase 65 (GAD65) et la production du neurotransmetteur GABA augmentent en absence d'APP et lorsque *Npas4* est invalidé (CRISPR-Cas9>Npas4). Finalement, l'absence d'APP modifie subtilement mais significativement l'activité glutamatergique des neurones, particulièrement au niveau de l'expression de *Grik1* et de la réponse calcique mesurée après une stimulation au kaïnate.

En conclusion, la déficience en APP dans les neurones, répercutée par l'expression diminuée de *Npas4*, modifie probablement les afférences excitatrices et inhibitrices des neurones avec respectivement une diminution de la réponse glutamatergique (*Grik1*, kaïnate) et une augmentation des marqueurs GABAergiques (GABA et GAD65).

Ces données font l'objet d'une publication soumise dans le journal *Frontiers in Molecular Neuroscience* (03/05/18) et sont en cours de révision (Opsomer et al.)

Amyloid Precursor Protein (APP) controls excitatory/inhibitory synaptic inputs by regulating the transcriptional activator Neuronal PAS Domain Protein 4 (NPAS4)

Rémi Opsomer[1], Sabrina Contino[1†], Florian Perrin[12†], Bernadette Tasiaux[1], Pierre Doyen[3], Maxime Vergouts[3], Céline Vrancx[1], Anna Doshina[1], Nathalie Pierrot[1], Jean-Noël Octave[1], Serena Stanga[1], Pascal Kienlen-Campard[1*].

[1] CEMO-Alzheimer Dementia group, Institute of Neuroscience, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium.
[2] de Duve Institute, Ludwig Institute for Cancer Research and Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium.
[3] CEMO-Laboratory of Neuropharmacology, Institute of Neuroscience, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium.
[†]These authors have contributed equally to this work.

*Correspondence:

Pascal Kienlen-Campard
Institute of Neuroscience
IONS-CEMO, Avenue Mounier 53 bte B1.53.02
B-1200 Brussels
Belgium
Phone: +32 2 764 93 35
Fax : +32 2 764 54 60
Email : pascal.kienlen-campard@uclouvain.be

Running title

APP-dependent NPAS4 expression and GABA production.

Keywords

Alzheimer's disease; APP family proteins; Neuronal differentiation; Transcriptome analysis; NPAS4; CRISPR-Cas9; Inhibitory neurotransmission.

Abstract

Sequential proteolysis of the amyloid precursor protein (APP) and amyloid-β peptide (Aβ) release is an upstream event in Alzheimer's disease (AD) pathogenesis. Still, the function of APP in neuronal physiology is poorly understood. Along with its paralog APP-like Proteins 1 and 2 (APLP1-2), APP is involved in neurite formation and synaptic function by mechanisms that are not elucidated. APP is a single-pass transmembrane protein expressed at high levels in the brain that resembles a cell adhesion molecule or a membrane receptor, suggesting that its function relies on cell interaction processes and/or activation of intracellular pathways of signal transduction. Along this line, APP intracellular domain (AICD) was reported to act as a transcriptional factor for target gene activation that mediates APP physiological functions. Here, we used an unbiased transcriptome-based approach to identify the genes transcriptionally regulated by APP in embryonic cortex and upon maturation of primary cortical neurons. The transcriptome analysis did not detect any significant differences of expression of previously proposed AICD target genes. The overall transcriptional changes were subtle, but we found that genes clustered in neuronal-activity dependent pathways are dysregulated in the absence of APP. Among these genes, we found the activity-dependent Neuronal PAS domain protein 4 (*Npas4*) Immediate Early Gene to be downregulated in absence of APP. Down-regulation of NPAS4 in APP knock-out (KO) neurons is not related to AICD but to the APP ectodomain. In APP KO neurons, we observed an increased production of the inhibitory neurotransmitter GABA, and reduced GABA(A) receptors alpha1 subunit expression, suggesting an impaired GABAergic neurotransmission in the absence of APP. These observations were recapitulated in *Npas4*-deficient neurons. Furthermore, calcium responses to glutamate receptor agonists were lowered in the absence of APP. We observed in particular a decreased glutamate activity mediated by kainate receptors (KARs) in line with decreased expression of the *Grik1* ionotropic KARs subunit. Altogether, our results point out a new role for APP in the regulation of excitatory/inhibitory neurotransmission through the regulation of the activity-dependent *Npas4* gene.

Introduction

The Amyloid Precursor Protein (APP) has been extensively studied as the precursor of the amyloid-β peptide (Aβ), the major component of the senile plaques which are a typical hallmark of Alzheimer's disease (AD). Still, the physiological functions of APP per se have been largely overlooked and remain a matter of controversy. Understanding the physiological function of APP and how its deregulation would contribute to AD pathogenesis is thus of prime interest.

APP is a type 1 transmembrane protein that belongs to the APP-like protein family (APLP1 and APLP2, referred to as APLPs), which are present in most of the species, excepted in yeast, prokaryotes and plants. The APLP family has been generated by several duplications and contraction events during evolution. The specific physiological role and/or redundant functions assigned to each member are yet not clearly defined (for a review see Shariati and De Strooper, 2013). APP-/- mice show a subtle phenotype, with reduced body and brain weight, reduced locomotor activity, gliosis, mild axonal growth/white matter defects and altered long-term potentiation responses (Guo et al., 2012; Muller et al., 2012; Muller and Zheng, 2012). In this broad (and complex) picture, growing evidence indicate that APP controls neuronal proliferation, differentiation (Freude et al., 2011; Hu et al., 2013) and migration during embryogenesis (Young-Pearse et al., 2007). APP contributes to the establishment of a functional neuronal network by promoting neurite outgrowth (Hoe et al., 2009b). Additionally, APP was reported to control synapses formation and activity (Priller et al., 2006; Santos et al., 2009; Lee et al., 2010; Pierrot et al., 2013; Klevanski et al., 2015; Zou et al., 2016) in the central nervous system (CNS) and at the neuromuscular junction (Stanga et al., 2016). APP directly modulates the excitatory neurotransmission by interacting with AMPA (Lee et al., 2010) or NMDA (Cousins et al., 2009; Hoe et al., 2009a) receptors. APP was also described to play an important role in GABAergic inhibitory neurotransmission. APP deficiency reduces paired pulse depression (PPD) in mice (Seabrook et al., 1999) and affects GABA receptors expressions (Fitzjohn et al., 2000; Chen et al., 2017), while APP overexpression induces hyperexcitability due to GABAergic neurotransmission failure (Born et al.,

2014). Recently, APP was associated to the GABA excitatory/inhibitory shift occurring in embryonic neurons (Doshina et al., 2017). APP appears therefore to have a direct role in the fine-tuning of excitatory and inhibitory neurotransmission, a process that seems to be also critical in AD pathogenesis.

Tuning inhibitory/excitatory neurotransmission is very important for neuronal plasticity and memory formation. It is regulated by a specific subset of genes induced by neuronal activity. They belong to the Immediate Early Genes (IEGs) family controlling the mechanisms that “reshape” synaptic inputs on neurons (West and Greenberg, 2011). IEGs expression is instrumental to neuronal plasticity and memory formation (Alberini, 2009; Loebrich and Nedivi, 2009; Leslie and Nedivi, 2011). Among these IEGs, Npas4 is specifically involved in a transcriptional program that regulates neuronal firing responses to excitatory transmission by enhancing inhibition (Lin et al., 2008), keeping neuronal firing in response to stimuli within normal levels (Spiegel et al., 2014). Elevated activity of inhibitory neurons also induces NPAS4, promoting increased excitation onto the same neurons (Spiegel et al., 2014). NPAS4 is therefore a key player in the maintenance of excitatory/inhibitory balance in neuronal network.

The precise mechanisms underlying APP synaptic functions are still elusive. One could suspect APP to regulate the expression of genes involved in synaptic activity, or to shape the structure of the synapse. APP was shown to control gene expression through its intracellular domain called AICD. An increasing list of AICD candidate genes has emerged from various models (reviewed in Pardossi-Piquard and Checler, 2012). Some of these candidate genes failed to be confirmed by transcription analysis in APP-deficient cell lines (Hebert et al., 2006; Waldron et al., 2008), and APP was also reported to regulate gene transcription independently of AICD release (Hicks et al., 2013; Pierrot et al., 2013). It is so far impossible to clearly define (i) the precise identity of APP target genes in neurons (ii) how these APP target genes relate to APP neuronal function (iii) the mechanism involved in APP-dependent in gene transcription.

In the present study, we first aimed at identifying genes transcriptionally regulated by APP in neurons. To that end, we performed a non-biased transcriptome analysis of APP+/+ and APP-/- primary cortical neurons at different stage of differentiation. In-depth transcriptome analysis revealed that the absence of APP induced only subtle changes in global gene expression. The hitherto described AICD target genes were not significantly up-or down-regulated in our model. A more detailed analysis indicates that expression of genes clustered in specific neuronal pathways was affected by the absence of APP. Amongst those genes, the activity-dependent transcription factor *Npas4* and the glutamate ionotropic receptor kainate type subunit 1 (*Grik1*) were down-regulated in the absence of APP after 7 days of culture. Interestingly, we observed that the amount of the inhibitory neurotransmitter γ-aminobutyric acid (GABA) and the expression of glutamate decarboxylase 65 (GAD65) were increased in APP-/- neurons. On the contrary, calcium responses to glutamate receptor agonists were decreased in the absence of APP, suggesting that the inhibitory inputs in synaptic transmission are increased, and that the type of excitatory transmission mediated by glutamate is altered. Direct down-regulation of *Npas4* by CRISPR-Cas9 editing in neurons mimicked the increase in GAD65 and GABA release observed in APP-/- neurons. Altogether, these results give a new insight in APP-dependent neuronal activity, and a possible basis to elucidate the defects of synaptic transmission observed in APP-dependent pathologies like AD.

Materials and Methods

Antibodies, chemicals and reagents

All media and reagents used for cell cultures were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA); fetal bovine serum was purchased from Biowest (Nuaillé, France). Analytical grade solvents and salts were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT), sAPPα (S9564) and DAPI (D9542) were from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Triton-X100 was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and TriPure

Isolation Reagent from Roche (Basel, Switzerland). Microarray analysis kits were from Affymetrix (Santa Clara, CA, USA). All reagents for RNA processing or cDNA synthesis were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). Primers were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Proteins were quantified with BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). NuPAGE® reagents were from Invitrogen (Carlsbad, CA). PVDF and nitrocellulose membranes were from Merck Millipore (Billerica, MA,) or Amersham™ (Little Chalfont, UK). Nonfat dry milk was from Merck (Darmstadt, Germany). Western Lighting® Plus-ECL reagents were from PerkinElmer (Waltham, MA) and Fluoprep mounting medium was from bioMérieux (Marcy l'Etoile, France). Lentivirus were prepared with Acrodisc® 0,45µm filters (Pall, NYC, USA) and LentiX™ Concentrator reagent (Clontech, Mountain View, CA).The following antibodies were used: APP NT (22C11, MAB348, Merck Millipore, Billerica, MA), anti-human APP (WO2, MABN10, Merck Millipore, Billerica, MA), anti-APP CT (Y188, Abcam, Cambridge, UK), anti-APLP1 (Cat. No. 171615, Calbiochem EMD Biosciences – Merck, Darmstadt, Germany), anti-APLP2 (Cat. No. 171616, Calbiochem EMD Biosciences – Merck, Darmstadt, Germany), anti-GAPDH (14C10, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), anti-MAP2 (M4403, Sigma-Aldrich St Louis, MO), anti-GAD65 (D5G2, Cell Signaling), anti-mouse IgG, HRP Whole antibody (NA931-1ML, Amersham, Little Chalfont, UK), anti-rabbit IgG, HRP Whole antibody (NA934-1ML, Amersham, Little Chalfont, UK), goat anti-mouse Alexa Fluor®-488, goat anti-mouse Alexa Fluor®-568, goat anti-rabbit Alexa Fluor®-647 and DAPI were purchased from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). Glutamate assay kit was from Abcam (Cambridge, UK) and γ-aminobutyric acid (GABA) ELISA was purchased from Cloud-Clone Corporation. 70µm Falcon™ Cell Stainers were from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA).

Animal models

APP+/+ and APP-/- mice were obtained from the Jackson Laboratory (Bar, Harbor, ME, USA) as C57Bl6/J and backcrossed for > 6 generations in CD1 genetic background. Animals were housed on a 12 h light/dark cycle in standard animal care facility with access to food and water ad libidum. Heterozygous animals (APP+/-) were bred and crossed to obtain embryos

from the three different genotypes (APP+/+, APP+/- and APP-/-) in the same litter. All experiments were performed in compliance with protocols approved by the UClouvain Ethical Committee for Animal Welfare (code number 2016/UCL/MD/015).

Primary neurons culture and treatments

Primary cultures of cortical neurons were prepared from E18 mouse embryos as previously described (Pierrot et al., 2013). Briefly, cortices were dissected and dissociated in HBSS without calcium and magnesium and the mixture was centrifuged on Fetal Bovine Serum (FBS) for 10 min at 1000xg to pellet cells. Cells were plated at 200.000 cells/cm² in culture dishes pre-treated with 10 µg/ml of poly-L-lysine in phosphate buffered saline (PBS) and cultured for 3 to 14 days in vitro in Neurobasal® medium enriched with 2% v/v B-27® supplement medium and 1mM L-glutamine at 37°C, 5% CO2 and humidified atmosphere. Half of the medium was renewed every 2-3 days.

After 6 days (DIV6), neurons were treated for 16h with 1µM of N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT), a γ-secretase inhibitor (Dovey et al., 2001) or with 20 nM of soluble APP alpha in Neurobasal® Medium.

RNA extraction, transcriptome analysis and qRT-PCR

Total RNA was extracted by TriPure Isolation Reagent according to the manufacturer's protocol. RNA samples were suspended in DEPC-treated water and RNA concentration was measured (OD 260 nm) on BioSpec-nano spectrophotometer (Shimadzu Biotech). For microarray analysis, RNA quality was evaluated by capillary electrophoresis using the Agilent 2100 Bioanalyzer instrument with the Agilent RNA 6000 Nano Kit according to the manufacturer's instructions (Agilent, Santa Clara, CA). 250 ng of total RNA for each sample was amplified and labeled using GeneChip®WT PLUS Reagent kit (Affymetrix) before being hybridized on GeneChip®Mouse Transcriptome 1.0 Array, overnight at 45°C. The chip was washed using an automated protocol on the GeneChip® Fluidics Station 450 followed by scanning on a GeneChip® Scanner on Affymetrix microarray platform (de Duve Institute, UCL, Brussels).

For quantitative PCR, RNA samples were reversed transcribed using iScript cDNA Synthesis Kit and real time PCR was performed in an iCycler MyIQ2 multicolor-Real-Time PCR detection system using iQ SYBR Green supermix kit (Biorad). A standard curve was established for relative quantification with a fourfold dilution series (from 100 to 0,0097 ng) of a cDNA template mix. Relative quantification was calculated by the 2ΔΔCT method, and results were normalized first to Gapdh expression and then normalized (percentage or fold) to the control condition. Primers used are depicted in Table 1 in Supplementary material.

Western blotting

Cells were solubilized and sonicated in lysis buffer (20% Glycerol, 4% SDS, 125 mM Tris-HCl pH 6.8) containing a cocktail of proteases and phosphatases inhibitors. Samples were prepared with NuPAGE LDS sample buffer (4x) and 50 mM DTT and then heated for 10 min at 70°C. 10 to 40 µg of proteins or 22 µl of culture medium were loaded per well for migration followed by transfer onto PVDF or nitrocellulose membranes. For APP C-terminal fragments blotting, proteins were transferred on nitrocellulose (0.1 µm). Membranes were blocked in nonfat dry milk (5% in PBS, 0,1% Tween-20) and immunoblotted with anti-APP NT (22C11, 1/500), anti-APP CT (Y188, 1/500), anti-APLP1 (1/1000), anti-APLP2 (1/1000) and anti-GAPDH (1/25000). Blots were revealed using ECL and signal quantification was performed using GelQuant.NET software (BiochemLabSolutions.com).

ImmunoCytoFluorescence (ICF)

Neurons were grown at 100.000 cells/cm² per well on poly-L-lysine coated coverslips. Neurons were rinsed with PBS and fixed for 15 min in PBS/4% paraformaldehyde. Neurons were washed again twice in PBS for 5 min and processed as described previously (Decock et al., 2016). Permeabilization and blocking steps were done in PBS/5% skimmed milk/0.3% Triton-X100 (M3TPBS); antibodies were incubated in PBS/5% skimmed milk/0.1% Triton-X100 (M1TPBS). Primary antibodies dilutions used: mouse anti-MAP2 (1/1000), rabbit anti-APP (Y188, 1/100) and rabbit anti-GAD65 (D5G2, 1/100). Secondary antibodies dilutions used: goat anti-mouse Alexa Fluor®-488 (1/500), goat anti-mouse Alexa Fluor®-568 (1/500) and goat anti-rabbit

Alexa Fluor®-647 (1/500). Images were acquired on Evos FL Auto microscope (Invitrogen) and analyzed with ImageJ software. For the quantification of signal area, 10X or 20X magnification images were identically thresholded for APP+/+ and APP-/- or Ct and CRISPR-Npas4. Area of thresholded images was measured and normalized to the number of cells counted by DAPI staining. For the quantification of the APP expression intensity, multiple 40x magnification images were acquired. A region of interest (ROI) was drawn around GFP+ neurons in the GFP channel (green) and exported to APP (Y188) signal channel (blue). ROI mean intensity is measured using "Analyze" tool of ImageJ.

CRISPR/Cas9 lentivirus construction and production

We used a lentiviral vector based approach to deliver the CRISPR-Cas9 system. We designed sgRNAs "Oligo2" and "Oligo17" to target App mouse gene (Gene ID: 11820), and sgRNA "CRISPR-Npas4" to target *Npas4* mouse gene (Gene ID: 225872). sgRNAs were cloned in a lentiviral vector delivering sgRNA, SpCas9 and coexpressing eGFP (Addgene #57818) according to author instructions (Heckl et al., 2014). The negative control (Ct) used was the lentiviral construct without sgRNA but expressing SpCas9 and eGFP. sgRNA sequences, scores and PAMs are provided in Table 2 in Supplementary material. Briefly, sgRNAs purchased at Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) were designed using on/off-target score algorithm and cloned into the pL.CRISPR.EFS.GFP plasmid. Vectors were validated by sequencing (Beckman Coulter Genomics, UK), produced and purified using Plasmid Midi kit (Qiagen, Hilden, Germany). Lentiviruses were produced by transfecting HEK293-T cells in 10 cm dishes (2x106 cells/dish) with lentiviral CRISPR-Cas9 vectors, pCMV-dR8.2 (Addgene#12263) and pMD2.G (Addgene#12259). After 48 h, the supernatant was filtered and incubated with 1/3 (v/v) of LentiX™ Concentrator for 90 min on ice. The collected supernatant was centrifuged at 1500xg for 45 min at 4°C, the pellet was resuspended in 20 µl per dish of Neurobasal® Medium and stored at -80°C until use. Empty backbone of pL-CRISPR.EFS.GFP was used as negative control (Ct) in our studies.

Neurons were infected with lentiviruses CRISPR-Cas9 1 day after plating (DIV1). Typically, 20 µl of concentrated virus were used to infect 800.000 cells per well of 12 well plate dish. One day after, the medium was completely changed and further renewed for ½ every 2-3 days. The neurons were harvested at 7 days in vitro (DIV7) or as indicated.

Flow cytometry and cell sorting

After DIV7, infected neurons were briefly rinsed with PBS and trypsinized for 2 min. Neurons were mechanically dissociated and filtered through 70 µm Falcon™ Cell Strainers in 50 ml tube containing FBS. Cells were pelleted by centrifugation at 1000xg for 5 min and resuspended in PBS/1% FBS/1mM EDTA. TO-PRO™-3 Iodide (Thermo Fisher Scientific) was used to stain dead cell and exclude them for the sorting. Cells were sorted using a BD FACSAria™III cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA) on the "Flow cytometry and cell sorting - CYTF" UCL platform. The sort parameters used were the following: nozzle 100 µm, sheath pressure 20 psi, drop frequency 30 kHz and sort precision 16-32-0. Sample and collection tubes were maintained at 4°C throughout the sort. GFP-negative and positive cells were harvested in PBS/1% FBS/1mM EDTA and centrifuged at 12000xg for 2 min and homogenized in TriPure Isolation Reagent for RNA extraction.

Calcium imaging

Changes in [Ca2+] were measured in single neurons using the calcium sensitive fluorescent dye Fura2. Neurons were grown on poly-L-lysine-coated 15 mm diameter coverslips and were loaded with 2 µM Fura2-acetoxymethyl ester (Fura-2AM; catalog no. F1225) for 40 min in a Krebs buffer (10 mM HEPES, 135 mM NaCl, 6 mM KCl, 2 mM CaCl2, 1.2 mM MgCl2,10 mM glucose, pH 7.4) at room temperature. Coverslips were rinsed once and then mounted on a heated (37°C) and perfused microscope chamber (Warner Instrument Corporation). While continuously perfused with heated Krebs buffer, Fura2-loaded neurons were excited successively at 340 and 380 nm (excitation light was obtained from a xenon lamp coupled to a monochromator) for 2x100 ms and emitted fluorescence was monitored at 510 nm using a charged coupled device sensor camera coupled to an inverted Olympus IX70 microscope (TILL photonics). Fluorescence intensities

from each single neuron was recorded separately, corrected for the background and combined (fluorescence ratio F340/F380) using the software TILLvisION version 3.3. Calcium signals were measured upon application of Krebs, 30 µM glutamate (Glut) or 50 µM kainic acid (KA) in perfusion. A total of 70–80 cells were studied in each experiment (coverslips) and non-neuronal cells were excluded from analysis as previously described by Pickering and coworkers (Pickering et al., 2008). Changes in intracellular Ca2+ fluorescence were estimated from fluorescence emission intensity ratios F340/F380 obtained after excitation of cells at wavelengths of 340 nm and 380 nm. These changes were expressed as normalized fluorescence where every measurement of F340/F380 was divided by the basal fluorescence value corresponding to the mean of signals measured during a period of 25 s in basal condition (prior to the glutamate or kainic acid stimulation). To estimate the amplitude of the response to glutamate or kainic acid, area under curve (AUC) was calculated using GraphPad Prism version 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Glutamate and GABA measurements

Glutamate and γ-aminobutyric acid (GABA) were measured in medium and in cells at DIV7. Briefly, neurons were grown at 200.000 cells/cm² in 12 well plate culture dish. Media were harvested, centrifuged to pellet cell's debris and supplemented with cocktail of proteases inhibitors and frozen at -20°C until use. Cells were scratched in ice cold PBS and pelleted by centrifugation (12.000xg for 3 min at 4°C) then quickly frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until use. For glutamate assay: Media were directly used as are. Cells were prepared according to the manufacturer protocol and measurement was normalized on protein content. For GABA ELISA assay: Media were directly used as are. Cells were lysed by 5 cycles of thawing and freezing in PBS and centrifuged at 12.000xg for 10 min at 4°C. Supernatant was used for the quantification and normalized on protein content.

Statistical analysis

Microarray analysis: Raw data were analyzed using Bioconductor (R environment). Robust Multiarray Average (RMA) was used for background correction, normalization, probe level intensity calculation and probe set

summarization. Gene expression values were compared between APP+/+ and APP-/- neurons at different stage of development DIV3, DIV7 and E18 using the R-Limma (Linear Models for MicroArray Data) package. Benjamini-Hochberg procedure was used for multiple testing corrections. From raw data, only transcripts with an Entrez ID were kept in order to facilitate the analysis. Gene set enrichment analysis was performed on differentially expressed genes sets after the ROAST (Rotation gene set tests for complex microarray experiments) (Wu et al., 2010) procedure to identify KEGG pathways modified in absence of APP for all conditions (E18, DIV3 and DIV7). The data obtained have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (Edgar et al., 2002) and are accessible through GEO Series accession number GSE112847
(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE112847).

Otherwise, statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). If two groups were compared, parametric Student's t-test or non-parametric Mann-Whitney test were used. If more than two groups were compared, parametric ANOVA with post hoc tests as indicated or non-parametric Kruskall-Wallis were used. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). The number of biological replicate (n) analyzed is indicated in figure legends in the number of independent experiment (N).

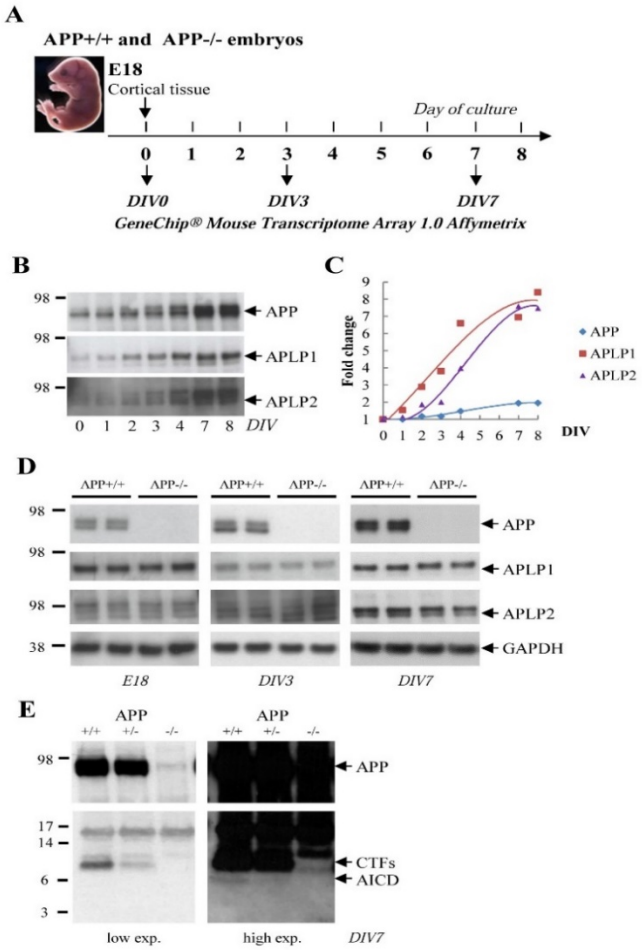


Figure S1 ***Experimental workflow and model characterization. A****) Experimental design used for the study. Cortical tissue was taken at embryonic day 18 (E18); neurons were cultured and experiments were mainly carried out after 3 and 7 days in vitro (DIV3 and DIV7). Transcriptome analysis was performed on embryonic cortex (E18) and at DIV3 or DIV7.* ***B****) APP, APLP1 and APLP2 expressions were analyzed by Western blotting at the indicated days of culture.* ***C****) Quantification of APP, APLP1 and APLP2 expression over time in primary neuron cultures. Accumulation is represented as fold change over the signal measured at day 0. Quantification was performed from one neuronal culture.* ***D****) APLP1 and APLP2 expressions are not modified in cortical tissue at E18 and primary neuron cultures at DIV3 and DIV 7. Expression of APP, APLP1, APLP2 was analyzed by Western blotting of cells lysates from APP+/+ and APP-/- primary neuron cultures.* ***E****) Samples from primary cultures at DIV7 (APP+/+, APP+/- and APP-/- neurons) were probed (Western blotting) with an antibody directed against APP C-terminus for APP C-terminal fragments (CTFs) and AICD. Low and high exposures of a typical blot are shown. Arrows indicate the expected position of APP holoprotein, APP CTFs and AICD.*

Results

APP-dependent expression of Npas4 in differentiated primary neuron cultures

Experiments were performed on primary neuron cultures according to the workflow described in Supplementary Figure S1A. Briefly, neurons from embryonic cortex (E18) were cultured for 3 or 7 days in vitro (DIV3 or DIV7) and longer (up to DIV14) when necessary. We first characterized the expression of APP family proteins and observed an increase in APP, APLP1 and APLP2 upon differentiation with a peak of expression at DIV 7-8 (Chap. II Figure S1B), supporting an important role of APP protein family in neuronal maturation. No modifications of APLP1 or APLP2 levels and maturation were observed in APP-/- neurons when compared to APP+/+ at any time point of differentiation studied (Chap. II Figure S1D). Observations performed in APP-/- neurons were therefore related to the loss of APP rather than to indirect effects related to up- or down-regulation of APLPs. Interestingly, previous studies indicated that AICD is detectable inside the nucleus specifically at DIV6-7 (Kimberly et al., 2005) suggesting that AICD-dependent gene transcription is temporally restricted. We checked for AICD production at DIV7 in total lysates of APP+/+, APP+/- and APP-/- cultures (Chap. II Figure S1E). AICD was readily detectable in APP+/+ neurons at high exposure time, confirming that it is a transient peptide present at low levels in cells (Huysseune et al., 2007). Together, these data support the involvement of APP family proteins during neuronal maturation. AICD-dependent transcriptional regulation may however only occur in restricted time-period, around DIV7 (and not at DIV3). We performed microarray experiments, which allow unbiased description of genome-wide expression changes in APP +/+ and APP-/- primary cortical neurons at DIV3, DIV7 and in E18 cortical tissue (summarized in Chap. II Figure S1A). We used Affymetrix GeneChip®Mouse Transcriptome 1.0 Array and performed data analysis with R-Limma (Linear Models for MicroArray Data) package (Ritchie et al., 2015). The chips used allow the analysis of coding and non-coding (lncRNA, miRNA, pseudogene…) gene expression as well as alternative splicing events. We ran each condition (E18, DIV3, and DIV7) in triplicate (3 chips used for each condition, from independent cultures). We focused here on

differentially expressed coding genes, although data were collected for non-coding RNAs (not show). Strikingly, the overall changes observed (fold changes) were moderate in all conditions (E18, DIV3 and DIV7). Few coding transcripts appear to be differentially expressed when the specific fold change (linear) is set at 1.25, 1.5 or 2 (Chap. II Figure 1A). The Benjamini-Hochberg multiple correction test did not reveal any robust differential gene expression (adjusted p-value <0,05) excepted for APP (positive control). Gene enrichment analysis was performed using ROAST procedure to identify molecular interaction/reaction networks diagram (Kanehisa and Goto, 2000) a.k.a. KEGG pathway altered in the absence of APP. The first five pathways (in terms of significance), the number of genes modified as well as their direction are shown in Figure 1B. Interestingly, ECM (extracellular matrix)-receptor interaction and Long-term potentiation pathways are modulated in absence of APP at DIV7. Cell-ECM interactions are mediated by transmembrane receptors and cell adhesion proteins, involved in adhesion, differentiation and maturation. Long term potentiation (LTP) is a major mechanism in memory formation and learning. Both of these pathways have been associated to APP function (Caceres and Brandan, 1997; Seabrook et al., 1999; Puzzo et al., 2011). Strikingly, we did not measure any expression change (Chap II. Supplementary Table 3) of genes identified as AICD target genes (Pardossi-Piquard and Checler, 2012).

We decided to further select genes relevant to described APP cellular function to further investigate their regulation by APP. In set of array (APP+/+, accession number GSM3089741 vs APP-/- accession number GSM3089744) from a primary neurons at DIV7, we noticed a down-regulation of (IEGs) in APP-/- neurons (Chap. II Figure 1C). Among them, the activity-dependent transcription factor, NPAS4 (Neuronal PAS domain protein 4) was of particular interest. NPAS4 is a neuron-specific IEG, known to be regulated by neuronal activity and involved synaptic plasticity and synaptic homeostasis. We confirmed by qPCR that *Npas4* mRNA level was decreased at DIV7, but not at DIV3 or in the cortex at E18 (Chap. II Figure 1D). To note, the expression of other early genes (Egr1 and Egr3) previously reported to be involved in APP-dependent gene expression were not altered in our conditions (Chap. II Figure S2A, S2B).

Figure 1

A

Up- and down-regulated genes

Linear fold change	E18		DIV3		DIV7	
	Up	*Down*	*Up*	*Down*	*Up*	*Down*
≥ 1,25	90	35	93	54	73	56
≥ 1,5	16	4	5	6	4	3
≥ 2	4	1	2	3	0	2

B

KEGG Pathways

	Nb. Genes	Direction
E18		
Base excision repair	**32**	**Up**
p53 signaling pathway	**70**	**Up**
Terpenoid backbone biosynthesis	**14**	**Down**
Small cell lung cancer	**88**	**Up**
Pyrimidine metabolism	**96**	**Up**
DIV3		
Proteasome	**42**	**Up**
RIG-I-like receptor signaling pathway	**67**	**Down**
Terpenoid backbone biosynthesis	**14**	**Up**
Glycosaminoglycan biosynthesis	**14**	**Up**
Steroid biosynthesis	**17**	**Up**
DIV7		
Homologous recombination	**26**	**Down**
Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	**23**	**Down**
Glycosaminoglycan biosynthesis - keratan sulfate	**14**	**Up**
ECM-receptor interaction	**83**	**Down**
Long-term potentiation	**64**	**Up**

C

DIV7	Gene symbol	Fold change *
Immediate Early Genes (IEGs)	*App*	0,05
	Ier2	0,52
	Arc	0,56
	Npas4	**0,57**
	Fosb	0,57
	Fos	0,60
	Egr1	0,66
	Egr2	0,74
	Egr3	0,77
	Egr4	0,78

** linear fold change (APP-/- vs. APP+/+)*

D

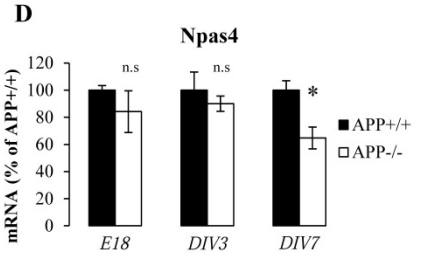


Figure 1 ***APP-dependent expression of Npas4 in young differentiating neuronal culture.*** *Summary of transcriptome analysis performed with the GeneChip® Mouse Transcriptome Array 1.0 (Affymetrix). Data were processed in triplicate (3 independent cultures) for each experimental time point (E18; DIV3; DIV7). Non-coding transcripts and alternative splicing products are detected by these arrays, but only transcripts of coding transcripts have been considered here. A) Number of up-and down-regulated coding transcript in APP-/- vs. APP+/+ primary neurons at E18, DIV3 and DIV7. Linear fold changes have been set at 1,25, 1,5 and 2. B) KEGG pathway analysis (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html) at E18, DIV3, DIV7 (APP-/- vs. APP+/+) to identify networks molecular pathways (or interaction networks) in which differentially expressed genes are clustered. The five most modified pathways are displayed for each time point, with the number of genes potentially up-or down-regulated. C) Immediate Early Genes (IEGs) expression in APP-/- vs. APP+/+ primary neurons at DIV7 and their respective fold change (APP-/- vs APP+/+) in microarray analysis at DIV7. D) Neuronal PAS 4 domain (Npas4) mRNA level was measured by qPCR at E18, DIV3 and DIV7 (n=6, N=3). Results (mean ± SEM) are expressed as percentage of controls (APP+/+). n.s.= non-significant, *p=0.0242, Student's t-test.*

Supplementary Figure 2 : Egr1 and Egr3 expressions are not modified in APP deficient neurons

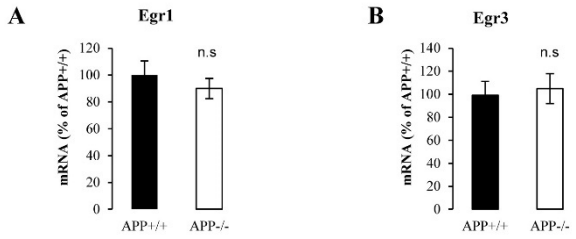


Figure S2 ***Egr1 and Egr3 expressions are not modified in APP deficient neurons.*** *Egr1 and Egr3 expressions were evaluated in APP+/+ vs. APP-/- primary neurons at DIV7. A) Egr1 mRNA level was measured by qPCR (n=6, N=3) at DIV7. Results (mean ± SEM) are given as percentage of controls (APP+/+) n.s= non-significant, Student's t-test. B) Egr3 mRNA level was measured by qPCR (n=6, N=3) at DIV7. Results (mean ± SEM) are given as percentage of controls (APP+/+) n.s.= non-significant, Student's t-test.*

Npas4 expression is AICD-independent

Since transcription of APP target genes could involve AICD (Belyaev et al., 2010), we inhibited its production by treating for 16 h neurons with 1µM DAPT, a well-described non-competitive γ-secretase inhibitor (Dovey et al., 2001). DAPT treatment induced APP CTFs accumulation (Chap. II Figure 2A) and AICD release was blocked under these conditions (Hage et al., 2014). DAPT treatment didn't decrease *Npas4* expression but indeed increased it in APP+/+ primary neurons, and not in APP-/- (Chap. II Figure 2B). It indicates that AICD is not involved in APP-dependent *Npas4* expression. Some of the APP functions can rely on its extracellular soluble fragment (sAPPα). We tested whether the sAPPα can regulate *Npas4* expression *per se*. Neuronal cultures were treated with 20 nM of human sAPPα for 16 h and *Npas4* expression was measured by qPCR. Western blotting analysis showed that human sAPPα and endogenous sAPPα (only in APP+/+) is detected in culture media of neurons (Chap. II Figure 2C). *Npas4* expression increased significantly upon sAPPα addition in APP+/+ neurons, but not in APP-/- (Chap. II Figure 2D). These data provide a general insight into APP-dependent *Npas4* transcription. (i) AICD release is not involved in this process; (ii) APP soluble ectodomain (sAPPα) regulates *Npas4* expression, only in a context where endogenous APP is expressed.

Figure 2

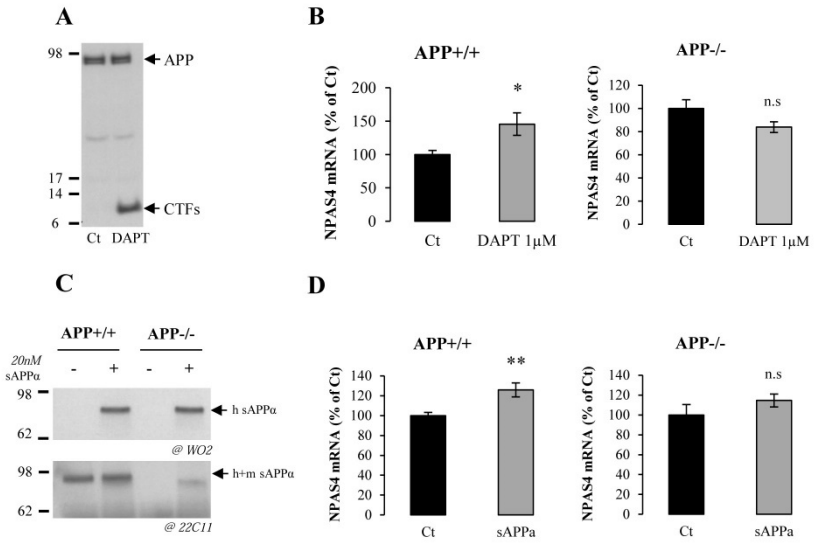


Figure 2 ***APP metabolites but not AICD regulate Npas4 expression.*** *A) Western blotting analysis of APP and C-terminal fragments (CTFs and AICD) in cortical neurons after 1 µM DAPT treatment for 16 h at DIV7. B) Quantification by qPCR of Npas4 mRNA in APP+/+ or in APP-/- neurons at DIV7 treated with 1 µM DAPT for 16 h (n=7, N=4). Results are expressed as percentage of control (Ct) (mean ± s.e.m.). *p=0.0216, n.s.= non-significant, Student-t test. C) Medium of sAPPα treated APP+/+ or APP-/- neurons was subjected to western blotting analysis using anti-human APP antibody (clone WO2) to detect the exogenous human sAPPα (h sAPPα) and using anti-mouse APP antibody (clone 22C11) to detect both endogenous and exogenous sAPPα (h+m sAPPα). Medium was collected after 16 h of treatment. D) Quantification by qPCR of Npas4 mRNA level in APP+/+ (n=8, N=4) or in APP-/- neurons at DIV7 treated with 20 nM sAPPα for 16 h (n=6, N=3). Results are expressed as percentage of control (Ct) (mean ± s.e.m.). **p=0.0055, n.s.= non-significant, Student-t test.*

The APP-dependent transcriptional regulations were subtle when compared to those reported in the literature. The phenotype of APP knockout mice is mild (Muller et al., 1994; Zheng et al., 1995) and functional redundancies with other members of the APP family (Shariati and De Strooper, 2013) can occur. Therefore, APP-dependent gene regulations could appear in the close-up but could be hidden in the long term by APLPs compensations. In this line, APP-/- mice brain phenotype is better unraveled by acute down-regulation of APP (Senechal et al., 2007). We decided therefore to knock-

down the APP expression in APP+/+ neurons with a lentiviral-based CRISPR-Cas9 genome editing approach (Jinek et al., 2012). Nearly ~50% of the cells in culture were infected under our conditions (Chap. II Figure S3A-B). Importantly, only neuronal cells were infected, reflecting the tropism of the viral particles for neurons, and not glial cells present in primary cultures. APP expression was monitored by ICF (Chap. II Figure 3A) and by measuring the intensity of APP signal in GFP-positive (infected) neurons (Chap. II Figure 3B). APP was strongly decreased in neurons infected with viruses expressing the Oligo2 and 17 sgRNA sequences when compared to Ct. This was confirmed by Western blotting showing the APP expression specifically decreased by about 50%. Importantly, APLP1 and 2 expressions were not altered in cultures infected with Oligo2 and Oligo17 lentiviruses (Chap. II Figure 3 C). This clearly indicates that off targets mechanisms - that are a major risk with CRISPR-Cas9 approaches, especially with homologous genes - are not observed in our experimental setup.

We measured the expression of *Npas4* after APP knock-down. We decided to measure *Npas4* expression selectively in GFP-positive (knock-down) neurons. This was achieved by sorting GFP positive cells by flow cytometry. We used TO-PRO™-3 staining to exclude dead cells from the analysis and set sorting parameters by using non-infected condition (no GFP) and neurons expressing GFP (GFP infected) as standards. *Npas4* expression was measured in these cells by qPCR (Chap. II Figure 3D). *Npas4* mRNA was readily decreased in neurons infected with Oligo2- and 17-expressing lentiviruses. Together, these data show that CRISPR-Cas9 system was an efficient tool to knock-down APP in primary neurons. APP knock-down resulted in the decrease in *Npas4* expression, confirming the APP-dependent *Npas4* transcriptional expression observed in APP deficient neurons.

Figure 3

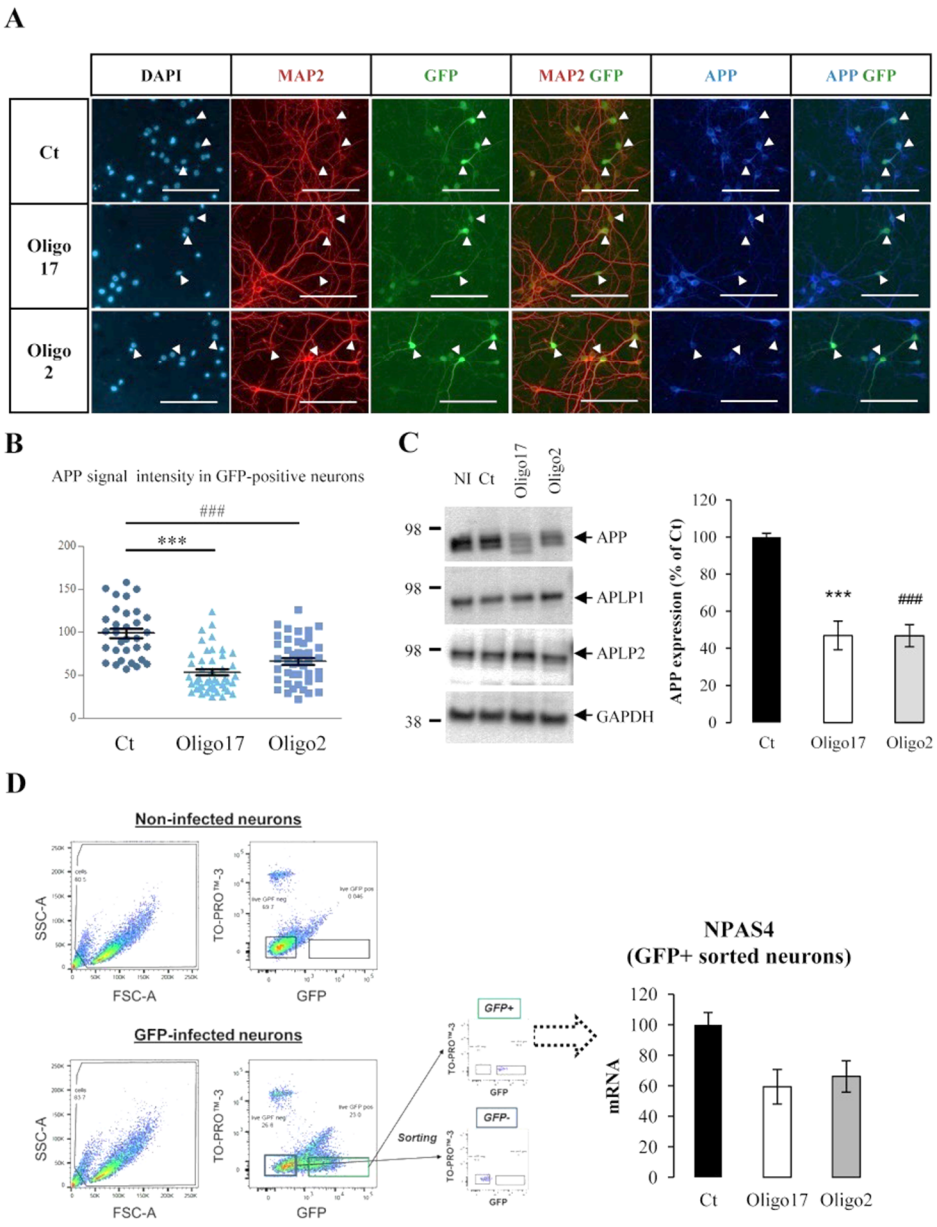


Figure 3 ***Decreased Npas4 expression in APP-silenced primary neurons****. APP was knock-down by CRISPR-Cas9 approach in primary neurons cultures. A) Cortical neurons were infected at DIV1 with lentiviruses expressing sgRNAs (Oligo2, Oligo17) or no sgRNA (Ct), SpCas9 and GFP. Cultures were immunostained for MAP2 (red), APP (blue) and DAPI (light*

*blue) at DIV7. Arrowheads indicate the position of GFP-positive (infected) neurons in each condition. Scale bar: 100µm. B) Quantification of APP signal in GFP-positive neurons. At least 33 neurons were quantified in two independent experiments for each condition (n=33 N=2). Results (mean ± SEM) are given as percentage of control (Ct). ###p<0,001 (Ct vs Oligo 2) ***p<0,001 (Ct vs Oligo17); Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test. C) Left panel. Representative Western blots showing APP, APLP1, APLP2 and GAPDH protein level in cortical neurons at DIV7 infected in the same conditions. NI = non-infected. Right panel, quantification of APP expression measured by Western blotting. Results (mean ± SEM) are given as percentage of control (Ct). ***p<0,001 (Ct vs Oligo17), ###p<0,001 (Ct vs Oligo 2), ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test (n=6, N=3). D) Sorting of GFP-expressing neurons (FACS). Scatter plots (FSC vs. SSC, left panels) of non-infected and GFP-expressing cells are shown. Dot plots (TOPRO-3, far red vs. GFP, right panels) were used to gate (green rectangle) GFP-positive/TOPRO-3 negative cells. RNA was extracted from these cells and Npas4 mRNA level was quantified by qPCR. Results were obtained from pooled samples (4 wells of 4 cm2 each) for each condition (Ct, Oligo2 and Oligo17). Quantification were carried out on 2 independent experiments (N=2). Results (mean ± SEM) are expressed as percentage of Ct.*

APP deficient neurons show increased arborization and impaired expression of GABAergic markers

Down-regulation of *Npas4* expression in the absence of APP could reflect an impairment in neurite formation and/or synaptogenesis which may lead to a deficient in basal neuronal activity. APP was reported to modulate neurite outgrowth and synapse formation (Priller et al., 2006; Young-Pearse et al., 2007; Tyan et al., 2012; Billnitzer et al., 2013) but the mechanisms by which APP modulates synapse formation and plasticity is poorly understood. We first analyzed neuronal arborization at DIV7, when *Npas4* expression is decreased. We monitored arborization by measuring the area of the neuron-specific microtubule associated protein2 (MAP2) signal per cell from DIV1 to DIV7 (Chap. II Figure 4A). APP-/- neurons extended neurites and no differences were observed at DIV1 to DIV3. The absence of APP subtly (but significantly) increased MAP2 signal at DIV7 (Chap. II Figure 4B), indicating the importance of APP for proper neurite arborization.

Figure 4

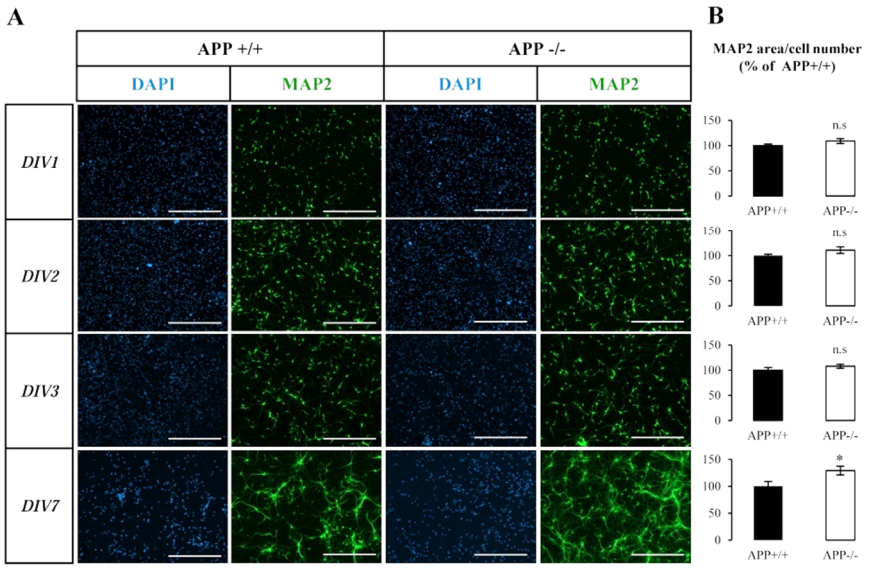


Figure 4 ***Altered neurites arborization of APP deficient neurons during in vitro maturatio****n. A) Cortical APP+/+ or APP-/- were stained against the neuron-specific marker MAP2 and the nuclear dye DAPI at different stages of maturation (DIV1-2-3 and DIV7). Scale bar: 400µm. B) Quantification of MAP2 signal area normalized to the number of neurons at DIV1, 2, 3 and 7. Quantifications were from 3 fields of at least 6 coverslips from APP+/+ and APP-/- neurons, in three independent experiments (N=3). Results (mean ± SEM) are expressed as percentage of control (APP+/+). *p=0,0293, Mann-Whitney test.*

NPAS4 is involved in the fine tuning of excitatory/inhibitory homeostasis, by controlling the balance of excitatory and inhibitory inputs on post-synaptic neurons (Lin et al., 2008; Bloodgood et al., 2013; Spiegel et al., 2014), which is characterized by the type of neurotransmitter released: typically glutamate for excitatory synapses and GABA for inhibitory synapses. We measured the amount of GABA and glutamate released in medium and present in the cells at DIV7 (Chap. II Figure 5A-B). The concentration of GABA is increased by 83% in the medium of APP-/- neurons (Chap. II Figure 5A), and no difference was observed for GABA measured in cells. We observed no significant change in glutamate concentration (cell or medium) in APP-/- neuronal cultures (Chap. II Figure 5B). GABA is synthetized by the glutamate decarboxylase enzymes (GAD65 and GAD67) that catalyze the

decarboxylation of glutamate to GABA. GAD65 synthesizes GABA for neurotransmission, and is therefore active at nerve terminals and synapses. By immunostaining, we observed that GAD65 signal is increased in APP-/- neurons (Chap. II Figure 5C). This is in agreement with the increased GABA release we observed, and the proposed role of NPAS4 in keeping the balance between inhibitory and excitatory synaptic inputs. However, the expression of GABA receptor subunit alpha 1 (GABARa1) showed a slight, but significant, decrease in APP-/- neurons suggesting more complex modifications of GABAergic neurotransmission (Chap. II Figure 5D).

Figure 5

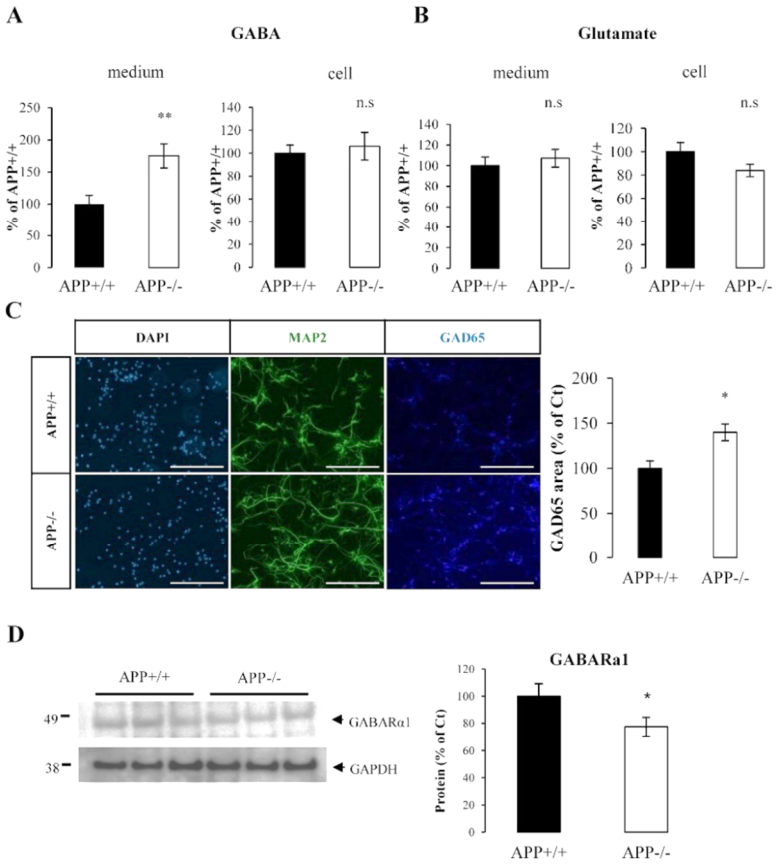


Figure 5 ***GABAergic markers are impaired in APP knock-out neurons****. A) Quantification of γ-amino butyric acid (GABA) in culture medium and cell extracts of APP+/+ and APP-/-*

*primary neurons at DIV7. Results (mean ± SEM) are expressed as percentage of APP+/+ (n=20, N=3). **p=0,0024, n.s.= non-significant, Student-t test. B) Quantification of glutamate in culture medium and cell extracts of APP+/+ and APP-/- neurons at DIV7. Results (mean ± SEM) are expressed as percentage of APP+/+ (n=16, N=3). n.s.= non-significant, Student-t test. C) Cortical APP+/+ and APP-/- neurons at DIV7 were immunostained against the neuron-specific marker MAP2 and glutamate decarboxylase 65 (GAD65). Quantification of GAD65 signal area (5 fields per coverslip) was normalized to the number of cells. At least 2 coverslips were quantified for each group (APP+/+ and APP-/-) in two independent experiments (N=2). Results (mean ± SEM) are given as percentage of control (APP+/+). Scale bar: 200µm. *p=0.0220, Mann-Whitney test. D) Neurons harvested at DIV7 and cell extracts analyzed by Western blotting for GABARα1 and GADPH expression. Quantification of GABARα1 was normalized to GAPDH expression. Results (mean ± SEM) are expressed as percentage of Ct (n=5, N=2). *p=0.0197, Student's t-test.*

Glutamatergic transmission is decreased in APP-deficient neurons

We next investigated whether the changes observed in neurotransmitter release in APP-/- are accompanied by changes in neurotransmission. Inhibitory effects of GABA on neurotransmission are difficult to measure in primary neurons derived from embryonic tissue, since the developmentally regulated shift of GABA from excitatory (development) to inhibitory (adult) is not fully achieved in primary embryonic neurons (Ben-Ari, 2002; Doshina et al., 2017). On the contrary, glutamate-dependent transmission can be readily measured by intracellular Ca2+ measurements in this model. We measured the effect of glutamate stimulation on APP+/+ and APP-/- neurons by intracellular Ca2+ measurements (Chap. II Figure 6A-B). Neuronal and glial cells can be discriminated by their glutamate induced-calcium response measured by Fura-2 (Pickering et al., 2008). We observed three different Ca2+ profiles (Chap. II Figure 6A) in which "type 1" and "type 2" were associated to neurons and "type 3" associated to glial cells, in agreement with the observations of Pickering et al. A trend to increased "type 2" responses was observed in APP-/- neurons when compared to APP+/+ (p-value=0.0957), mirrored by a similar decrease in type 1 responses (Chap. II Figure 6A). The glutamate response was measured by calculating area under curve (AUC) for APP+/+ and APP-/- upon stimulation with 50 µM glutamate. We observed a slight but significant decrease in the absence of APP (Chap. II Figure 6B). This suggests that excitatory neurotransmission can be quantitatively and qualitatively -although subtly- changed in the absence of

APP. This correlated to our transcriptome analysis, in which we observed that one particular subunit of ionotropic glutamate receptor (*Grik1* or GluR5) appeared to be down regulated in the absence of APP (Chap. II Figure 7A,). The *Grik1* gene encodes the GRIK1 protein, specific of the kainate receptor subtype. We confirmed the *Grik1* mRNA decrease by qPCR at DIV7 (Chap. II Figure 7A). This decrease was still measured at DIV14 (not shown), a time-point at which response to kainic acid (KA) was easier to measure in our model. We assessed the KA response in APP+/+ and APP-/- neurons and observed a significant decrease in APP-/- cultures suggesting that APP deficiency alters particularly excitatory transmission through kainate receptors. A more detailed analysis (Chap. II Figure 7B) showed that the average amplitude of kainate response reflected an increased number of neurons displaying lower amplitude answers when stimulated by KA.

Figure 6

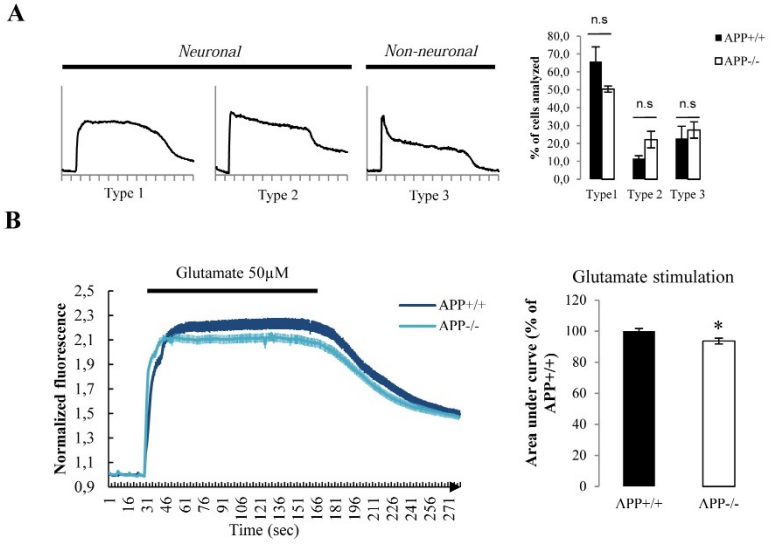


Figure 6 ***Modification in glutamate responses in APP-/- neurons measured by calcium imaging****. Neuronal activity was measured at DIV7 by calcium imaging. A) Left panel. Different calcium responses were observed after stimulation with 50 µM glutamate and classified as described by Prickering and co-workers (Prickering et al. 2008) between neuronal and non-neuronal responses. Right panel. The proportion of cells displaying Type 1, 2 or 3 response was quantified in three independent experiments (n=9, N=3). n.s.= non-significant. Student-t test. B) Normalized fluorescence trace (mean ± SEM) measured in APP+/+ and APP-/- neurons upon perfusion for 150 sec with 50 µM glutamate. The area*

*under curve (AUC) was quantified for 50 neurons per coverslips. A total of 9 coverslips for each genotype was recorded in three independent experiments (N=3). The graph on the right shows AUC expressed as percentage of control (APP+/+). *p=0,0106, Student's t-test.*

Figure 7

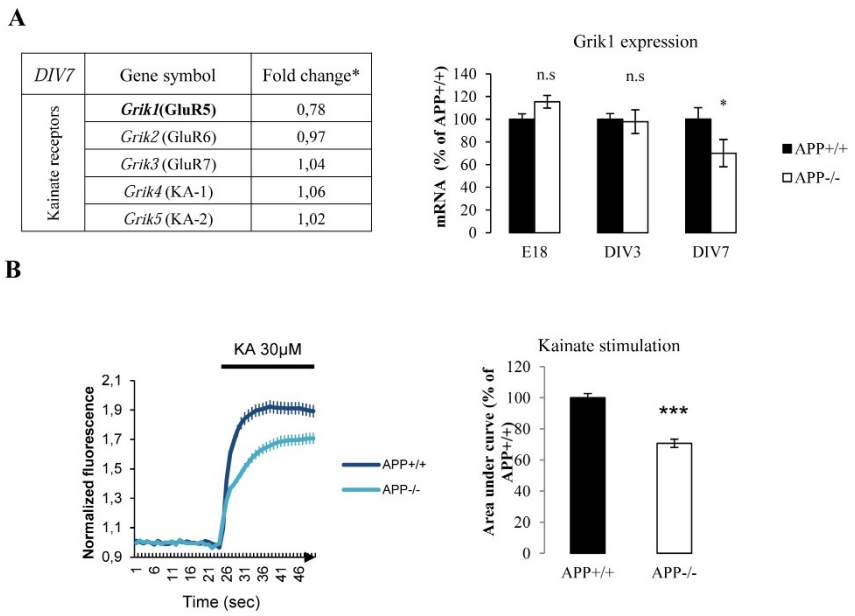


Figure 7 ***Modification in kainic acid (KA) responses in APP-/- neurons.*** *A) Left panel. Fold change observed in microarray experiments (APP+/+ vs. APP-/- neurons) at DIV7 for kainate subunits of glutamate ionotropic receptors (Grik1, Grik2, Grik3, Grik4 and Grik5). Right panel. Quantification of Grik1 mRNA by qPCR in APP+/+ and APP-/- primary neurons at DIV7. Results (mean ± SEM) are expressed as percentage of control APP+/+ (n=6, N=3). *p=0.0122, Student's t-test. B) Left panel. Normalized fluorescence trace (mean ± SEM) trace of APP+/+ and APP-/- neurons after 30µM KA stimulation at DIV14. The area under curve (AUC) was quantified for an average of 50 neurons per coverslips. A total of 5 coverslips for each genotype was recorded in two independent experiments. ***p<0,0001, Student's t-test.*

Phenotype of Npas4-deficient neurons mimics APP deficiency

Finally, we used the CRISPR-Cas9 approach, in order to silence *Npas4* and analyze if *Npas4* deficiency could recapitulate a major trait observed in APP-/- neurons, e.g. imbalance of inhibitory transmission by the upregulation of GABA release. Given that CRISPR-Cas9 editing is hard to evaluate by target mRNAs expression, and that available antibodies poorly detect NPAS4 in basal conditions, we decided to check the down-regulation of NPAS4 protein upon depolarization by KCl (Lin et al., 2008). NPAS4 was decreased in infected cells by approximately 50% (Chap. II Figure 8A), a similar extent to the one observed on mRNAs in APP-/- neurons at DIV7 (Chap. II Figure 1D). Strikingly, like for APP-deficient neurons (Chap. II Figure 5C), NPAS4-deficient neurons showed an increase in GAD65 staining (Chap. II Figure 8B) and protein expression (Chap. II Figure 8C) as well as GABA released in medium (Chap. II Figure 8C) compared to control neurons (Ct). We assessed the expression of GABA receptor subunit alpha 1 (GABARa1) at DIV7 and observed, like in APP-/- primary neurons, a decrease in protein expression after *Npas4* knockdown (Chap. II Figure 8D).

Figure 8

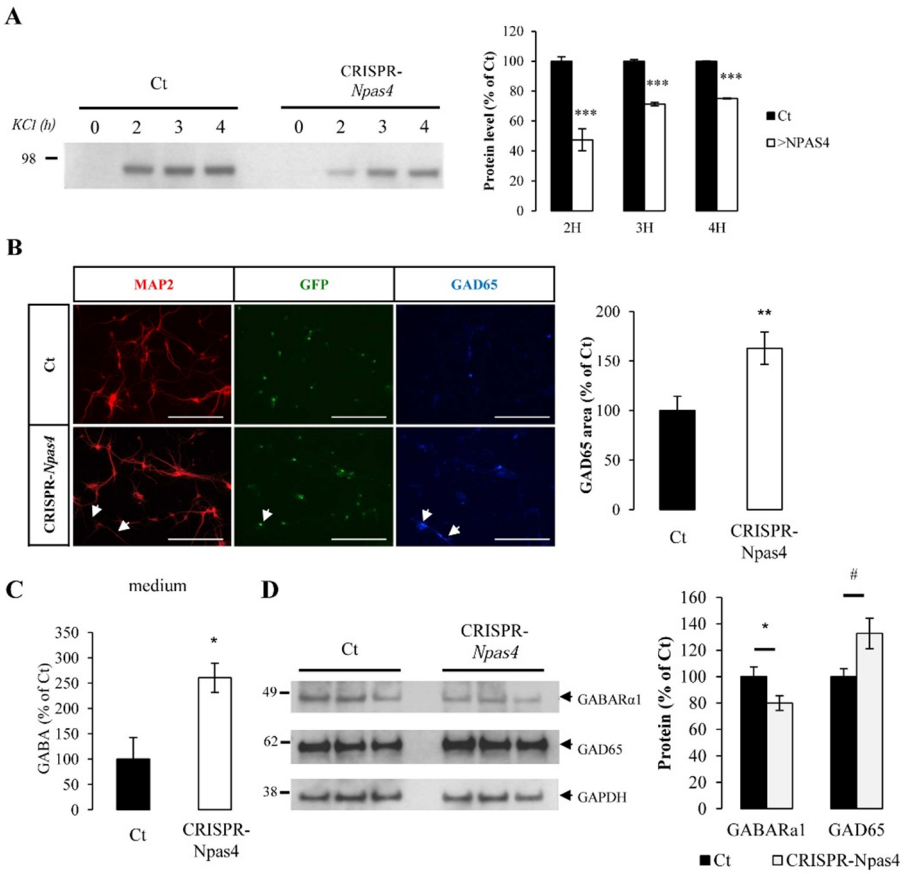


Figure 8 ***Npas4 silencing by CRISPR-Cas9 mimicks cell phenotype observed in APP deficient neurons****. Changes on inhibitory (GABA) synapses was analyzed after Npas4 silencing A) Left panel. Cortical neurons infected with CRISPR-Cas9 lentivirus targeting Npas4 gene (CRISPR-Npas4) show reduced NPAS4 levels as measured by Western blotting after membrane depolarization with 50mM potassium chloride (KCl). Control viruses without sgRNA were used as controls (Ct). Note that NPAS4 is barely detectable in non-depolarized neurons (Ct). Right panel. Quantification of NPAS4 protein level after 2, 3 and 4h of KCl depolarization. Results (mean ± SEM) are expressed as percentage of non-treated controls Ct (N=2). ***p<0,0001 Student's t-test. B) Cortical neurons infected with CRISPR-Npas4 lentiviruses at DIV1 were immunostained against MAP2 and glutamate decarboxylase 65 (GAD65) at DIV7. Quantification of GAD65 signal was normalized to the number of cells (5 fields per coverslip, 2 coverslips for each genotype in two independent experiments, N=2). Results (mean ± SEM) are given as percentage of control (Ct). Scale bar: 200µm. **p=0.0024. Mann-Whitney test. C) Quantification of γ-amino butyric acid (GABA) in culture medium at DIV7of infected control neurons (Ct) and CRISPR-Npas4 infected neurons. Results (mean ± SEM) are*

*expressed as percentage of Ct (n=5, N=2). *p=0,0146, Student-t test. D) Neurons harvested at DIV7 and cell extracts analyzed by Western blotting for GABARα1, GAD65 and GADPH expression. Quantification of GABARα1 and GAD65 were normalized to GAPDH expression. Results (mean ± SEM) are expressed as percentage of Ct (n=8, N=3). *p=0.049, #p=0.0247, Student's t-test.*

Discussion

One major APP function is to control synaptic formation, transmission and plasticity (Muller et al., 2017). We showed here that APP deficiency in cortical neurons impairs the balance between excitatory and inhibitory synaptic markers, and that this process is regulated by the activity-dependent transcription factor NPAS4. We initially identified the *Npas4* IEG as a potential APP target gene by a non-biased transcriptome profiling approach. APP-dependent *Npas4* expression involves its extracellular domain (sAPPα) but not AICD. APP appears to exert a fine tuning of excitatory/inhibitory synaptic inputs in neurons and its absence enhances, through the downregulation of *Npas4*, inhibitory GABAergic transmission. Moreover, we also found that APP deficiency affects the kainate receptor-dependent (*Grik1*), glutamate transmission, that is known to play a key role in epileptic seizures (Smolders et al., 2002), a pathological event often associated to AD (Palop and Mucke, 2009).

APP-dependent expression of Npas4 in differentiated neuronal culture

The transcriptome analysis of APP+/+ vs. APP-/- neurons at embryonic day 17 (E18-DIV0) and at different stages of primary cortical neuron differentiation (DIV3-DIV7) indicated that the transcriptional changes in the absence of APP were moderate (Chap. II Figure 1A). This is in line with a comparative transcriptome study of APP family members in the adult mouse cortex (Aydin et al., 2011). Strikingly, we found that none of the admitted APP/AICD target genes were differentially expressed in APP-/- neurons at DIV3-DIV7 or at E18 (Chap. II Supplementary Table 3). Numerous studies have described AICD-dependent gene expression in an array of in vitro- and -to a lesser extent- in vivo models (for review see Pardossi-Piquard and Checler, 2012; Grimm et al., 2013). Some of these findings were difficult if not impossible to replicate in subsequent investigations (Hebert et al., 2006; Chen and Selkoe, 2007; Waldron et al., 2008; Aydin et al., 2011). Thus AICD-dependent gene transcription is very controversial but could take place in a tissue specific manner, in a particular cellular context and in an physiopathological environment. Parameters that are not yet fully understood. We found that the expression of *Npas4*, an activity-dependent

IEG, is downregulated in the absence of APP and particularly at DIV7 (Chap. II Figure 1C-D). We observed it in APP-/- primary neurons (Chap. II Figure 1D), and upon acute APP knock-down by a CRISPR-Cas9 approach (Chap. II Figure 3D), establishing a causal relation between APP and *Npas4* transcription. We found that APP-dependent *Npas4* expression at DIV7 does not rely on AICD release, although DIV7 corresponds to the differentiation stage where AICD is detectable. Previous studies indicated that regulation of some APP target genes does not require the generation of AICD (Hicks et al., 2013). Quite strikingly, DAPT treatments (expected to inhibit AICD target genes) increased *Npas4* expression in APP+/+ neurons. This effect might imply that inhibition of γ-secretase increase the neuronal activity in an APP-dependent manner (APP-/- neurons showed no modification of *Npas4* expression after treatment). In this line, γ-secretase inhibition was shown to increase excitatory postsynaptic currents (EPSCs) (Priller et al., 2006; Restituito et al., 2011). This should be further investigated, but one hypothesis would be that the loss of Aβ could underlie the DAPT effects we observed. Several studies reported that Aβ depresses AMPA- and NMDA-receptor mediated currents and EPSCs in neurons arguing toward a negative feedback of Aβ on synaptic transmission (Kamenetz et al., 2003; Snyder et al., 2005; Hsieh et al., 2006). This feedback is not possible in APP-/- background. Alternatively, studies indicated that inhibition of γ-secretase induces an increase of production of sAPPα (Chen et al., 2015). In that case, increased activity related to increased sAPPα production would corroborate the results we obtained on *Npas4* expression by treating neurons with sAPPα. But we also found that sAPPα effects on *Npas4* expression are observed only in APP+/+ and not in APP-/- background. This striking observation indicates that (i) the transcriptional effects of sAPPα require the presence of endogenous APP holoproteins (ii) homophilic ectodomain interactions are likely to be involved. This adds mechanistic insight to the described role of APP soluble ectodomain. Soluble APP was shown to rescue many traits of APP-deficient mice (Ring et al., 2007; Weyer et al., 2014) and was suggested to promote its physiological effects by interaction with APP holoprotein (Milosch et al., 2014; Deyts et al., 2016). The mechanisms involved are APP-specific, and APP deficiency is not compensated by APLPs upregulation, in agreement with studies showing that APLP1/APLP2 levels

are not altered in APP-deficient total brain extracts (Zheng et al., 1995) or in primary cortical neurons (White et al., 1998).

GABAergic and glutamatergic inputs alterations in APP deficient neurons are caused by Npas4 downregulation

In the absence of APP, we saw an increase in neuronal outgrowth (Chap. II Figure 4) and GAD65 signal (Chap. II Figure 5), as well as increased GABA release in the medium (Chap. II Figure 5A). To note, *Npas4* knockdown mimics APP deficiency on GAD65 levels and GABA measurements (Chap. II Figure 8). This supports that APP regulates the fine-tuning inhibitory synaptic transmission in the neuronal network through NPAS4. This is first in agreement with very recent work showing that APP regulates GABAergic neurotransmission during neuronal differentiation (Doshina et al., 2017). In vivo studies evidenced increased GABA levels in the brain of APP-/- mice (Lee et al., 2010). The finding that APP-dependent processes are mediated by NPAS4 is relevant to several experimental evidences reported in previous studies. NPAS4 possesses unique features among the IEGs (Sun and Lin, 2016): (i) it is only expressed in neurons; (ii) it is activated selectively by neuronal activity; (iii) NPAS4 has been shown to be important for both glutamatergic and GABAergic synapse. NPAS4 is implicated in a transcriptional program that regulates neuronal firing responses to excitatory transmission by enhancing inhibition (Lin et al., 2008), and is critical for the homeostatic mechanisms that keep neuronal firing in response to stimuli within normal levels (Spiegel et al., 2014). Increasing the excitability of a set of neurons leads to changes in both their input and axonal synapses. NPAS4 is necessary for the changes in the inputs synapses of these neurons, but it is not involved in changes to their axonal synapses (Sim et al., 2013). NPAS4 is induced in excitatory neurons, where it promotes increased numbers of inhibitory synaptic inputs. Elevated activity of inhibitory neurons also induces NPAS4, which promotes increased excitation onto the same neurons (Spiegel et al., 2014). Altogether, these specific functions of NPAS4 correlate well with our main observation, that is APP-dependent *Npas4* expression and upregulation of the GABAergic system in APP-deficient neurons.

APP has been associated not only to GABAergic but also glutamatergic neurotransmission (Dawson et al., 1999; Seabrook et al., 1999; Fitzjohn et al., 2000; Cousins et al., 2009; Hoe et al., 2009a; Lee et al., 2010). We found the expression of a kainate receptor subunit (*Grik1*) to be significantly reduced in APP-/- primary neurons (Chap. II Figure 7). Kainate receptors (KARs) are the third type of ionotropic glutamate receptors (iGlu) with N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) and α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors (AMPARs). APP-/- are only slightly less sensitive to glutamate (Chap. II Figure 6), but show a decreased activation upon KARs stimulation (Chap. II Figure 7). This is in accordance with the decreased *Grik1* expression we observed. Interestingly, KARs were reported to also play a crucial role in GABAergic neurotransmission (Lerma and Marques, 2013). Activation of presynaptic KARs containing the GRIK1 subunit was reported to depress GABA neurotransmitter release in hippocampal mossy fibers (Caiati et al., 2010). Decreased *Grik1* expression may therefore contribute to the increase in GABA release observed in APP-/- neurons. Together, these observations suggest that the absence of APP leads to an increased release of the GABA neurotransmitter, possibly involving presynaptic KARs.

The overall effect of APP deficiency of neuronal network activity and synaptic transmission needs further investigations, considering that APP deficiency affects both GABAergic and glutamatergic systems to different extents. Network activity as measured by calcium oscillations is robust at DIV13 but still moderate at DIV7 (Santos et al., 2009) and seemed more important in primary neurons in which APP has been silenced. Important points must be kept in mind here. First, GABAergic transmission shifts from excitatory to inhibitory during development (Ben-Ari, 2002), and our findings should be evaluated in mature neurons. Although APP is involved in the inhibitory GABA profile that appears upon embryonic primary neuron differentiation (Doshina et al., 2017), suspected effect of APP on GABAergic transmission should be addressed by other approaches in adult neurons. Second, we found that the level of GABA receptor subunit alpha 1 (GABARα1) was diminished in the absence of APP and in Npas4-deficient neurons (Figure 5 and 8). This ultimately suggests that increases in GABA

release in APP-deficient models may not result in a net increase of inhibitory transmission, or at least in complex modulation of neuronal response to GABA.

Possible relevance to the AD pathophysiology

APP plays a central role in the onset and progression of AD by releasing the Aβ peptide, but, APP deficiency is more difficult to correlate to the pathology. Still, it is admitted that impairment of APP function per se, either caused by FAD mutations or upon ageing, may contribute to neuronal dysfunction occurring in the disease. For instance, the phenotype of APP deletion in the CNS is age-dependent (Priller et al., 2006). Upon aging, impairments in learning and memory associated with deficits in LTP are observed in APP-deficient mice (Ring et al., 2007). The role of APP in maintaining spine architecture is supported by the reduction in dendritic length and branching as well as in total spine density in old APP-deficient mice (Lee et al., 2010; Tyan et al., 2012). A severe decrease in metabolic activity was also observed in presynaptic densities of APP KO animals (Lassek et al., 2017). This is an important feature, because bioenergetics and metabolic activity are fueling the synthesis of neuromediators (glutamate and consequently GABA), and providing energy supply and calcium buffering essential for synaptic function and plasticity.

Significantly lower levels of GABA and glutamate were measured in the temporal cortex of AD patients, pointing to deficient synaptic function and an imbalance in neuronal excitatory/inhibitory transmission (Gueli and Taibi, 2013). These observations unambiguously support changes in neurotransmission in AD (and even in ageing brain), but the mechanisms underlying this process are hardly understood. Here we found that neuronal activity by itself, sensed by the NPAS4 IEG, reshapes synaptic inputs on neurons and particularly GABAergic transmission, in line with modification of GABA transmission in AD models (Doshina et al., 2017). Very interestingly, *Npas4* expression decreases along with AD progression, particularly at Braak NFT stages (I-II) corresponding to lesions developed in transentorhinal/entorhinal cortex (Miyashita et al., 2014). Moreover,

selective changes in neurotransmission associated to kainate receptors we observed are of particular interest in the AD context. KARs receptors have been linked to numerous brain disorders such as epilepsy, schizophrenia and autism. We found that the kainate subunit 1 of the ionotropic glutamate receptor was less expressed in APP-/- primary neurons, along with a decreased responsiveness of APP-/- neurons to kainic acid stimulation (Figure 8). It strongly suggests a correlation between APP expression and transmission through KARs. In agreement, an increased risk for unprovoked seizures exists in individuals with AD compared with others of the same age (Friedman et al., 2012).

In conclusion, our main observation that APP deficiency in neurons is integrated by the activity-dependent NPAS4 IEG to further re-modulate inhibitory and excitatory neuronal inputs, provides new insight to understand the role of APP in synaptic activity, but also a mechanistic frame to further explore the impairments of network activity in AD.

Abbreviations

Aβ, amyloid-β peptide; AChE, acetylcholinesterase; AD, Alzheimer's disease; AICD, APP intracellular domain; APP, Amyloid Precusor Protein; APLP1, APP-like Protein1; APLP2, APP-like Protein 2; PPD, paired pulse depression; CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats; DAPT, N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester; ECM, extracellular matrix; GABARa1, GABA(A) receptor subunit alpha-1 ; GAD65, glutamate decarboxylase 65; GRIK1, glutamate ionotropic receptor kainate type subunit-1; IEG, immediate early gene; KA, kainic acid; LTP, long term potentiation; NPAS4, neuronal PAS domain protein 4; sAPPα, soluble APP alpha.

Acknowlegments

pL-CRISPR.EFS.GFP (Addgene plasmid # 57818) and pL-CRISPR.EFS.tRFP (Addgene plasmid # 57819) were a gift from Benjamin Ebert. pCMV delta R8.2 (Addgene plasmid # 12263) and pMD2.G (Addgene plasmid # 12259) were a gift from Didier Trono. We thank Jerome Ambroise for insight and technical support in the analysis of microarray data. We thank Nicolas Dauguet for the cell cytometry sorting of the neurons.

Author contributions

R.O. and P.K.C. designed the research study; R.O. conducted the experiments, with the help of B.T., S.C., C.V., A.D., N.P. and F.P. Intracellular calcium measurement were designed and performed with the help of P.D. and M.V. All the authors analyzed data. R.O. and P.K.C. wrote the manuscript with the inputs of S.S., N.P. and J.N.O. All the authors have read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the Belgian Fonds pour la formation à la recherche dans l'industrie et l'agriculture (FRIA-FNRS), the Interuniversity Attraction Pole Programme-Belgian Sate-Belgian Science Policy (IAP-P7/16 and IAP-P7/13), The Belgian Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (FRSM), the Queen Elisabeth Medical Foundation (FMRE), the Fondation

pour la Recherche sur la Maladie d'Alzheimer (SAO/FRA) and by the Action de Recherche Concertée (ARC 14/19-059)

Conflict of interest statement

The authors confirm that there are no conflicts of interest.

References

Alberini, C.M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. Physiol Rev 89(1), 121-145. doi: 10.1152/physrev.00017.2008.

Aydin, D., Filippov, M.A., Tschape, J.A., Gretz, N., Prinz, M., Eils, R., et al. (2011). Comparative transcriptome profiling of amyloid precursor protein family members in the adult cortex. BMC Genomics 12, 160. doi: 10.1186/1471-2164-12-160.

Baker, M. (2016). 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. Nature 533(7604), 452-454. doi: 10.1038/533452a.

Belyaev, N.D., Kellett, K.A., Beckett, C., Makova, N.Z., Revett, T.J., Nalivaeva, N.N., et al. (2010). The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a {beta}-secretase-dependent pathway. J Biol Chem 285(53), 41443-41454. doi: 10.1074/jbc.M110.141390.

Ben-Ari, Y. (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. Nat Rev Neurosci 3(9), 728-739. doi: 10.1038/nrn920.

Billnitzer, A.J., Barskaya, I., Yin, C., and Perez, R.G. (2013). APP independent and dependent effects on neurite outgrowth are modulated by the receptor associated protein (RAP). J Neurochem 124(1), 123-132. doi: 10.1111/jnc.12051.

Bloodgood, B.L., Sharma, N., Browne, H.A., Trepman, A.Z., and Greenberg, M.E. (2013). The activity-dependent transcription factor NPAS4 regulates domain-specific inhibition. Nature 503(7474), 121-125. doi: 10.1038/nature12743.

Born, H.A., Kim, J.Y., Savjani, R.R., Das, P., Dabaghian, Y.A., Guo, Q., et al. (2014). Genetic suppression of transgenic APP rescues Hypersynchronous network activity in a mouse model of Alzeimer's disease. J Neurosci 34(11), 3826-3840. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5171-13.2014.

Caceres, J., and Brandan, E. (1997). Interaction between Alzheimer's disease beta A4 precursor protein (APP) and the extracellular matrix: evidence for the participation of heparan sulfate proteoglycans. J Cell Biochem 65(2), 145-158.

Caiati, M.D., Sivakumaran, S., and Cherubini, E. (2010). In the developing rat hippocampus, endogenous activation of presynaptic kainate receptors reduces GABA release from mossy fiber terminals. J Neurosci 30(5), 1750-1759. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4566-09.2010.

Chen, A.C., Kim, S., Shepardson, N., Patel, S., Hong, S., and Selkoe, D.J. (2015). Physical and functional interaction between the alpha- and gamma-secretases: A new model of regulated intramembrane proteolysis. J Cell Biol 211(6), 1157-1176. doi: 10.1083/jcb.201502001.

Chen, A.C., and Selkoe, D.J. (2007). Response to: Pardossi-Piquard et al., "Presenilin-Dependent Transcriptional Control of the Abeta-Degrading Enzyme Neprilysin by Intracellular Domains of betaAPP and APLP." Neuron 46, 541-554. Neuron 53(4), 479-483. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.023.

Chen, M., Wang, J., Jiang, J., Zheng, X., Justice, N.J., Wang, K., et al. (2017). APP modulates KCC2 expression and function in hippocampal GABAergic inhibition. Elife 6. doi: 10.7554/eLife.20142.

Cousins, S.L., Hoey, S.E., Anne Stephenson, F., and Perkinton, M.S. (2009). Amyloid precursor protein 695 associates with assembled NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors to result in the enhancement of their cell surface delivery. J Neurochem 111(6), 1501-1513. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06424.x.

Dawson, G.R., Seabrook, G.R., Zheng, H., Smith, D.W., Graham, S., O'Dowd, G., et al. (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term

potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. Neuroscience 90(1), 1-13.

Decock, M., Stanga, S., Octave, J.N., Dewachter, I., Smith, S.O., Constantinescu, S.N., et al. (2016). Glycines from the APP GXXXG/GXXXA Transmembrane Motifs Promote Formation of Pathogenic Abeta Oligomers in Cells. Front Aging Neurosci 8, 107. doi: 10.3389/fnagi.2016.00107.

Deyts, C., Thinakaran, G., and Parent, A.T. (2016). APP Receptor? To Be or Not To Be. Trends Pharmacol Sci 37(5), 390-411. doi: 10.1016/j.tips.2016.01.005.

Doshina, A., Gourgue, F., Onizuka, M., Opsomer, R., Wang, P., Ando, K., et al. (2017). Cortical cells reveal APP as a new player in the regulation of GABAergic neurotransmission. Sci Rep 7(1), 370. doi: 10.1038/s41598-017-00325-2.

Dovey, H.F., John, V., Anderson, J.P., Chen, L.Z., de Saint Andrieu, P., Fang, L.Y., et al. (2001). Functional gamma-secretase inhibitors reduce beta-amyloid peptide levels in brain. J Neurochem 76(1), 173-181.

Fitzjohn, S.M., Morton, R.A., Kuenzi, F., Davies, C.H., Seabrook, G.R., and Collingridge, G.L. (2000). Similar levels of long-term potentiation in amyloid precursor protein -null and wild-type mice in the CA1 region of picrotoxin treated slices. Neurosci Lett 288(1), 9-12.

Freude, K.K., Penjwini, M., Davis, J.L., LaFerla, F.M., and Blurton-Jones, M. (2011). Soluble amyloid precursor protein induces rapid neural differentiation of human embryonic stem cells. J Biol Chem 286(27), 24264-24274. doi: 10.1074/jbc.M111.227421.

Friedman, D., Honig, L.S., and Scarmeas, N. (2012). Seizures and epilepsy in Alzheimer's disease. CNS Neurosci Ther 18(4), 285-294. doi: 10.1111/j.1755-5949.2011.00251.x.

Grimm, M.O., Mett, J., Stahlmann, C.P., Haupenthal, V.J., Zimmer, V.C., and Hartmann, T. (2013). Neprilysin and Abeta Clearance: Impact of the APP

Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease. Front Aging Neurosci 5, 98. doi: 10.3389/fnagi.2013.00098.

Gueli, M.C., and Taibi, G. (2013). Alzheimer's disease: amino acid levels and brain metabolic status. Neurol Sci 34(9), 1575-1579. doi: 10.1007/s10072-013-1289-9.

Guo, Q., Wang, Z., Li, H., Wiese, M., and Zheng, H. (2012). APP physiological and pathophysiological functions: insights from animal models. Cell Res 22(1), 78-89. doi: 10.1038/cr.2011.116.

Hage, S., Marinangeli, C., Stanga, S., Octave, J.N., Quetin-Leclercq, J., and Kienlen-Campard, P. (2014). Gamma-secretase inhibitor activity of a Pterocarpus erinaceus extract. Neurodegener Dis 14(1), 39-51. doi: 10.1159/000355557.

Hebert, S.S., Serneels, L., Tolia, A., Craessaerts, K., Derks, C., Filippov, M.A., et al. (2006). Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes. EMBO Rep 7(7), 739-745. doi: 10.1038/sj.embor.7400704.

Heckl, D., Kowalczyk, M.S., Yudovich, D., Belizaire, R., Puram, R.V., McConkey, M.E., et al. (2014). Generation of mouse models of myeloid malignancy with combinatorial genetic lesions using CRISPR-Cas9 genome editing. Nat Biotechnol 32(9), 941-946. doi: 10.1038/nbt.2951.

Hicks, D.A., Makova, N.Z., Gough, M., Parkin, E.T., Nalivaeva, N.N., and Turner, A.J. (2013). The amyloid precursor protein represses expression of acetylcholinesterase in neuronal cell lines. J Biol Chem 288(36), 26039-26051. doi: 10.1074/jbc.M113.461269.

Hoe, H.S., Fu, Z., Makarova, A., Lee, J.Y., Lu, C., Feng, L., et al. (2009a). The effects of amyloid precursor protein on postsynaptic composition and activity. J Biol Chem 284(13), 8495-8506. doi: 10.1074/jbc.M900141200.

Hoe, H.S., Lee, K.J., Carney, R.S., Lee, J., Markova, A., Lee, J.Y., et al. (2009b). Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite

outgrowth. J Neurosci 29(23), 7459-7473. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4872-08.2009.

Hsieh, H., Boehm, J., Sato, C., Iwatsubo, T., Tomita, T., Sisodia, S., et al. (2006). AMPAR removal underlies Abeta-induced synaptic depression and dendritic spine loss. Neuron 52(5), 831-843. doi: 10.1016/j.neuron.2006.10.035.

Hu, Y., Hung, A.C., Cui, H., Dawkins, E., Bolos, M., Foa, L., et al. (2013). Role of cystatin C in amyloid precursor protein-induced proliferation of neural stem/progenitor cells. J Biol Chem 288(26), 18853-18862. doi: 10.1074/jbc.M112.443671.

Huysseune, S., Kienlen-Campard, P., and Octave, J.N. (2007). Fe65 does not stabilize AICD during activation of transcription in a luciferase assay. Biochem Biophys Res Commun 361(2), 317-322. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.06.186.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337(6096), 816-821. doi: 10.1126/science.1225829.

Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T., et al. (2003). APP processing and synaptic function. Neuron 37(6), 925-937.

Kanehisa, M., and Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. Nucleic Acids Res 28(1), 27-30.

Kimberly, W.T., Zheng, J.B., Town, T., Flavell, R.A., and Selkoe, D.J. (2005). Physiological regulation of the beta-amyloid precursor protein signaling domain by c-Jun N-terminal kinase JNK3 during neuronal differentiation. J Neurosci 25(23), 5533-5543. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4883-04.2005.

Klevanski, M., Herrmann, U., Weyer, S.W., Fol, R., Cartier, N., Wolfer, D.P., et al. (2015). The APP Intracellular Domain Is Required for Normal Synaptic Morphology, Synaptic Plasticity, and Hippocampus-Dependent Behavior. J Neurosci 35(49), 16018-16033. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2009-15.2015.

Lassek, M., Weingarten, J., Wegner, M., Neupartl, M., Array, T.N., Harde, E., et al. (2017). APP Deletion Accounts for Age-Dependent Changes in the Bioenergetic Metabolism and in Hyperphosphorylated CaMKII at Stimulated Hippocampal Presynaptic Active Zones. Front Synaptic Neurosci 9, 1. doi: 10.3389/fnsyn.2017.00001.

Lee, K.J., Moussa, C.E., Lee, Y., Sung, Y., Howell, B.W., Turner, R.S., et al. (2010). Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. Neuroscience 169(1), 344-356. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.04.078.

Lerma, J., and Marques, J.M. (2013). Kainate receptors in health and disease. Neuron 80(2), 292-311. doi: 10.1016/j.neuron.2013.09.045.

Leslie, J.H., and Nedivi, E. (2011). Activity-regulated genes as mediators of neural circuit plasticity. Prog Neurobiol 94(3), 223-237. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.05.002.

Lin, Y., Bloodgood, B.L., Hauser, J.L., Lapan, A.D., Koon, A.C., Kim, T.K., et al. (2008). Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4. Nature 455(7217), 1198-1204. doi: 10.1038/nature07319.

Loebrich, S., and Nedivi, E. (2009). The function of activity-regulated genes in the nervous system. Physiol Rev 89(4), 1079-1103. doi: 10.1152/physrev.00013.2009.

Milosch, N., Tanriover, G., Kundu, A., Rami, A., Francois, J.C., Baumkotter, F., et al. (2014). Holo-APP and G-protein-mediated signaling are required for sAPPalpha-induced activation of the Akt survival pathway. Cell Death Dis 5, e1391. doi: 10.1038/cddis.2014.352.

Miyashita, A., Hatsuta, H., Kikuchi, M., Nakaya, A., Saito, Y., Tsukie, T., et al. (2014). Genes associated with the progression of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. Transl Psychiatry 4, e396. doi: 10.1038/tp.2014.35.

Muller, U., Cristina, N., Li, Z.W., Wolfer, D.P., Lipp, H.P., Rulicke, T., et al. (1994). Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene. Cell 79(5), 755-765.

Muller, U.C., Deller, T., and Korte, M. (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. Nat Rev Neurosci 18(5), 281-298. doi: 10.1038/nrn.2017.29.

Muller, U.C., Pietrzik, C.U., and Deller, T. (2012). The physiological functions of the beta-amyloid precursor protein APP. Exp Brain Res 217(3-4), 325-329. doi: 10.1007/s00221-012-3039-2.

Muller, U.C., and Zheng, H. (2012). Physiological functions of APP family proteins. Cold Spring Harb Perspect Med 2(2), a006288. doi: 10.1101/cshperspect.a006288.

Palop, J.J., and Mucke, L. (2009). Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease. Arch Neurol 66(4), 435-440. doi: 10.1001/archneurol.2009.15.

Pardossi-Piquard, R., and Checler, F. (2012). The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. J Neurochem 120 Suppl 1, 109-124. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07475.x.

Pickering, M., Pickering, B.W., Murphy, K.J., and O'Connor, J.J. (2008). Discrimination of cell types in mixed cortical culture using calcium imaging: a comparison to immunocytochemical labeling. J Neurosci Methods 173(1), 27-33. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.05.014.

Pierrot, N., Tyteca, D., D'Auria, L., Dewachter, I., Gailly, P., Hendrickx, A., et al. (2013). Amyloid precursor protein controls cholesterol turnover needed for neuronal activity. EMBO Mol Med 5(4), 608-625. doi: 10.1002/emmm.201202215.

Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H.A., and Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. J Neurosci 26(27), 7212-7221. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1450-06.2006.

Puzzo, D., Privitera, L., Fa, M., Staniszewski, A., Hashimoto, G., Aziz, F., et al. (2011). Endogenous amyloid-beta is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory. Ann Neurol 69(5), 819-830. doi: 10.1002/ana.22313.

Restituito, S., Khatri, L., Ninan, I., Mathews, P.M., Liu, X., Weinberg, R.J., et al. (2011). Synaptic autoregulation by metalloproteases and gamma-secretase. J Neurosci 31(34), 12083-12093. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2513-11.2011.

Ring, S., Weyer, S.W., Kilian, S.B., Waldron, E., Pietrzik, C.U., Filippov, M.A., et al. (2007). The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. J Neurosci 27(29), 7817-7826. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1026-07.2007.

Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., et al. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic Acids Res 43(7), e47. doi: 10.1093/nar/gkv007.

Santos, S.F., Pierrot, N., Morel, N., Gailly, P., Sindic, C., and Octave, J.N. (2009). Expression of human amyloid precursor protein in rat cortical neurons inhibits calcium oscillations. J Neurosci 29(15), 4708-4718. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4917-08.2009.

Seabrook, G.R., Smith, D.W., Bowery, B.J., Easter, A., Reynolds, T., Fitzjohn, S.M., et al. (1999). Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. Neuropharmacology 38(3), 349-359.

Senechal, Y., Kelly, P.H., Cryan, J.F., Natt, F., and Dev, K.K. (2007). Amyloid precursor protein knockdown by siRNA impairs spontaneous alternation in adult mice. J Neurochem 102(6), 1928-1940. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04672.x.

Shariati, S.A., and De Strooper, B. (2013). Redundancy and divergence in the amyloid precursor protein family. FEBS Lett 587(13), 2036-2045. doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.026.

Sim, S., Antolin, S., Lin, C.W., Lin, Y., and Lois, C. (2013). Increased cell-intrinsic excitability induces synaptic changes in new neurons in the adult dentate gyrus that require Npas4. J Neurosci 33(18), 7928-7940. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1571-12.2013.

Smolders, I., Bortolotto, Z.A., Clarke, V.R., Warre, R., Khan, G.M., O'Neill, M.J., et al. (2002). Antagonists of GLU(K5)-containing kainate receptors prevent pilocarpine-induced limbic seizures. Nat Neurosci 5(8), 796-804. doi: 10.1038/nn880.

Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., et al. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. Nat Neurosci 8(8), 1051-1058. doi: 10.1038/nn1503.

Spiegel, I., Mardinly, A.R., Gabel, H.W., Bazinet, J.E., Couch, C.H., Tzeng, C.P., et al. (2014). Npas4 regulates excitatory-inhibitory balance within neural circuits through cell-type-specific gene programs. Cell 157(5), 1216-1229. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.058.

Stanga, S., Zanou, N., Audouard, E., Tasiaux, B., Contino, S., Vandermeulen, G., et al. (2016). APP-dependent glial cell line-derived neurotrophic factor gene expression drives neuromuscular junction formation. FASEB J 30(5), 1696-1711. doi: 10.1096/fj.15-278739.

Sun, X., and Lin, Y. (2016). Npas4: Linking Neuronal Activity to Memory. Trends Neurosci 39(4), 264-275. doi: 10.1016/j.tins.2016.02.003.

Tyan, S.H., Shih, A.Y., Walsh, J.J., Maruyama, H., Sarsoza, F., Ku, L., et al. (2012). Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. Mol Cell Neurosci 51(1-2), 43-52. doi: 10.1016/j.mcn.2012.07.009.

Waldron, E., Isbert, S., Kern, A., Jaeger, S., Martin, A.M., Hebert, S.S., et al. (2008). Increased AICD generation does not result in increased nuclear translocation or activation of target gene transcription. Exp Cell Res 314(13), 2419-2433. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.05.003.

West, A.E., and Greenberg, M.E. (2011). Neuronal activity-regulated gene transcription in synapse development and cognitive function. Cold Spring Harb Perspect Biol 3(6). doi: 10.1101/cshperspect.a005744.

Weyer, S.W., Zagrebelsky, M., Herrmann, U., Hick, M., Ganss, L., Gobbert, J., et al. (2014). Comparative analysis of single and combined APP/APLP knockouts reveals reduced spine density in APP-KO mice that is prevented

by APPsalpha expression. Acta Neuropathol Commun 2, 36. doi: 10.1186/2051-5960-2-36.

White, A.R., Zheng, H., Galatis, D., Maher, F., Hesse, L., Multhaup, G., et al. (1998). Survival of cultured neurons from amyloid precursor protein knock-out mice against Alzheimer's amyloid-beta toxicity and oxidative stress. J Neurosci 18(16), 6207-6217.

Wu, D., Lim, E., Vaillant, F., Asselin-Labat, M.L., Visvader, J.E., and Smyth, G.K. (2010). ROAST: rotation gene set tests for complex microarray experiments. Bioinformatics 26(17), 2176-2182. doi: 10.1093/bioinformatics/btq401.

Young-Pearse, T.L., Bai, J., Chang, R., Zheng, J.B., LoTurco, J.J., and Selkoe, D.J. (2007). A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. J Neurosci 27(52), 14459-14469. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4701-07.2007.

Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M.E., Sirinathsinghji, D.J., Hopkins, R., Smith, D.W., et al. (1995). beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. Cell 81(4), 525-531.

Zou, C., Crux, S., Marinesco, S., Montagna, E., Sgobio, C., Shi, Y., et al. (2016). Amyloid precursor protein maintains constitutive and adaptive plasticity of dendritic spines in adult brain by regulating D-serine homeostasis. EMBO J 35(20), 2213-2222. doi: 10.15252/embj.201694085.

Supplementary data and tables

Supplementary Figure 3: Infectivity of lentiviral CRISPR-Cas9 vectors

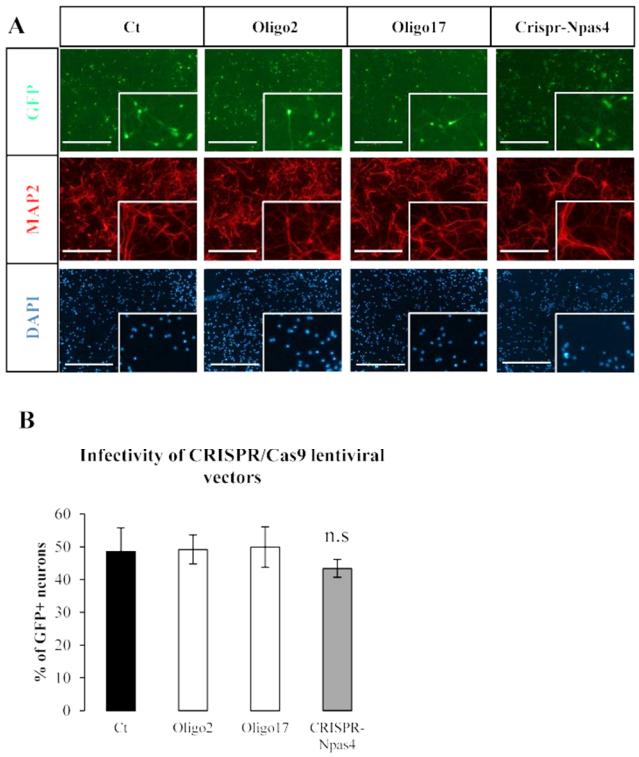


Figure S3 ***Infectivity of lentiviral CRISPR-Cas9 vectors****. A) Cortical neurons were infected at DIV1 with lentiviruses expressing sgRNAs (Oligo2, Oligo17 or CRISPR-Npas4) or no sgRNA (Ct), SpCas9 and GFP. Cultures were immunostained for MAP2 (red) and DAPI (light blue) at DIV7. Scale bar = 400µm. B) Quantification of GFP+ neurons (GFP+/MAP2+) in total neuron population (MAP2+) after lentiviral CRISPR-Cas9 infection with control (Ct), Oligo2, Oligo17 or CRISPR-Npas4. At least five fields were analyzed for each lentiviral vector in two independent experiments (n≥5, N=2). Results are expressed as percentage of GFP+/MAP2+ cells in total MAP2+ cells (mean ± s.e.m). n.s.= non-significant, Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test.*

Primers	**Forward**	**Reverse**
Gapdh	5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3'	5'- ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'
Npas4	5'-GCTATACTCAGAAGGTCCAGAAGGC-3'	5'-TCAGAGAATGAGGGTAGCACAGC-3'
Egr1	5'-TCCTCTCCATCACATGCCTG-3'	5'-CACTCTGACACATGCTCCAG-3'
Egr3	5'-GACTCGGTAGCCCATTACAATC-3'	5'-ACTTTCCCAAGTAGGTCACGG-3'
Grik1	5'-GCTGGACACTCCTCTATTTCCT-3'	5'-ACAGGTTCGTTTTCCACAGTT-3'

Supplementary Table 1 : ***qPCR primers****. Sequences of forward and reverse primers for quantitative PCR for genes analyzed ion the study.*

gRNA	**Sequence**	**PAM – Specificity score**
Oligo2	GTGGAAGATCCGCCGCGCCC	TGG - 95
Oligo17	GTACCCACTGATGGCAACGC	CGG - 92
CRISPR-*Npas4*	GACCCTTGCGAGTGTAGATGC	AGG - 83

Supplementary Table 2 ***: CRISPR-Cas9 sgRNA****. Sequences, PAM motifs and scores for each sgRNAs used in the study.*

AICD-target genes			Results in our array		
Gene symbol	***References***	**Up or down**	**E18**	**3DIV**	**7DIV**
APP	*von Rotz et al. 2004*	Up	0,07	0,07	0,04
RA-responsive genes	*Gao and Pimplikar 2001*	Down	-	-	-
KAI1/CD82	*Baek et al. 2002; von Rotzet al. 2004*	Up	1,07	0,97	0,97
GSK3b	*Kim et al. 2003; von Rotzet al. 2004;*	Up	0,99	0,99	1,04
BACE	*von Rotz et al. 2004*	Up	0,98	1,06	1,04
Tip60	*von Rotz et al. 2004*	Up	1,03	1,01	0,99
NEP	*Pardossi-Piquard et al.2005; Belyaev*	Up	0,97	1,01	0,99
p53	*Alves da Costa et al. 2006 Ozaki et al. 2006*	Up	0,99	1,04	1,07
a2-Actin	*Muller et al. 2007*	Up	1,02	1,09	0,92
Transgelin	*Muller et al. 2007*	Up	1,01	0,97	0,97
IGFBP3	*Muller et al. 2007*	Up	1,02	1,02	0,97
EGFR	*Zhang et al. 2007*	Down	0,93	1,05	0,93
LRP1	*Liu et al. 2007*	Down	1	1,07	1,04

Cyclin B1 and D1	*Ahn et al. 2008*	/	/	/	/
VGLUT2	*Schrenk-Siemens et al. 2008*	Up	0,96	1,05	1,23
CHOP	*Takahashi et al. 2009*	Up	1	1,04	0,93
Aquaporin 1	*Huysseune et al. 2009*	Up	1,44	0,95	0,96
S100a9	*Ha et al. 2010b*	Up	1,15	0,92	0,99
ApoJ/clusterin	*Kogel et al. 2011*	Down	1,16	1,12	1,02
Ptch1	*Trazzi et al. 2011*	Up	1,03	1,06	1,01

Supplementary table 3 : ***AICD dependent target genes are not differentially expressed in differentiating neuronal culture****. Summary of the transcriptome analysis for the AICD target genes reported to be transcriptionally regulated by AICD (adapted from Pardossi-Piquard and Checler, 2012). First column correspond to Gene Symbol. Second column shows to the associated publication of the corresponding gene and the third column correspond to the direction of regulation by the AICD (Up or down regulated). The last three columns depicted the linear fold change (APP-/- vs APP+/+) observed for each gene under our experimental conditions E18 (DIV0), DIV3 and DIV7. APP fold change is highlighted in red and taken as a positive control.*

Chapitre III

Etude du rôle de l'APP dans la transmission GABAergique via la modulation de l'expression du co-transporteur au chlore KCC2

Les fonctions de l'APP sont diverses mais il joue un rôle important dans la régulation de la transmission synaptique (voir section « le rôle de l'APP dans la fonction, l'apprentissage et la mémoire »). Des évidences suggèrent que son rôle dans la régulation de l'activité neuronale toucherait également la neurotransmission inhibitrice encore appelée GABAergique. En effet, les souris APP-/- montrent une diminution de la dépression synaptique dépendante des courants inhibiteurs GABA (Seabrook, Smith et al. 1999) qui serait responsable en partie de la déficience de plasticité synaptique et des déficits de potentialisation à long terme et de mémoire (Dawson, Seabrook et al. 1999, Senechal, Kelly et al. 2008). L'APP peut également interagir physiquement avec certains récepteurs au GABA (Schwenk, Perez-Garci et al. 2016). Malgré l'importance de ces données, les relations exactes entre l'APP et la transmission GABAergique restent mal comprises.

Dans cette étude, nous avons étudié le rôle de l'APP humain sur la neurotransmission GABAergique. Celle-ci est notamment régulée par la concentration de chlore intracellulaire, elle-même contrôlée par l'expression de deux co-transporteurs au chlore (NKCC1 et KCC2) autorisant respectivement l'entrée ou la sortie de chlore dans la cellule. L'expression régulée de ces co-transporteurs au cours du développement du SNC rend le neurotransmetteur GABA d'abord excitateur puis inhibiteur. Ce mécanisme est appelé « GABA shift ». Dans les neurones corticaux, nous avons surexprimé l'APP humain à l'aide d'un vecteur adénoviral et observé que l'expression de KCC2 est diminuée sans modification de l'expression de NKCC1. Cette régulation est indépendante du domaine extracellulaire et de l'AICD mais impliquerait plutôt le domaine transmembranaire de l'APP. La diminution d'expression de KCC2 est associée à une réduction de

l'expression du facteur de transcription USF1 et contribue à la baisse de l'effet inhibiteur et hyperpolarisant associé à la transmission GABAergique.

Dans le cadre de cette étude dont les résultats ont été publiés dans le journal *Scientific Report*s (Doshina, Gourgue et al. 2017) et qui ont fait l'objet d'une thèse de doctorat (Doshina 2017), ma contribution principale a été de préparer les cultures primaires de neurones de souris APP+/+ et APP-/- pour l'évaluation de l'expression de NKCC1, de KCC2 et l'expression des paralogues de l'APP, l'APLP1 et l'APLP2 (Supplementary Figure 7).

Cortical cells reveal APP as a new player in the regulation of GABAergic neurotransmission

Anna Doshina[1], Florian Gourgue[1], Michiho Onizuka[1], **Remi Opsomer[1]**, Peng Wang[1], Kunie Ando[2], Bernadette Tasiaux[1], Ilse Dewachter[1], Pascal Kienlen-Campard[1], Jean-Pierre Brion[2], Philippe Gailly[1,] Jean-Noël Octave[1] and Nathalie Pierrot[1].

1Institute of Neuroscience, Université catholique de Louvain, 1200 Brussels, Belgium
2Laboratory of Histology and Neuropathology, Université libre de Bruxelles, 1070 Brussels, Belgium
Correspondance : Jean-Noël Octave (jean-noel.octave@uclouvain.be)

Abstract:

The amyloid precursor protein (APP) modulates synaptic activity, resulting from the fine tuning of excitatory and inhibitory neurotransmission. GABAergic inhibitory neurotransmission is affected by modifications in intracellular chloride concentrations regulated by Na+-K+-2Cl- cotransporter 1 (NKCC1) and neuronal K+-Cl- cotransporter 2 (KCC2), allowing entrance and efflux of chloride, respectively. Modifications in NKCC1 and KCC2 expression during maturation of cortical cells induce a shift in GABAergic signaling. Here, we demonstrated that APP affects this GABA shift. Expression of APP in cortical cells decreased the expression of KCC2, without modifying NKCC1, eliciting a less inhibitory GABA response. Downregulation of KCC2 expression by APP was independent of the APP intracellular domain, but correlated with decreased expression of upstream stimulating factor 1 (USF1), a potent regulator of Slc12a5 gene expression (encoding KCC2). KCC2 was also downregulated in vivo following APP expression in neonatal mouse brain. These results argue for a key role of APP in the regulation of GABAergic neurotransmission.

La surexpression de l'APP humain dans les neurones corticaux induit une diminution de l'expression de KCC2. Contre-intuitivement, la déficience de l'APP (neurones APP-/-) n'affecte pas significativement l'expression de NKCC1 et de KCC2 au niveau de l'ARN messager ni au niveau de la protéine (Chap. III Figure 1-A).

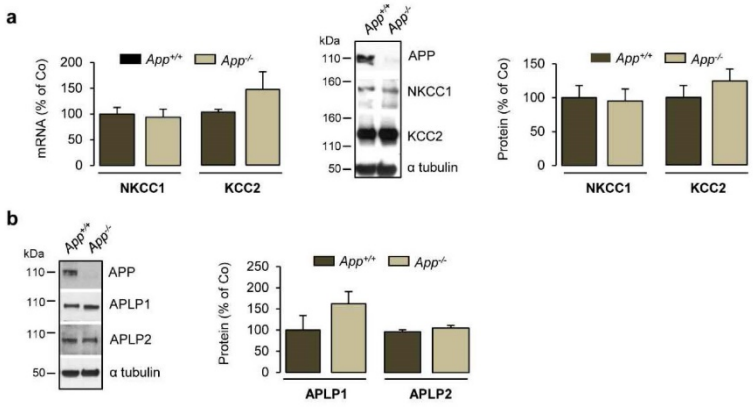


Figure 1 ***Unaffected expression of NKCC1 and KCC2 in App knock-out cells and APLP1 and 2 expression****. (a) Comparative RT-qPCR analyses of Slc12a2 (encoding NKCC1) and Slc12a5 (encoding KCC2) mRNA levels from primary cultures of mouse cortical cells of wild type (App+/+) and App knockout mice (App-/-). Results were obtained at 13 DIV, normalized to GAPDH mRNA and expressed as percentage (mean ± s.e.m.) of App+/+ (n=10 of each analysed in 8 independent experiments, P>0.05, NKCC1: Student's t-test and KCC2: Mann-Whitney test). (a (Middle panel) and b) Representative Western blots of cell lysates from App+/+ and App-/- cortical cultures at 13 DIV. Expression of endogenous APP (APP) was monitored with the anti-APP C-terminal antibody. Blots were further probed with anti-APLP1 and 2, anti-NKCC1, anti-KCC2 and anti-α tubulin antibodies. Right panels: quantification of NKCC1 and KCC2 / α tubulin ratios (a) or APLP1 and APLP2 / α tubulin ratios (b). Results were expressed as percentage (mean ± s.e.m.) of App+/+ (App+/+ and App-/- n=3 of each analysed in 3 independent experiments), P>0.05, Student's t-test.*

Néanmoins, nous observons une tendance à l'augmentation de l'expression de KCC2 dans les neurones APP-/- (Chap.III Figure 1A). Compte tenu du fait que les homologues de l'APP (l'APLP1 et l'APLP2) pourraient partager des fonctions redondantes (Shariati and De Strooper 2013), nous pourrions supposer qu'une compensation fonctionnelle de ces membres puisse

masquer le phénotype que l'on observe après la surexpression d'APP. Nous avons donc évalué l'expression de l'APLP1 et de l'APLP2 dans les neurones APP-/- et observé une légère augmentation (non significative) pour l'APLP1 (Chap. III Figure 1-B) appuyant l'hypothèse de la compensation. Pour éviter que les phénomènes de compensations ne viennent masquer les effets de l'absence d'APP, nous avons diminué de manière aiguë l'expression de l'APP endogène par interférence ARN (ShRNA) et observé que l'expression de KCC2 augmente significativement (Doshina, Gourgue et al. 2017) ce qui confirme la relation inversément proportionnelle entre l'expression de l'APP et celle de KCC2.

Discussion générale

La maladie d'Alzheimer est la forme la plus fréquente de démence sénile et son impact considérable en fait un enjeu majeur de santé publique, de société et de recherche médicale. Le meilleur espoir d'enrayer à terme la progression de ce fléau est l'identification de cibles précises permettant de développer de nouvelles thérapies.

Les recherches de ces 25 dernières années ont mis en évidence un grand mécanisme à l'origine de l'apparition et de la progression de la maladie. Ce mécanisme général connu comme l'hypothèse de la cascade amyloïde n'a abouti à l'heure actuelle à aucune avancée thérapeutique satisfaisante, et se cantonne plutôt à la découverte de nouveaux outils de prédiction de la maladie.

L'APP a été largement étudié comme précurseur du peptide amyloïde (Aβ) car un déséquilibre de la production ou de la clairance de ce peptide est l'élément central dans la cascade d'évènements menant à la maladie d'Alzheimer. L'APP occupe un rôle important dans le développement cérébral, la plasticité synaptique, la mémoire et la neuroprotection. Dès lors, une question se pose : l'altération des fonctions physiologiques de l'APP peut-elle contribuer aux symptômes et également à la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer en tant que telle, c'est-à-dire indépendamment de la pathologie amyloïde ? Elucider les fonctions physiologiques de l'APP est donc primordial pour la compréhension globale, la prévention et le traitement futur de la maladie d'Alzheimer.

Ce travail de thèse s'est penché principalement sur l'étude des régulations transcriptionnelles dépendantes de l'APP et leurs implications dans l'activité neuronale. Cette fonction de l'APP, principalement associée à l'AICD, est largement controversée dans la littérature. Entamé depuis plus d'une décennie, cet axe de recherche n'a livré aucune information indiscutable sur l'identité des gènes dont la transcription est contrôlée par l'APP dans le SNC, sur les voies de signalisations intracellulaires activées par l'APP ou sur les mécanismes de transactivation impliquant l'AICD.

Dans l'espoir de dissiper certaines controverses et surtout de mieux comprendre l'impact de ces régulations transcriptionnelles dépendantes de l'APP (et/ou de l'AICD) dans la physiologie neuronale, nous avons formulé plusieurs objectifs dans ce travail :

- Identifier les gènes cibles de l'AICD par une combinaison de deux approches non biaisées : l'immunoprécipitation de chromatine associée à l'AICD suivie de séquençage à haut débit (ChIP-Seq) et l'analyse de l'expression différentielle du transcriptome de neurones déficients en APP. Ces approches avaient pour objectif d'identifier les gènes dont la transcription est modifiée par la liaison de l'AICD (et des protéines partenaires) à des séquences génomiques. Elles permettraient également de discriminer des cibles transcriptionnelles de l'APP en distinguant celles impliquant ou non la translocation de l'AICD vers le noyau.

- Etudier l'importance de ces gènes cibles dans la physiologie neuronale et l'impact de leur dérégulation dans le contexte de maladies neurodégénératives.

Ces deux objectifs ont été particulièrement difficiles et stimulants. Premièrement, l'étude des fonctions physiologiques de l'APP est intrinsèquement compliquée du fait de la multitude de fragments protéolytiques « actifs » qu'il produit et du fait de la présence de fonctions partiellement redondantes régulées par ses homologues (APLP1 et APLP2). Deuxièmement, une quantité importante de données concernant les mécanismes et les gènes cibles associés à l'AICD ont été publiées sans pour autant aboutir à un consensus sur la pertinence de ces régulations.

Nous avons évalué le rôle de l'AICD en tant que régulateur transcriptionnel en étudiant tout d'abord sa production et sa dégradation dans les cellules à partir de différents intermédiaires du métabolisme de l'APP (fragments C-terminaux). Cela a permis de contribuer à l'identification, dans un travail récent auquel nous avons collaboré, des structures du CTFβ (décrit comme le précurseur exclusif de l'AICD transcriptionnellement actif) en feuillet β encadrant un motif LVFF inhibant la production de l'Aβ et la libération de

l'AICD. Si le lien entre la production d'Aβ et d'AICD est intuitif, les données non publiées mais présentées dans le chapitre I, le sont moins. Elles nous indiquent que l'AICD est extrêmement labile. Sa production n'est pas augmentée lorsque l'on surexprime ses précurseurs métaboliques (CTFα et β) dans les cellules et il est indétectable lorsqu'il est directement exprimé dans le cytosol. Empêcher l'acidification de la voie endocytaire et lysosomale est la seule manière pour induire son accumulation. Tout ceci nous a amenés à mettre de côté l'approche ChIP-Seq AICD et à analyser l'expression différentielle des gènes en absence d'APP dans les neurones in vitro. Nos principaux résultats (chapitre II) identifient le gène précoce *Npas4* comme une nouvelle cible transcriptionnelle. En l'absence d'APP, l'expression de *Npas4* diminue ce qui induit un déséquilibre des afférences excitatrices (E) et inhibitrices (I) dans les neurones en faveur d'une augmentation des marqueurs GABAergiques (GABA et GAD65) et d'une diminution d'un type spécifique de transmission glutamatergique impliquant les récepteurs de type kaïnate (*Grik1*). Cela indique le rôle de l'APP dans le contrôle de cette balance E/I des signaux afférents du neurone. Ce rôle est d'ailleurs appuyé par les travaux récents dans lesquels nos contributions ont permis de mettre en évidence le contrôle de la transmission GABAergique par l'APP via la régulation transcriptionnelle du symporteur potassique KCC2 (chapitre III).

Production, dégradation et localisation nucléaire de l'AICD

Le catabolisme extrêmement rapide de l'AICD est un obstacle majeur pour la mise en évidence de son activité transcriptionnelle et donc de son implication dans la régulation génique. Son temps de demi-vie est de 5 minutes (Cupers, Orlans et al. 2001). Par comparaison, la demi-vie du NICD, le fragment transcriptionnel actif de Notch, est d'environ 180 minutes (Fryer, White et al. 2004, Ilagan, Lim et al. 2011). Cette différence notable n'est toutefois pas incompatible avec la fonction de régulateur transcriptionnel comme l'illustre la durée de demi-vie courte (5-20min) du facteur de transcription p53. La dégradation de l'AICD est réalisée par l'IDE cytosolique (Edbauer, Willem et al. 2002), par le protéasome (Nunan, Williamson et al. 2003, Gersbacher, Goodger et al. 2013) et par les

cathepsines B (Asai, Yagishita et al. 2011). L'utilisation d'inhibiteurs de l'IDE (orthophénantroline), du protéasome (MG132) et des cathepsines B (CA-074Me) ne nous a pas permis d'accumuler l'AICD jusqu'à un niveau détectable par Western blotting dans les lignées cellulaires contrôles ou surexprimant l'APP humain (Chap. I Figure 3). L'analyse de la dégradation d'AICD dans les études précédentes est basée sur l'utilisation de lignées cellulaires (ou de préparations membranaires) surexprimant l'APPsw (KN670/671NL) ou l'APP fusionné avec une protéine fluorescente jaune (Citrine). L'APPsw est connu pour être davantage métabolisé selon la voie amyloïdogène et produire en conséquence plus d'Aβ et d'AICD (Citron, M. 1992 Nature. Mutation). Il est possible que l'inhibition de ces enzymes (IDE, Cathepsines B, Protéasome) ne soit pas suffisante compte tenu de la production basale d'AICD à partir d'APP non muté. L'expression d'un APP taggé du côté C-terminal avec une protéine fluorescente (Citrine, YFP, GFP) a permis d'étudier sa dégradation et sa localisation dans de nombreuses études, mais l'ajout d'une séquence peptidique de grande taille (238 acides aminés, GFP) au fragment AICD de 50 acides aminés modifie virtuellement sa stabilité, sa distribution et son activité biologique. Conceptuellement, quand un AICD est produit, un Aβ l'est également. Toutefois, l'AICD pourrait dériver de la voie non-amyloïdogène et donc être produit en plus grande quantité. Néanmoins, l'AICD endogène est extrêmement difficile à observer en condition basale dans les lignées cellulaires ou les neurones (Chap. I Figures 3 et 6) alors que comparativement l'Aβ est facilement mesurable par diverses techniques de quantification (ELISA, IP et WB). Plusieurs facteurs peuvent alors influencer sa détectabilité : sa stabilité moindre (dégradation rapide) mais également le manque d'outils de détection efficaces. Différentes méthodes de démasquage de l'épitope favorise d'ailleurs la détection de l'AICD par Western blotting (Pimplikar and Suryanarayana 2011).

Nous avons exprimé des CTFs (taggés FLAG du côté C-terminal) directement dans les cellules HEK293. Les constructions CTFs sont bien détectables par les anticorps anti-FLAG et anti-APP, C-ter-C17 mais aucun fragment correspondant à l'AICD-FLAG produit à partir du C83- ou C99-FLAG n'est détectable en conditions basales. L'expression directe (ectopique) de l'AICD-

FLAG ne permet pas non plus sa détection dans un lysat cellulaire ce qui suggère que l'AICD-FLAG issu des CTFs-FLAG est soit rapidement dégradé soit peu produit par le clivage (γ-sécrétase) des constructions exogènes. L'agent alcalinisant NH_4Cl inhibe la voie endoso/lysosomale en empêchant l'acidification de ces compartiments. Contrairement aux autres inhibiteurs testés, le NH_4Cl provoque l'accumulation d'AICD dans les HEK293, ceci en inhibant probablement sa dégradation (Vingtdeux, Hamdane et al. 2007) et en provoquant son accumulation dans les lysosomes (Chap. I Figure 5). Ceci n'est pas restreint aux lignées cellulaires classiquement utilisées car c'est aussi observable dans des neurones en culture (Chap. I Figure 6). Cette observation ne plaide pas en faveur d'un rôle de l'AICD comme activateur transcriptionnel. Il a été montré par ailleurs qu'induire l'accumulation de l'AICD par le NH_4Cl ne modifie pas l'expression des gènes cibles proposés in vitro (Waldron, Isbert et al. 2008). Toutefois, le fait d'accumuler l'AICD en neutralisant l'acidification des compartiments endocytaires indique que l'AICD y serait dégradé ou éliminé. Son orientation intracytoplasmique suggère que des structures multivésiculaires (Corps multivésiculaires, autophagosomes,…) l'incluent soit pour l'adresser aux les lysosomes (dégradation directe) soit pour l'excréter de la cellule par les exosomes. Ceci est en accord avec le fait que l'APP (Verbeek, Otte-Holler et al. 2002) mais également l'Aβ, les CTFs et l'AICD ont été identifiés dans les corps multivésiculaires et les exosomes (Rajendran, Honsho et al. 2006, Vingtdeux, Hamdane et al. 2007, Laulagnier, Javalet et al. 2018). Cette voie de dégradation/élimination par les exosomes pourrait permettre à l'AICD ou ses précurseurs (CTFα et CTFβ) d'agir comme un facteur diffusible acheminé vers des cellules « cibles » par les exosomes pour y exercer leurs fonctions. De récentes données indiquent que l'APP et les CTFs se retrouvent dans des sous-ensembles d'exosomes qui peuvent être endocytés par des neurones « cibles ». On retrouve dans les exosomes de l'AICD-Gal4, libéré par le clivage γ-sécrétase sur l'APP-Gal4 (CTFs-Gal4) dans une cellule productrice, et capable d'activer la transcription d'un gène rapporteur luciférase indiquant que l'APP (et les CTFs) transférés par les exosomes sont captés et fonctionnellement actifs dans les cellules cible (Laulagnier, Javalet et al. 2018). Cette voie « d'élimination » par les compartiments endocytaires pourrait donc faire partie d'un mécanisme beaucoup complexe impliqué

dans la régulation des fonctions associées à l'APP et à ses métabolites, considérés dans ce cas comme des facteurs diffusibles.

Une autre observation indique que l'AICD qui s'accumule en conditions alcalinisantes dérive vraisemblablement de l'APP endogène et non de constructions (ex : C99-FLAG) exogènes (Chap. I Figure 5). Ceci est en accord avec le travail récent de *Evrard et al*. démontrant que le C99 surexprimé directement dans la cellule ne suit pas la même voie de dégradation que le CTFβ endogène et est moins clivé par la γ-sécrétase (Evrard, C. et al. under reviewing). L'expression ectopique de C99 aboutit à sa dégradation par le protéasome, majoritaire par rapport à son clivage par la γ-sécrétase réalisé dans des compartiments de la voie sécrétoire. Le CTFβ, produit endogène de la β-sécrétase, est efficacement clivé dans les compartiments endocytaires par la γ-sécrétase ou dégradé dans les lysosomes.

Une hypothèse (assez simpliste) serait que l'AICD produit par la voie amyloïdogène (clivage du CTFβ) a une distance plus courte à parcourir pour être acheminé dans le noyau et donc serait moins susceptible à la dégradation que celui produit depuis la voie non-amyloïdogène à la membrane plasmique. Ceci soulève également la question de l'identité des présénilines présentes dans la γ-sécrétase qui libèrent l'AICD transcriptionnellement actif. En effet, les complexes γ-sécrétase formés de PS2 sont particulièrement localisés dans les endosomes alors que les complexes formés avec la PS1 sont distribués de manière plus homogène dans la cellule (Sannerud, Esselens et al. 2016). Cette hypothèse en concordance avec nos travaux montrant que la PS2 semble plus efficace pour produire un AICD transcriptionnellement actif (Marinangeli, Tasiaux et al. 2015), constitue une piste majeure d'investigations pour les futures études sur les régulations transcriptionnelles dépendantes de l'APP.

L'hypothèse que l'AICD, à l'instar du NICD, soit un activateur transcriptionnel a émergé au vu des similitudes de clivages que subissent les deux précurseurs APP et Notch. Alors que le NICD contient un signal de localisation nucléaire qui l'exporte vers le noyau, l'AICD en est dépourvu. De plus, l'AICD n'a aucune structure particulière qui lui permettrait de s'associer directement avec l'ADN. Sa fonction de régulateur transcriptionnel

dépendrait essentiellement de son association avec la protéine adaptatrice Fe65 pour la translocation nucléaire et pour le recrutement de la machinerie transcriptionnelle (Tip60 et MED12). Bien que la localisation nucléaire de l'AICD soit documentée (Kimberly, Zheng et al. 2001, von Rotz, Kohli et al. 2004, Pardossi-Piquard, Petit et al. 2005), les évidences que l'AICD endogène (isoforme AICD50, non taggée, non surexprimée) se retrouve dans le noyau en sont moins sûres. Des modèles de régulations transcriptionnelles dépendantes de l'AICD/Fe65/Tip60 ont été proposés, modèles dans lesquels l'AICD ne transloque pas dans le noyau mais où il sert de site d'assemblage pour Fe65 et/ou Tip60 qui migreront dans le noyau pour réguler l'expression génique (Cao and Sudhof 2004, Hass and Yankner 2005, Yang, Cool et al. 2006). Pour conclure ce premier point de notre discussion, nos résultats s'inscrivent dans la lignée d'autres études indiquant que l'AICD est produit dans des conditions très restrictives qui ne sont pas directement en accord avec son rôle de régulateur transcriptionnel. Sous certaines conditions et par son association avec des adaptateurs, des histones acétyl transférases et la machinerie transcriptionnelle (Fe65, Tip60 et MED12), il contrôlerait l'expression des gènes dont celui de la Néprilysine mais il convient -et notamment dans les neurones- de considérer que des régulations transcriptionnelles dépendantes de l'APP n'impliqueraient pas l'AICD.

Régulations transcriptionnelles dépendantes de l'APP indépendamment du clivage ε

Le modèle de *Cao* et *Sudhof* basé sur le système de gènes rapporteurs n'avait pas pour but d'identifier des gènes « cibles » de l'APP mais d'établir une preuve de concept et de principe des propriétés transactivatrices de l'AICD. Depuis, une vingtaine de gènes ont été décrits par une multitude d'approches, essentiellement in vitro dans des modèles de surexpression. La validité de ces cibles reste controversée (Hebert, Serneels et al. 2006, Muller, Concannon et al. 2007, Waldron, Isbert et al. 2008). Nos analyses transcriptomiques réalisées sur des cultures primaires de neurones déficients en APP (neurones APP-/-) en cours de maturation n'ont pas montré de modification dans l'expression des gènes « cibles » potentiels de l'AICD. Nos observations corrèlent avec les récentes données d'analyse

transcriptomique réalisée sur le cerveau de souris APPKO montrant que les changements d'expression sont peu nombreux et de faibles amplitudes (Aydin, Filippov et al. 2011). Dans cette même étude, aucune modification significative dans l'expression des gènes cibles de l'AICD n'est observée.

Nous avons analysé les données de transcriptome plus en détail par des outils de hiérarchisation et de regroupement des gènes dont l'expression est modifiée à bas seuil. Parmi ces regroupements, notre attention s'est portée sur des gènes dont l'expression est contrôlée par l'activité neuronale. Nos principaux résultats montrent que l'invalidation génétique de l'APP diminue l'expression de *Npas4*, et ceci indépendamment de la libération de l'AICD (Chap. II Figure 2B). Plusieurs études, dont les travaux du laboratoire, ont démontré la propriété de l'APP à contrôler l'expression de ses gènes cibles indépendamment du clivage de son domaine intracellulaire. La surexpression de l'APP_{695} holoprotéine inhibe l'expression et l'activité de l'acétylcholinestérase (AchE) (Hicks, Makova et al. 2013), et diminue l'expression de l'HMGCR inhibant l'activité neuronale (Pierrot, Tyteca et al. 2013). *In vitro* et *in vivo*, l'APP endogène régule négativement l'expression du facteur de transcription *Egr1* en modulant l'état d'acétylation des histones H4 de son promoteur (Hendrickx, Pierrot et al. 2013). D'autres gènes précoces comme *c-Fos* et *Arc* se retrouvent également surexprimés dans le cortex préfrontal des souris APPKO (Hendrickx, Pierrot et al. 2014). Ces régulations sont indépendantes de l'AICD mais impliquent des modifications épigénétiques des promoteurs des gènes concernés. L'APP inhibe notamment le recrutement de CREB sur le promoteur d'*Egr1* expliquant notamment l'état d'acétylation réduit des histones H4 dans les neurones APP+/+ et son expression plus importante dans les neurones APP-/-. Par ailleurs, l'APP promeut le recrutment de l'histone déacétylase 2 (HDAC2) sur le promoteur de *c-Fos*. Notons que nos résultats n'ont pas indiqués de modification de l'expression d'*Egr1* dans nos neurones en culture APP-/- comparés aux neurones APP+/+ (Chap. II Figures S2A). Ces discordances apparentes peuvent s'expliquer par des états de différentiation différents (DIV5/cerveau adulte de souris vs DIV7 dans nos études). De plus, *Egr1* a été identifié à l'origine dans une analyse transcriptomique effectuée sur une culture astrocytaires déficients pour

l'APP (APPKO), indiquant une contribution possible des astrocytes dans les régulations transcriptionnelles d'Egr1 dépendantes de l'APP. *Aydin et al.* ont eux observé que l'expression de *c-Fos*, *Arc* et *Egr2* est diminuée dans le cortex préfrontal de souris APPKO (Aydin, Filippov et al. 2011). L'ensemble de ces données indiquent que les gènes précoces, dont l'expression très sensibles au contexte, peut varier dans des sens opposés en absence d'APP, mais néanmoins dans toutes ces observations l'absence d'APP modifie l'expression de gènes précoces étroitement associés à l'activité neuronale et à la plasticité synaptique tels que *Npas4*, *Egr1*, *Fos* et *Arc*. De plus, elles soulignent la complexité inhérente de l'identification des gènes cibles contrôlées par l'APP aussi bien dans les modèles *in vitro* (cultures cellulaires) qu'*in vivo* (tissus). Les conditions de culture neuronale, l'état de maturation des neurones, l'âge des souris, la région cérébrale étudiée, … sont quelques paramètres qui ont une importance cruciale dans les résultats obtenus et comptent pour beaucoup dans les divergences des résultats observés dans la litttérature.

Nous avons récemment montré que la surexpression de l'APP dans les neurones en cultures et *in vivo* dans le cortex postnatal diminue l'expression de KCC2 (Doshina, Gourgue et al. 2017), un symporteur potassique. Les mécanismes associés à ces régulations ne sont pas encore connus mais pourraient indiquer la capacité de l'APP à signaliser indépendamment de l'AICD. Des données indiquent que l'APP peut s'associer via son domaine intracellulaire à des protéines G et induire la signalisation de la voie PKA (Nishimoto, Okamoto et al. 1993, Deyts, Clutter et al. 2016). Le rôle de récepteur membranaire de l'APP est séduisant mais ses ligands et les voies de signalisations qu'il recrute ne sont pas encore clairement établis. Ces régulations pourraient impliquer des fragments autres que l'AICD issus du métabolisme de l'APP. Parmi ceux-ci, le sAPPα est associé à de nombreuses fonctions de l'APP dans le système nerveux central. Son rôle est étroitement associé à la fonction synaptique et à la neuroprotection (Muller, Deller et al. 2017). D'ailleurs, des souris knock-in pour le sAPPα montrent une restauration de la plupart des phénotypes observés chez les souris APPKO (Ring, Weyer et al. 2007). Nous avons montré que l'expression de *Npas4* est induite par le sAPPα, mais uniquement dans les neurones APP+/+ (Chap. II

Figure 2D). Ces données semblent cohérentes avec celles montrant que le sAPPα est capable de réguler l'expression de différents gènes neuroprotecteurs (ex : Transthyretin, Insulin growth factor 2) (Stein, T.D. 2004) et de facteurs de transcriptions (ex : Jun B, Egr1, Fos) in vivo (Ryan, Morris et al. 2013). D'après nos observations, l'action du sAPPα sur l'expression de *Npas4* nécessite la présence de l'APP holoprotéine. Une première hypothèse impliquerait l'association directe du sAPPα et de l'APP holoprotéine présent à la membrane. L'APP peut former des homodimères en orientation *cis* et *trans* (Soba, Eggert et al. 2005), contrôlés par l'ectodomaine et notamment le domaine KPI présent à la jonction des domaines E1 et E2 dans les isoformes longues de l'APP (Ben Khalifa, Tyteca et al. 2012). Expérimentalement, le sAPPα interagit avec l'APP et induit l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt (Milosch, Tanriover et al. 2014) dans les neuroblastomes SH-SY5Y. Cette même voie est impliquée dans l'induction de *Npas4* après stimulation de cellules PC12 avec du Nerve Growth Factor (NGF) (Ooe, Kobayashi et al. 2009) ou après induction de la dépression à long terme induite par le NMDA sur des tranches d'hippocampe de souris (Coba, Valor et al. 2008). Ces observations supportent l'hypothèse que des signalisations associées à l'APP sont contrôlées par le sAPPα. Toutefois, l'hypothèse que le sAPPα via l'activation de la voie PI3K/Akt induit l'expression de *Npas4* reste à être confirmée et confrontée à d'autres hypothèses.

Une deuxième hypothèse impliquerait l'action directe du sAPPα sur la transmission synaptique mais par des mécanismes entièrement inconnus. Le sAPPα produit par l'activité neuronale est connu pour faciliter les courants dépendant des récepteurs du NMDA (Taylor, Ireland et al. 2008). L'activation de ces récepteurs joue un rôle important dans la plasticité synaptique et la mémoire en régulant notamment l'expression de gènes dépendant de l'activité comme *Npas4* (Lin, Bloodgood et al. 2008, Ramamoorthi, Fropf et al. 2011). Ainsi, l'application exogène de sAPPα sur des neurones APP+/+ pourrait faciliter l'activation de ces récepteurs et par conséquent induire l'expression de *Npas4*. L'APP peut interagir directement avec les sous-unités GluN1/GluN2A/GluN2B dans les cellules HEK293 (Cousins, Hoey et al. 2009) et réguler l'expression des sous-unités GluN2B dans les neurones *in vitro*.

Une diminution d'expression d'APP diminue les courants associés aux récepteurs NMDA (Hoe, Fu et al. 2009). Dans les neurones APP-/-, il est probable que la défaillance dans l'expression et la localisation de ces récepteurs empêche l'induction de l'expression de *Npas4* par le sAPPα.

Le rôle de l'APP dans la neurotransmission excitatrice et inhibitrice

Dans le cerveau des personnes saines, l'activité neuronale est finement régulée de manière à la maintenir dans une gamme se situant à l'extrême entre le coma cérébral et l'état de mal épileptique. L'activité neuronale est composée de la neurotransmission dite « excitatrice » (E) et de celle dite « inhibitrice » (I). L'équilibre E/I est primordial pour assurer les fonctions cognitives du cerveau. Il est l'objet d'un rétrocontrôle permanent qui empêche sur le principe une escalade (forward escape) ou une extinction de l'activité des neurones en réseau. Le neurotransmetteur excitateur est le glutamate et le neurotransmetteur inhibiteur majeur est le GABA.

Comme détaillé dans l'introduction, l'APP peut réguler la plasticité synaptique notamment en modifiant la structure des épines dendritiques et l'activité neuronale. Dans les neurones APP-/-, nous avons observé que la réponse glutamatergique, mesurée par des influx de Ca^{2+} intracellulaires, est modérément mais significativement diminuée par rapport aux neurones APP+/+ (Chap. II Figure 6B). Ceci est en accord avec les études précédentes montrant que l'APP modifie la transmission glutamatergique par interaction directe avec différentes sous-unités des récepteurs au glutamate NMDA (Hoe, Fu et al. 2009). Il est donc logique sur cette base que la transmission glutamatergique soit altérée en l'absence d'APP dans les neurones. Au-delà de cet aspect quantitatif de la transmission excitatrice, l'analyse du transcriptome confirmée par qPCR a validé la diminution de la sous-unité 1 du récepteur ionotropique au glutamate de type kaïnate (*Grik1*) dans les neurones APP-/- (Chap. II Figure 7A). Cette diminution est corrélée avec une diminution de la réponse à l'acide kaïnique dans les neurones APP-/-. Les récepteurs au kaïnate (KAR) sont tétramériques et se forment à partir des sous-unités GRIK1 à GRIK5. Ces récepteurs sont associés à des pathologies telles que l'épilepsie, les troubles de l'humeur, le retard mental et la douleur

(Lerma and Marques 2013). Les rôles des KAR restent mal connus mais ils pourraient être impliqués dans le contrôle de l'activité du réseau neuronal en maturation et dans la régulation présynaptique du relargage des neurotransmetteurs (GABA). *Grik1*, exprimé majoritairement sur les interneurones, pourrait être particulièrement impliqué dans l'inhibition d'une activité de fuite vers l'avant (feed-forward) des neurones pyramidaux (Lerma and Marques 2013).

Npas4, la cible transcriptionnelle de l'APP que nous avons étudiée, est un facteur de transcription exprimé uniquement dans les neurones et dont l'expression est induite par l'activité neuronale (Lin, Bloodgood et al. 2008). Des études récentes indiquent que NPAS4 régule l'homéostasie synaptique en régulant la formation des synapses excitatrices et inhibitrices. À la suite de son induction dans les neurones hippocampiques excitateurs, NPAS4 augmente la formation des synapses GABAergiques afférentes (Lin, Bloodgood et al. 2008), et donc augmente l'inhibition des neurones excitateurs. Dans une même logique, réprimer l'expression de *Npas4* dans les neurones exprimant la somatostatine (neurone inhibiteur GABAergique) réduit le nombre de synapses glutamatergiques (Spiegel, Mardinly et al. 2014), ce qui revient ici à diminuer l'activation des neurones excitateurs. Ces données indiquent donc que NPAS4 pourrait être impliqué dans la plasticité homéostatique par le maintien de l'équilibre excitateur/inhibiteur en recrutant des synapses inhibitrices sur les neurones excitateurs et des synapses excitatrices sur les neurones inhibiteurs. Au vu de l'importance de NPAS4 dans le maintien de l'équilibre E/I, nous avons évalué la production des neurotransmetteurs glutamate et GABA dans le milieu de culture des neurones APP-/- et Npas4 Knock-down. La diminution de *Npas4* dans les neurones APP-/- (et Npas4 KD) induit une augmentation de la production de GABA dans le milieu de culture, une augmentation de l'expression de GAD65 et une diminution concomitante de GABARα1 (Chap. II Figures 5 et 8). Ceci peut sembler contraire aux données décrites ci-dessus. Intuitivement, une diminution de *Npas4* aurait dû entrainer une diminution des synapses inhibitrices dans les neurones excitateurs. Ceux-ci représentent vraisemblablement la population majoritaire de nos cultures primaires par extension de données obtenues in vivo où le ratio de neurones excitateurs/

inhibiteurs est de 5/1 (Sahara, Yanagawa et al. 2012). En apparence, cette contradiction pourrait s'expliquer par les différences des modèles utilisés dans ces études et la nôtre. Les cultures primaires de neurones ont été étudiées à des temps de culture in vitro plus longs que les nôtres (9 à 21 jours) et à partir de matériels embryonnaires différents (cortex vs hippocampes). L'état de maturation des neurones utilisés est complètement différent. Dans notre cas, nous avons étudié des neurones embryonnaires dont l'activité électrochimique arrive à maturité contrairement à des neurones complètement matures et fonctionnels du point de vue de la transmission synaptique synchrone et spontanée (Baj, G. et al. 2014) (Baj, Patrizio et al. 2014). Le rôle de NPAS4 pourrait dès lors être différent en fonction du stade de développement des neurones étudiés. *Npas4* est exprimé à partir du 9^{ième} jour embryonnaire chez la souris, et diminuer son expression retarde la différenciation neuronale de cellules ESCs (Klaric, Thomas et al. 2014). Il serait donc intéressant d'évaluer l'expression de *Npas4* et des marqueurs GABAergiques à des temps de culture *in vitro* plus avancés.

Le lien entre la transmission GABAergique et l'APP n'est pas encore totalement élucidé mais de plus en plus de données le confirment. La déficience de plasticité synaptique, de potentialisation à long terme et les déficits de mémoires des souris APPKO pourraient être associés à la diminution de la dépression synaptique dépendante des courants GABAergiques (Dawson, Seabrook et al. 1999, Seabrook, Smith et al. 1999, Senechal, Kelly et al. 2008). D'ailleurs, la délétion conditionnelle de l'APP dans les interneurones inhibiteurs GABAergiques diminue l'inhibition tonique et la fréquence des courrants post-synaptic inhibiteurs (IPSCs) des cellules granulaires du gyrus denté (Wang, Wang et al. 2014). De plus, une diminution de l'expression de GABARα1 dans l'hippocampe (Chen, Wang et al. 2017) et une augmentation du GABA présent dans le cerveau (Lee, Moussa et al. 2010) ont également été rapportées dans les souris APPKO, ce qui suggère que nos résultats seraient pertinents *in vivo*. Durant le développement du cerveau, le neurotransmetteur GABA joue un rôle trophique et promeut l'élongation des neurites via son action sur le récepteur $GABA_AR$ (Represa and Ben-Ari 2005). Cette augmentation de

GABA dans le milieu des neurones APP-/- pourrait dès lors expliquer l'arborescence augmentée de ceux-ci après 7 jours de culture *in vitro*. Il faut ici garder à l'esprit que notre compréhension de la transmission GABAergique a profondément évolué au cours des deux dernières décennies. Identifié à l'origine comme un neuromédiateur inhibiteur, les travaux notamment de l'équipe de Y. Ben-Ari ont montré que le GABA agit comme un neurotransmetteur excitateur au cours du développement, ce qui expliquerait notamment ses effets neurotrophiques.

Nous n'avons pas évalué dans notre étude les conséquences fonctionnelles des changements associés à la transmission GABAergique que nous avons observés. Il n'est pour l'instant pas simple de prédire l'effet net de l'augmentation de neurotransmetteur GABA mesurée en absence d'APP pour plusieurs raisons. Premièrement, l'aspect « inhibiteur » et « excitateur » est rendu complexe au stade de maturation neuronale. La transmission GABAergique au cours du développement du système nerveux change d'un effet « excitateur » vers un effet « inhibiteur » (Ben-Ari 2002). Ce changement est appelé GABA « shift ». Dans une étude de l'équipe, nous avons montré que la surexpression de l'APP humain dans les neurones corticaux affecte ce GABA « shift » en altérant l'expression du co-transporteur au chlore, KCC2 (Doshina, Gourgue et al. 2017). La quantité de neurotransmetteurs GABA augmentée en absence d'APP est concomitante à la diminution de la sous-unité GABARα1 du récepteur ionotrope du GABA. Tout ceci indique que l'altération de la signalisation GABAergique que nous avons mesurée peut se traduire par l'altération d'une transmission encore excitatrice à ce stade ou d'une réversion vers une transmission excitatrice du GABA qu'une surexpression d'APP induirait dans un cerveau. Ce ne sont que des hypothèses mais elles méritent d'être explorées plus en détail.

Implication d'une modification de la transmission GABAergique et de l'expression de Npas4 dans la maladie d'Alzheimer

Bien que le déficit de la neurotransmission excitatrice ait été bien caractérisé dans la maladie d'Alzheimer, l'implication de la neurotransmission GABAergique l'est beaucoup moins. Dans le cortex temporal des patients, la

quantité de glutamate et de GABA est diminuée comparée à celle des individus sains (Gueli and Taibi 2013). La composition des sous-unités des récepteurs au GABA semble également altérée dans le cerveau des patients Alzheimer. Quoiqu'il n'y ait pas de consensus clair, il semblerait que les sous-unités β2/3 soient préservées, que les α1 soient diminuées et que les γ soient surexprimés au niveau cérébral (Govindpani, Calvo-Flores Guzman et al. 2017). Dans le cerveau des patients ainsi que dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer (souris APP/PS1), les terminaisons GABAergiques sont diminuées surtout au niveau des plaques amyloïdes (Garcia-Marin, Blazquez-Llorca et al. 2009). Un déficit de la neurotransmission excitatrice et/ou inhibitrice peut par conséquent induire un déséquilibre E/I souvent associé à plusieurs maladies psychiatriques telles que l'autisme et la schizophrénie, et également à des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. De manière intéressante, les patients Alzheimer développent des crises épileptiques (Friedman, Honig et al. 2012) tout comme de nombreux modèles Alzheimer chez la souris (Palop and Mucke 2009). L'Aβ est bien connu pour son rôle dans le déficit de transmission glutamatergique (Kamenetz, Tomita et al. 2003, Shankar, Bloodgood et al. 2007). Toutefois, l'Aβ ne serait pas le seul contributeur à l'activité anormale des neurones et à la formation des crises épileptiques. Les souris APPKO développent spontanément des crises et sont plus susceptibles à celles-ci que les souris sauvages dans un modèle d'induction à l'acide kaïnique (Steinbach, Muller et al. 1998). De plus, la surexpression de l'APP indépendamment de l'effet Aβ contribuerait à l'apparition de l'hyperexcitabilité neuronale et des crises épileptiques (Born, Kim et al. 2014). Ceci met en exergue le rôle majeur de l'APP dans la formation et le maintien de l'équilibre E/I.

Très peu de données recensent l'implication de *Npas4* dans les maladies neurodégénératives mais son expression diminue dans le cerveau des souris *App*$^{NL-F-G}$ modélisant la maladie d'Alzheimer (Castillo, Leon et al. 2017), de même que dans les souris sauvages présentant une déficience mémorielle liée à l'âge à l'inverse des souris 11β-HSD1 KO préservées de ces mêmes déficits (Qiu, Dunbar et al. 2016). Une étude récente indique un rôle clé de l'expression de *Npas4* dans l'hippocampe lors de la formation de la mémoire

contextuelle (Ramamoorthi, Fropf et al. 2011). De manière très intéressante, l'expression de *Npas4* diminue avec la progression de la maladie d'Alzheimer particulièrement au stade I/II où les DNF se développent dans le cortex trans- et entorhinal (Miyashita, Hatsuta et al. 2014).

Il est évident que nos données obtenues dans un modèle de neurones *in vitro* ne peuvent pas mimer parfaitement les mécanismes physiopathologiques d'un tissu aussi complexe que le cerveau humain. Néanmoins, nous proposons que la modification de l'équilibre entre la neurotransmission excitatrice et inhibitrice pourrait être orchestrée en partie par la perte de fonction de l'APP sur l'expression d'un facteur de transcription dépendant de l'activité (NPAS4). Cela contribuerait à modifier, par des mécanismes encore non élucidés, la transmission GABAergique avec comme effet un déséquilibre E/I qui se révèle être un mécanisme responsable des dysfonctions cognitives dans la maladie d'Alzheimer (Verret, Mann et al. 2012, Palop and Mucke 2016).

Pour conclure

Nos résultats suggèrent que l'APP régule l'expression du facteur de transcription dépendant de l'activité neuronale (Npas4) indépendamment de la libération de l'AICD. La régulation de *Npas4* par l'APP pourrait modifier la balance excitatrice et inhibitrice des neurones et dès lors influencer l'activité neuronale. De futures investigations seront nécessaires pour élucider les mécanismes sous-jacents et l'implication de cette régulation dans le cadre de la formation des synapses (GABAergiques et glutamatergiques) et dans la fonctionalité neuronale. Finalement, la caractérisation de cette régulation *in vivo* dans des modèles animaux et dans le cerveau de patients Alzheimer permettrait de mieux comprendre l'importance de l'équilibre E/I dans les mécanismes pathologiques de la maladie et d'aboutir peut-être à de nouvelles opportunités thérapeutiques.

Bibliographie

Ahmed, T., A. Van der Jeugd, D. Blum, M. C. Galas, R. D'Hooge, L. Buee and D. Balschun (2014). "Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion." Neurobiol Aging **35**(11): 2474-2478.

Ahn, K. W., Y. Joo, Y. Choi, M. Kim, S. H. Lee, S. H. Cha, Y. H. Suh and H. S. Kim (2008). "Swedish amyloid precursor protein mutation increases cell cycle-related proteins in vitro and in vivo." J Neurosci Res **86**(11): 2476-2487.

Allinquant, B., P. Hantraye, P. Mailleux, K. Moya, C. Bouillot and A. Prochiantz (1995). "Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro." J Cell Biol **128**(5): 919-927.

Alonso, A., T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbal and K. Iqbal (2001). "Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6923-6928.

Altmann, A., L. Tian, V. W. Henderson, M. D. Greicius and I. Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2014). "Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease." Ann Neurol **75**(4): 563-573.

Alves da Costa, C., C. Sunyach, R. Pardossi-Piquard, J. Sevalle, B. Vincent, N. Boyer, T. Kawarai, N. Girardot, P. St George-Hyslop and F. Checler (2006). "Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease." J Neurosci **26**(23): 6377-6385.

AlzForum. (2018). "Mutation Database." Retrieved April 10, from https://www.alzforum.org/mutations.

Alzheimer'sAssociation (2017). "Alzheimer's Disease Facts and Figures." Alzheimers Dement **13**: 325-373.

Alzheimer, A. (1907). "Uber eine eigenartige erkrankung der Hirnrinde." Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und phychish-Gerichtliche Medizin **64**: 146-148.

Ando, K., K. I. Iijima, J. I. Elliott, Y. Kirino and T. Suzuki (2001). "Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of beta-amyloid." J Biol Chem **276**(43): 40353-40361.

Andrew, R. J., K. A. Kellett, G. Thinakaran and N. M. Hooper (2016). "A Greek Tragedy: The Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis." J Biol Chem **291**(37): 19235-19244.

Arriagada, P. V., J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte and B. T. Hyman (1992). "Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease." Neurology **42**(3 Pt 1): 631-639.

Asai, M., S. Yagishita, N. Iwata, T. C. Saido, S. Ishiura and K. Maruyama (2011). "An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model." FASEB J **25**(10): 3720-3730.

Ashford, J. W. (2004). "APOE genotype effects on Alzheimer's disease onset and epidemiology." J Mol Neurosci **23**(3): 157-165.

Ashley, J., M. Packard, B. Ataman and V. Budnik (2005). "Fasciclin II signals new synapse formation through amyloid precursor protein and the scaffolding protein dX11/Mint." J Neurosci **25**(25): 5943-5955.

Atwood, C. S., R. N. Martins, M. A. Smith and G. Perry (2002). "Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-beta peptide and associated proteins." Peptides **23**(7): 1343-1350.

Augustinack, J. C., A. Schneider, E. M. Mandelkow and B. T. Hyman (2002). "Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **103**(1): 26-35.

Aydin, D., M. A. Filippov, J. A. Tschape, N. Gretz, M. Prinz, R. Eils, B. Brors and U. C. Muller (2011). "Comparative transcriptome profiling of amyloid precursor protein family members in the adult cortex." BMC Genomics **12**: 160.

Back, S., P. Haas, J. A. Tschape, T. Gruebl, J. Kirsch, U. Muller, K. Beyreuther and S. Kins (2007). "beta-amyloid precursor protein can be transported independent of any sorting signal to the axonal and dendritic compartment." J Neurosci Res **85**(12): 2580-2590.

Baek, S. H., K. A. Ohgi, D. W. Rose, E. H. Koo, C. K. Glass and M. G. Rosenfeld (2002). "Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein." Cell **110**(1): 55-67.

Bibliographie

Baj, G., A. Patrizio, A. Montalbano, M. Sciancalepore and E. Tongiorgi (2014). "Developmental and maintenance defects in Rett syndrome neurons identified by a new mouse staging system in vitro." Front Cell Neurosci **8**: 18.

Ballatore, C., V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2007). "Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders." Nat Rev Neurosci **8**(9): 663-672.

Barbagallo, A. P., R. Weldon, R. Tamayev, D. Zhou, L. Giliberto, O. Foreman and L. D'Adamio (2010). "Tyr(682) in the intracellular domain of APP regulates amyloidogenic APP processing in vivo." PLoS One **5**(11): e15503.

Baumkotter, F., N. Schmidt, C. Vargas, S. Schilling, R. Weber, K. Wagner, S. Fiedler, W. Klug, J. Radzimanowski, S. Nickolaus, S. Keller, S. Eggert, K. Wild and S. Kins (2014). "Amyloid precursor protein dimerization and synaptogenic function depend on copper binding to the growth factor-like domain." J Neurosci **34**(33): 11159-11172.

Beher, D., L. Hesse, C. L. Masters and G. Multhaup (1996). "Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I." J Biol Chem **271**(3): 1613-1620.

Belyaev, N. D., K. A. Kellett, C. Beckett, N. Z. Makova, T. J. Revett, N. N. Nalivaeva, N. M. Hooper and A. J. Turner (2010). "The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a {beta}-secretase-dependent pathway." J Biol Chem **285**(53): 41443-41454.

Belyaev, N. D., N. N. Nalivaeva, N. Z. Makova and A. J. Turner (2009). "Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease." EMBO Rep **10**(1): 94-100.

Ben-Ari, Y. (2002). "Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture." Nat Rev Neurosci **3**(9): 728-739.

Ben Khalifa, N., D. Tyteca, P. J. Courtoy, J. C. Renauld, S. N. Constantinescu, J. N. Octave and P. Kienlen-Campard (2012). "Contribution of Kunitz protease inhibitor and transmembrane domains to amyloid precursor protein homodimerization." Neurodegener Dis **10**(1-4): 92-95.

Ben Khalifa, N., D. Tyteca, C. Marinangeli, M. Depuydt, J. F. Collet, P. J. Courtoy, J. C. Renauld, S. Constantinescu, J. N. Octave and P. Kienlen-Campard (2012). "Structural features of the KPI domain control APP dimerization, trafficking, and processing." FASEB J **26**(2): 855-867.

Bergmans, B. A., S. A. Shariati, R. L. Habets, P. Verstreken, L. Schoonjans, U. Muller, C. G. Dotti and B. De Strooper (2010). "Neurons generated from APP/APLP1/APLP2 triple knockout embryonic stem cells behave normally in vitro and in vivo: lack of evidence for a cell autonomous role of the amyloid precursor protein in neuronal differentiation." Stem Cells **28**(3): 399-406.

Bertrand, E., E. Brouillet, I. Caille, C. Bouillot, G. M. Cole, A. Prochiantz and B. Allinquant (2001). "A short cytoplasmic domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis in vitro and in vivo." Mol Cell Neurosci **18**(5): 503-511.

Biederer, T., X. Cao, T. C. Sudhof and X. Liu (2002). "Regulation of APP-dependent transcription complexes by Mint/X11s: differential functions of Mint isoforms." J Neurosci **22**(17): 7340-7351.

Billnitzer, A. J., I. Barskaya, C. Yin and R. G. Perez (2013). "APP independent and dependent effects on neurite outgrowth are modulated by the receptor associated protein (RAP)." J Neurochem **124**(1): 123-132.

Bittner, T., M. Fuhrmann, S. Burgold, C. K. Jung, C. Volbracht, H. Steiner, G. Mitteregger, H. A. Kretzschmar, C. Haass and J. Herms (2009). "Gamma-secretase inhibition reduces spine density in vivo via an amyloid precursor protein-dependent pathway." J Neurosci **29**(33): 10405-10409.

Blennow, K., N. Mattsson, M. Scholl, O. Hansson and H. Zetterberg (2015). "Amyloid biomarkers in Alzheimer's disease." Trends Pharmacol Sci **36**(5): 297-309.

Borg, J. P., J. Ooi, E. Levy and B. Margolis (1996). "The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein." Mol Cell Biol **16**(11): 6229-6241.

Borg, J. P., Y. Yang, M. De Taddeo-Borg, B. Margolis and R. S. Turner (1998). "The X11alpha protein slows cellular amyloid precursor protein processing and reduces Abeta40 and Abeta42 secretion." J Biol Chem **273**(24): 14761-14766.

Born, H. A., J. Y. Kim, R. R. Savjani, P. Das, Y. A. Dabaghian, Q. Guo, J. W. Yoo, D. R. Schuler, J. R. Cirrito, H. Zheng, T. E. Golde, J. L. Noebels and J. L. Jankowsky (2014).

"Genetic suppression of transgenic APP rescues Hypersynchronous network activity in a mouse model of Alzeimer's disease." J Neurosci **34**(11): 3826-3840.

Braak, E., H. Braak and E. M. Mandelkow (1994). "A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads." Acta Neuropathol **87**(6): 554-567.

Braak, H., I. Alafuzoff, T. Arzberger, H. Kretzschmar and K. Del Tredici (2006). "Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry." Acta Neuropathol **112**(4): 389-404.

Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes." Acta Neuropathol **82**(4): 239-259.

Bray, S. J. (2016). "Notch signalling in context." Nat Rev Mol Cell Biol **17**(11): 722-735.

Cacace, R., K. Sleegers and C. Van Broeckhoven (2016). "Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited." Alzheimers Dement **12**(6): 733-748.

Caille, I., B. Allinquant, E. Dupont, C. Bouillot, A. Langer, U. Muller and A. Prochiantz (2004). "Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone." Development **131**(9): 2173-2181.

Cao, X. and T. C. Sudhof (2001). "A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60." Science **293**(5527): 115-120.

Cao, X. and T. C. Sudhof (2004). "Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation." J Biol Chem **279**(23): 24601-24611.

Castillo, E., J. Leon, G. Mazzei, N. Abolhassani, N. Haruyama, T. Saito, T. Saido, M. Hokama, T. Iwaki, T. Ohara, T. Ninomiya, Y. Kiyohara, K. Sakumi, F. M. LaFerla and Y. Nakabeppu (2017). "Comparative profiling of cortical gene expression in Alzheimer's disease patients and mouse models demonstrates a link between amyloidosis and neuroinflammation." Sci Rep **7**(1): 17762.

Ceglia, I., C. Reitz, J. Gresack, J. H. Ahn, V. Bustos, M. Bleck, X. Zhang, G. Martin, S. M. Simon, A. C. Nairn, P. Greengard and Y. Kim (2015). "APP intracellular domain-WAVE1 pathway reduces amyloid-beta production." Nat Med **21**(9): 1054-1059.

Checler, F. (2001). "The multiple paradoxes of presenilins." J Neurochem **76**(6): 1621-1627.

Chen, A. C. and D. J. Selkoe (2007). "Response to: Pardossi-Piquard et al., "Presenilin-Dependent Transcriptional Control of the Abeta-Degrading Enzyme Neprilysin by Intracellular Domains of betaAPP and APLP." Neuron 46, 541-554." Neuron **53**(4): 479-483.

Chen, F., Y. Gu, H. Hasegawa, X. Ruan, S. Arawaka, P. Fraser, D. Westaway, H. Mount and P. St George-Hyslop (2002). "Presenilin 1 mutations activate gamma 42-secretase but reciprocally inhibit epsilon-secretase cleavage of amyloid precursor protein (APP) and S3-cleavage of notch." J Biol Chem **277**(39): 36521-36526.

Chen, F., H. Hasegawa, G. Schmitt-Ulms, T. Kawarai, C. Bohm, T. Katayama, Y. Gu, N. Sanjo, M. Glista, E. Rogaeva, Y. Wakutani, R. Pardossi-Piquard, X. Ruan, A. Tandon, F. Checler, P. Marambaud, K. Hansen, D. Westaway, P. St George-Hyslop and P. Fraser (2006). "TMP21 is a presenilin complex component that modulates gamma-secretase but not epsilon-secretase activity." Nature **440**(7088): 1208-1212.

Chen, M., J. Wang, J. Jiang, X. Zheng, N. J. Justice, K. Wang, X. Ran, Y. Li, Q. Huo, J. Zhang, H. Li, N. Lu, Y. Wang, H. Zheng, C. Long and L. Yang (2017). "APP modulates KCC2 expression and function in hippocampal GABAergic inhibition." Elife **6**.

Cirrito, J. R., J. E. Kang, J. Lee, F. R. Stewart, D. K. Verges, L. M. Silverio, G. Bu, S. Mennerick and D. M. Holtzman (2008). "Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of amyloid-beta in vivo." Neuron **58**(1): 42-51.

Cirrito, J. R., K. A. Yamada, M. B. Finn, R. S. Sloviter, K. R. Bales, P. C. May, D. D. Schoepp, S. M. Paul, S. Mennerick and D. M. Holtzman (2005). "Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo." Neuron **48**(6): 913-922.

Clarris, H. J., R. Cappai, D. Heffernan, K. Beyreuther, C. L. Masters and D. H. Small (1997). "Identification of heparin-binding domains in the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease by deletion mutagenesis and peptide mapping." J Neurochem **68**(3): 1164-1172.

Coba, M. P., L. M. Valor, M. V. Kopanitsa, N. O. Afinowi and S. G. Grant (2008). "Kinase networks integrate profiles of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated gene expression in hippocampus." J Biol Chem **283**(49): 34101-34107.

Corbo, R. M. and R. Scacchi (1999). "Apolipoprotein E (APOE) allele distribution in the world. Is APOE*4 a 'thrifty' allele?" Ann Hum Genet **63**(Pt 4): 301-310.

Corder, E. H., A. M. Saunders, N. J. Risch, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, Jr., J. B. Rimmler, P. A. Locke, P. M. Conneally, K. E. Schmader and et al. (1994). "Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease." Nat Genet **7**(2): 180-184.

Cousins, S. L., S. E. Hoey, F. Anne Stephenson and M. S. Perkinton (2009). "Amyloid precursor protein 695 associates with assembled NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors to result in the enhancement of their cell surface delivery." J Neurochem **111**(6): 1501-1513.

Cupers, P., I. Orlans, K. Craessaerts, W. Annaert and B. De Strooper (2001). "The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture." J Neurochem **78**(5): 1168-1178.

Dahms, S. O., S. Hoefgen, D. Roeser, B. Schlott, K. H. Guhrs and M. E. Than (2010). "Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(12): 5381-5386.

Dawson, G. R., G. R. Seabrook, H. Zheng, D. W. Smith, S. Graham, G. O'Dowd, B. J. Bowery, S. Boyce, M. E. Trumbauer, H. Y. Chen, L. H. Van der Ploeg and D. J. Sirinathsinghji (1999). "Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein." Neuroscience **90**(1): 1-13.

de Duve, C., T. de Barsy, B. Poole, A. Trouet, P. Tulkens and F. Van Hoof (1974). "Commentary. Lysosomotropic agents." Biochem Pharmacol **23**(18): 2495-2531.

De Strooper, B., T. Iwatsubo and M. S. Wolfe (2012). "Presenilins and gamma-secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(1): a006304.

Deane, R., A. Sagare, K. Hamm, M. Parisi, S. Lane, M. B. Finn, D. M. Holtzman and B. V. Zlokovic (2008). "apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain." J Clin Invest **118**(12): 4002-4013.

Decock, M., L. El Haylani, S. Stanga, I. Dewachter, J. N. Octave, S. O. Smith, S. N. Constantinescu and P. Kienlen-Campard (2015). "Analysis by a highly sensitive split

luciferase assay of the regions involved in APP dimerization and its impact on processing." FEBS Open Bio **5**: 763-773.

Decock, M., S. Stanga, J. N. Octave, I. Dewachter, S. O. Smith, S. N. Constantinescu and P. Kienlen-Campard (2016). "Glycines from the APP GXXXG/GXXXA Transmembrane Motifs Promote Formation of Pathogenic Abeta Oligomers in Cells." Front Aging Neurosci **8**: 107.

Demars, M. P., A. Bartholomew, Z. Strakova and O. Lazarov (2011). "Soluble amyloid precursor protein: a novel proliferation factor of adult progenitor cells of ectodermal and mesodermal origin." Stem Cell Res Ther **2**(4): 36.

Deyts, C., M. Clutter, S. Herrera, N. Jovanovic, A. Goddi and A. T. Parent (2016). "Loss of presenilin function is associated with a selective gain of APP function." Elife **5**.

Dixit, R., J. L. Ross, Y. E. Goldman and E. L. Holzbaur (2008). "Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau." Science **319**(5866): 1086-1089.

Donovan, M. H., U. Yazdani, R. D. Norris, D. Games, D. C. German and A. J. Eisch (2006). "Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease." J Comp Neurol **495**(1): 70-83.

Doshina, A. (2017). Cortical cells reveal APP as a new player in the regulation of GABAergic neurotransmission. PhD in Biomedical and pharmaceutical sciences, Université catholique de Louvain.

Doshina, A., F. Gourgue, M. Onizuka, R. Opsomer, P. Wang, K. Ando, B. Tasiaux, I. Dewachter, P. Kienlen-Campard, J. P. Brion, P. Gailly, J. N. Octave and N. Pierrot (2017). "Cortical cells reveal APP as a new player in the regulation of GABAergic neurotransmission." Sci Rep **7**(1): 370.

Duce, J. A., A. Tsatsanis, M. A. Cater, S. A. James, E. Robb, K. Wikhe, S. L. Leong, K. Perez, T. Johanssen, M. A. Greenough, H. H. Cho, D. Galatis, R. D. Moir, C. L. Masters, C. McLean, R. E. Tanzi, R. Cappai, K. J. Barnham, G. D. Ciccotosto, J. T. Rogers and A. I. Bush (2010). "Iron-export ferroxidase activity of beta-amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease." Cell **142**(6): 857-867.

Duilio, A., N. Zambrano, A. R. Mogavero, R. Ammendola, F. Cimino and T. Russo (1991). "A rat brain mRNA encoding a transcriptional activator homologous to the DNA binding domain of retroviral integrases." Nucleic Acids Res **19**(19): 5269-5274.

Edbauer, D., M. Willem, S. Lammich, H. Steiner and C. Haass (2002). "Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD)." J Biol Chem **277**(16): 13389-13393.

Eggert, S., K. Paliga, P. Soba, G. Evin, C. L. Masters, A. Weidemann and K. Beyreuther (2004). "The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation." J Biol Chem **279**(18): 18146-18156.

Endres, K., R. Postina, A. Schroeder, U. Mueller and F. Fahrenholz (2005). "Shedding of the amyloid precursor protein-like protein APLP2 by disintegrin-metalloproteinases." FEBS J **272**(22): 5808-5820.

Farrer, L. A., L. A. Cupples, J. L. Haines, B. Hyman, W. A. Kukull, R. Mayeux, R. H. Myers, M. A. Pericak-Vance, N. Risch and C. M. van Duijn (1997). "Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium." JAMA **278**(16): 1349-1356.

Farris, W., S. Mansourian, Y. Chang, L. Lindsley, E. A. Eckman, M. P. Frosch, C. B. Eckman, R. E. Tanzi, D. J. Selkoe and S. Guenette (2003). "Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4162-4167.

Feyt, C., N. Pierrot, B. Tasiaux, J. Van Hees, P. Kienlen-Campard, P. J. Courtoy and J. N. Octave (2007). "Phosphorylation of APP695 at Thr668 decreases gamma-cleavage and extracellular Abeta." Biochem Biophys Res Commun **357**(4): 1004-1010.

Fiore, F., N. Zambrano, G. Minopoli, V. Donini, A. Duilio and T. Russo (1995). "The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein." J Biol Chem **270**(52): 30853-30856.

Fischer, D. F., R. van Dijk, J. A. Sluijs, S. M. Nair, M. Racchi, C. N. Levelt, F. W. van Leeuwen and E. M. Hol (2005). "Activation of the Notch pathway in Down syndrome: cross-talk of Notch and APP." FASEB J **19**(11): 1451-1458.

Flammang, B., R. Pardossi-Piquard, J. Sevalle, D. Debayle, A. S. Dabert-Gay, A. Thevenet, I. Lauritzen and F. Checler (2012). "Evidence that the amyloid-beta protein precursor intracellular domain, AICD, derives from beta-secretase-generated C-terminal fragment." J Alzheimers Dis **30**(1): 145-153.

Freude, K. K., M. Penjwini, J. L. Davis, F. M. LaFerla and M. Blurton-Jones (2011). "Soluble amyloid precursor protein induces rapid neural differentiation of human embryonic stem cells." J Biol Chem **286**(27): 24264-24274.

Friedman, D., L. S. Honig and N. Scarmeas (2012). "Seizures and epilepsy in Alzheimer's disease." CNS Neurosci Ther **18**(4): 285-294.

Fryer, C. J., J. B. White and K. A. Jones (2004). "Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover." Mol Cell **16**(4): 509-520.

Fukumori, A., M. Okochi, S. Tagami, J. Jiang, N. Itoh, T. Nakayama, K. Yanagida, Y. Ishizuka-Katsura, T. Morihara, K. Kamino, T. Tanaka, T. Kudo, H. Tanii, A. Ikuta, C. Haass and M. Takeda (2006). "Presenilin-dependent gamma-secretase on plasma membrane and endosomes is functionally distinct." Biochemistry **45**(15): 4907-4914.

Fukumoto, H., D. L. Rosene, M. B. Moss, S. Raju, B. T. Hyman and M. C. Irizarry (2004). "Beta-secretase activity increases with aging in human, monkey, and mouse brain." Am J Pathol **164**(2): 719-725.

Gao, Y. and S. W. Pimplikar (2001). "The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 14979-14984.

Garcia-Marin, V., L. Blazquez-Llorca, J. R. Rodriguez, S. Boluda, G. Muntane, I. Ferrer and J. Defelipe (2009). "Diminished perisomatic GABAergic terminals on cortical neurons adjacent to amyloid plaques." Front Neuroanat **3**: 28.

Garcia-Osta, A. and C. M. Alberini (2009). "Amyloid beta mediates memory formation." Learn Mem **16**(4): 267-272.

Gekle, M., S. Mildenberger, R. Freudinger and S. Silbernagl (1995). "Endosomal alkalinization reduces Jmax and Km of albumin receptor-mediated endocytosis in OK cells." Am J Physiol **268**(5 Pt 2): F899-906.

Gersbacher, M. T., Z. V. Goodger, A. Trutzel, D. Bundschuh, R. M. Nitsch and U. Konietzko (2013). "Turnover of amyloid precursor protein family members determines their nuclear signaling capability." PLoS One **8**(7): e69363.

Ghetti, B., A. L. Oblak, B. F. Boeve, K. A. Johnson, B. C. Dickerson and M. Goedert (2015). "Invited review: Frontotemporal dementia caused by microtubule-associated protein tau gene (MAPT) mutations: a chameleon for neuropathology and neuroimaging." Neuropathol Appl Neurobiol **41**(1): 24-46.

Ghosal, K., D. L. Vogt, M. Liang, Y. Shen, B. T. Lamb and S. W. Pimplikar (2009). "Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(43): 18367-18372.

Giri, M., M. Zhang and Y. Lu (2016). "Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status." Clin Interv Aging **11**: 665-681.

Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-890.

Goiran, T., E. Duplan, M. Chami, A. Bourgeois, W. El Manaa, L. Rouland, J. Dunys, I. Lauritzen, H. You, V. Stambolic, M. G. Biferi, M. Barkats, S. W. Pimplikar, N. Sergeant, M. Colin, V. A. Morais, R. Pardossi-Piquard, F. Checler and C. Alves da Costa (2018). "beta-Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain Controls Mitochondrial Function by Modulating Phosphatase and Tensin Homolog-Induced Kinase 1 Transcription in Cells and in Alzheimer Mice Models." Biol Psychiatry **83**(5): 416-427.

Goldgaber, D., M. I. Lerman, O. W. McBride, U. Saffiotti and D. C. Gajdusek (1987). "Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease." Science **235**(4791): 877-880.

Goodger, Z. V., L. Rajendran, A. Trutzel, B. M. Kohli, R. M. Nitsch and U. Konietzko (2009). "Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway." J Cell Sci **122**(Pt 20): 3703-3714.

Govindpani, K., B. Calvo-Flores Guzman, C. Vinnakota, H. J. Waldvogel, R. L. Faull and A. Kwakowsky (2017). "Towards a Better Understanding of GABAergic Remodeling in Alzheimer's Disease." Int J Mol Sci **18**(8).

Gralle, M., M. G. Botelho and F. S. Wouters (2009). "Neuroprotective secreted amyloid precursor protein acts by disrupting amyloid precursor protein dimers." J Biol Chem **284**(22): 15016-15025.

Grimm, M. O., S. Grosgen, T. L. Rothhaar, V. K. Burg, B. Hundsdorfer, V. J. Haupenthal, P. Friess, U. Muller, K. Fassbender, M. Riemenschneider, H. S. Grimm and T. Hartmann (2011). "Intracellular APP Domain Regulates Serine-Palmitoyl-CoA Transferase Expression and Is Affected in Alzheimer's Disease." Int J Alzheimers Dis **2011**: 695413.

Grimm, M. O., J. Kuchenbecker, T. L. Rothhaar, S. Grosgen, B. Hundsdorfer, V. K. Burg, P. Friess, U. Muller, H. S. Grimm, M. Riemenschneider and T. Hartmann (2011). "Plasmalogen synthesis is regulated via alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase by amyloid precursor protein processing and is affected in Alzheimer's disease." J Neurochem **116**(5): 916-925.

Grimm, M. O., J. Mett, C. P. Stahlmann, V. J. Haupenthal, V. C. Zimmer and T. Hartmann (2013). "Neprilysin and Abeta Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease." Front Aging Neurosci **5**: 98.

Groemer, T. W., C. S. Thiel, M. Holt, D. Riedel, Y. Hua, J. Huve, B. G. Wilhelm and J. Klingauf (2011). "Amyloid precursor protein is trafficked and secreted via synaptic vesicles." PLoS One **6**(4): e18754.

Gu, Y., H. Misonou, T. Sato, N. Dohmae, K. Takio and Y. Ihara (2001). "Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch." J Biol Chem **276**(38): 35235-35238.

Gueli, M. C. and G. Taibi (2013). "Alzheimer's disease: amino acid levels and brain metabolic status." Neurol Sci **34**(9): 1575-1579.

Guenette, S., Y. Chang, T. Hiesberger, J. A. Richardson, C. B. Eckman, E. A. Eckman, R. E. Hammer and J. Herz (2006). "Essential roles for the FE65 amyloid precursor protein-interacting proteins in brain development." EMBO J **25**(2): 420-431.

Guenette, S. Y., J. Chen, P. D. Jondro and R. E. Tanzi (1996). "Association of a novel human FE65-like protein with the cytoplasmic domain of the beta-amyloid precursor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10832-10837.

Guo, Q., H. Li, S. S. Gaddam, N. J. Justice, C. S. Robertson and H. Zheng (2012). "Amyloid precursor protein revisited: neuron-specific expression and highly stable nature of soluble derivatives." J Biol Chem **287**(4): 2437-2445.

Ha, T. Y., K. A. Chang, J. Kim, H. S. Kim, S. Kim, Y. H. Chong and Y. H. Suh (2010). "S100a9 knockdown decreases the memory impairment and the neuropathology in Tg2576 mice, AD animal model." PLoS One **5**(1): e8840.

Haass, C., A. Y. Hung and D. J. Selkoe (1991). "Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion." J Neurosci **11**(12): 3783-3793.

Haass, C., C. Kaether, G. Thinakaran and S. Sisodia (2012). "Trafficking and proteolytic processing of APP." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(5): a006270.

Hage, S., C. Marinangeli, S. Stanga, J. N. Octave, J. Quetin-Leclercq and P. Kienlen-Campard (2014). "Gamma-secretase inhibitor activity of a Pterocarpus erinaceus extract." Neurodegener Dis **14**(1): 39-51.

Halim, A., G. Brinkmalm, U. Ruetschi, A. Westman-Brinkmalm, E. Portelius, H. Zetterberg, K. Blennow, G. Larson and J. Nilsson (2011). "Site-specific characterization of threonine, serine, and tyrosine glycosylations of amyloid precursor protein/amyloid beta-peptides in human cerebrospinal fluid." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(29): 11848-11853.

Hanger, D. P., B. H. Anderton and W. Noble (2009). "Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease." Trends Mol Med **15**(3): 112-119.

Hardy, J. and D. Allsop (1991). "Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease." Trends Pharmacol Sci **12**(10): 383-388.

Hass, M. R. and B. A. Yankner (2005). "A {gamma}-secretase-independent mechanism of signal transduction by the amyloid precursor protein." J Biol Chem **280**(44): 36895-36904.

Hayashi, Y., K. Kashiwagi, J. Ohta, M. Nakajima, T. Kawashima and K. Yoshikawa (1994). "Alzheimer amyloid protein precursor enhances proliferation of neural stem cells from fetal rat brain." Biochem Biophys Res Commun **205**(1): 936-943.

He, G., W. Luo, P. Li, C. Remmers, W. J. Netzer, J. Hendrick, K. Bettayeb, M. Flajolet, F. Gorelick, L. P. Wennogle and P. Greengard (2010). "Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease." Nature **467**(7311): 95-98.

Heber, S., J. Herms, V. Gajic, J. Hainfellner, A. Aguzzi, T. Rulicke, H. von Kretzschmar, C. von Koch, S. Sisodia, P. Tremml, H. P. Lipp, D. P. Wolfer and U. Muller (2000). "Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members." J Neurosci **20**(21): 7951-7963.

Hebert, S. S., L. Serneels, A. Tolia, K. Craessaerts, C. Derks, M. A. Filippov, U. Muller and B. De Strooper (2006). "Regulated intramembrane proteolysis of amyloid precursor protein and regulation of expression of putative target genes." EMBO Rep **7**(7): 739-745.

Hefter, D., M. Kaiser, S. W. Weyer, I. E. Papageorgiou, M. Both, O. Kann, U. C. Muller and A. Draguhn (2016). "Amyloid Precursor Protein Protects Neuronal Network Function after Hypoxia via Control of Voltage-Gated Calcium Channels." J Neurosci **36**(32): 8356-8371.

Hendrickx, A., N. Pierrot, B. Tasiaux, O. Schakman, J. P. Brion, P. Kienlen-Campard, C. De Smet and J. N. Octave (2013). "Epigenetic induction of EGR-1 expression by the amyloid precursor protein during exposure to novelty." PLoS One **8**(9): e74305.

Hendrickx, A., N. Pierrot, B. Tasiaux, O. Schakman, P. Kienlen-Campard, C. De Smet and J. N. Octave (2014). "Epigenetic regulations of immediate early genes expression involved in memory formation by the amyloid precursor protein of Alzheimer disease." PLoS One **9**(6): e99467.

Herms, J., B. Anliker, S. Heber, S. Ring, M. Fuhrmann, H. Kretzschmar, S. Sisodia and U. Muller (2004). "Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members." EMBO J **23**(20): 4106-4115.

Hicks, D. A., N. Z. Makova, N. N. Nalivaeva and A. J. Turner (2013). "Characterisation of acetylcholinesterase release from neuronal cells." Chem Biol Interact **203**(1): 302-308.

Hoe, H. S., Z. Fu, A. Makarova, J. Y. Lee, C. Lu, L. Feng, A. Pajoohesh-Ganji, Y. Matsuoka, B. T. Hyman, M. D. Ehlers, S. Vicini, D. T. Pak and G. W. Rebeck (2009). "The effects of amyloid precursor protein on postsynaptic composition and activity." J Biol Chem **284**(13): 8495-8506.

Hoe, H. S., K. J. Lee, R. S. Carney, J. Lee, A. Markova, J. Y. Lee, B. W. Howell, B. T. Hyman, D. T. Pak, G. Bu and G. W. Rebeck (2009). "Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth." J Neurosci **29**(23): 7459-7473.

Hoefgen, S., I. Coburger, D. Roeser, Y. Schaub, S. O. Dahms and M. E. Than (2014). "Heparin induced dimerization of APP is primarily mediated by E1 and regulated by its acidic domain." J Struct Biol **187**(1): 30-37.

Holsinger, R. M., C. A. McLean, S. J. Collins, C. L. Masters and G. Evin (2004). "Increased beta-Secretase activity in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease subjects." Ann Neurol **55**(6): 898-899.

Holtzman, D. M., K. R. Bales, T. Tenkova, A. M. Fagan, M. Parsadanian, L. J. Sartorius, B. Mackey, J. Olney, D. McKeel, D. Wozniak and S. M. Paul (2000). "Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2892-2897.

Hu, Y., A. C. Hung, H. Cui, E. Dawkins, M. Bolos, L. Foa, K. M. Young and D. H. Small (2013). "Role of cystatin C in amyloid precursor protein-induced proliferation of neural stem/progenitor cells." J Biol Chem **288**(26): 18853-18862.

Huysseune, S., P. Kienlen-Campard, S. Hebert, B. Tasiaux, K. Leroy, O. Devuyst, J. P. Brion, B. De Strooper and J. N. Octave (2009). "Epigenetic control of aquaporin 1 expression by the amyloid precursor protein." FASEB J **23**(12): 4158-4167.

Iijima, K., K. Ando, S. Takeda, Y. Satoh, T. Seki, S. Itohara, P. Greengard, Y. Kirino, A. C. Nairn and T. Suzuki (2000). "Neuron-specific phosphorylation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein by cyclin-dependent kinase 5." J Neurochem **75**(3): 1085-1091.

Ilagan, M. X., S. Lim, M. Fulbright, D. Piwnica-Worms and R. Kopan (2011). "Real-time imaging of notch activation with a luciferase complementation-based reporter." Sci Signal **4**(181): rs7.

Jager, S., S. Leuchtenberger, A. Martin, E. Czirr, J. Wesselowski, M. Dieckmann, E. Waldron, C. Korth, E. H. Koo, M. Heneka, S. Weggen and C. U. Pietrzik (2009). "alpha-secretase mediated conversion of the amyloid precursor protein derived membrane stub C99 to C83 limits Abeta generation." J Neurochem **111**(6): 1369-1382.

Jefferson, T., M. Causevic, U. auf dem Keller, O. Schilling, S. Isbert, R. Geyer, W. Maier, S. Tschickardt, T. Jumpertz, S. Weggen, J. S. Bond, C. M. Overall, C. U. Pietrzik and C. Becker-Pauly (2011). "Metalloprotease meprin beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo." J Biol Chem **286**(31): 27741-27750.

Jiang, S., Y. Li, X. Zhang, G. Bu, H. Xu and Y. W. Zhang (2014). "Trafficking regulation of proteins in Alzheimer's disease." Mol Neurodegener **9**: 6.

Jin, K., V. Galvan, L. Xie, X. O. Mao, O. F. Gorostiza, D. E. Bredesen and D. A. Greenberg (2004). "Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APPSw,Ind) mice." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13363-13367.

Jin, L. W., H. Ninomiya, J. M. Roch, D. Schubert, E. Masliah, D. A. Otero and T. Saitoh (1994). "Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension." J Neurosci **14**(9): 5461-5470.

Jonsson, T., J. K. Atwal, S. Steinberg, J. Snaedal, P. V. Jonsson, S. Bjornsson, H. Stefansson, P. Sulem, D. Gudbjartsson, J. Maloney, K. Hoyte, A. Gustafson, Y. Liu, Y. Lu, T. Bhangale, R. R. Graham, J. Huttenlocher, G. Bjornsdottir, O. A. Andreassen, E. G. Jonsson, A. Palotie, T. W. Behrens, O. T. Magnusson, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, R. J. Watts and K. Stefansson (2012). "A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline." Nature **488**(7409): 96-99.

Jucker, M. and L. C. Walker (2013). "Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases." Nature **501**(7465): 45-51.

Kakuda, N., S. Funamoto, S. Yagishita, M. Takami, S. Osawa, N. Dohmae and Y. Ihara (2006). "Equimolar production of amyloid beta-protein and amyloid precursor protein intracellular domain from beta-carboxyl-terminal fragment by gamma-secretase." J Biol Chem **281**(21): 14776-14786.

Kamenetz, F., T. Tomita, H. Hsieh, G. Seabrook, D. Borchelt, T. Iwatsubo, S. Sisodia and R. Malinow (2003). "APP processing and synaptic function." Neuron **37**(6): 925-937.

Kang, J., H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther and B. Muller-Hill (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." Nature **325**(6106): 733-736.

Kerridge, C., N. D. Belyaev, N. N. Nalivaeva and A. J. Turner (2014). "The Abeta-clearance protein transthyretin, like neprilysin, is epigenetically regulated by the amyloid precursor protein intracellular domain." J Neurochem **130**(3): 419-431.

Kienlen-Campard, P., B. Tasiaux, J. Van Hees, M. Li, S. Huysseune, T. Sato, J. Z. Fei, S. Aimoto, P. J. Courtoy, S. O. Smith, S. N. Constantinescu and J. N. Octave (2008). "Amyloidogenic processing but not amyloid precursor protein (APP) intracellular C-terminal domain production requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GXXXG motifs." J Biol Chem **283**(12): 7733-7744.

Kim, H. S., E. M. Kim, J. P. Lee, C. H. Park, S. Kim, J. H. Seo, K. A. Chang, E. Yu, S. J. Jeong, Y. H. Chong and Y. H. Suh (2003). "C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3beta expression." FASEB J **17**(13): 1951-1953.

Kimberly, W. T., J. B. Zheng, S. Y. Guenette and D. J. Selkoe (2001). "The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner." J Biol Chem **276**(43): 40288-40292.

Kimberly, W. T., J. B. Zheng, T. Town, R. A. Flavell and D. J. Selkoe (2005). "Physiological regulation of the beta-amyloid precursor protein signaling domain by c-Jun N-terminal kinase JNK3 during neuronal differentiation." J Neurosci **25**(23): 5533-5543.

Kimura, T., D. J. Whitcomb, J. Jo, P. Regan, T. Piers, S. Heo, C. Brown, T. Hashikawa, M. Murayama, H. Seok, I. Sotiropoulos, E. Kim, G. L. Collingridge, A. Takashima and K. Cho (2014). "Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **369**(1633): 20130144.

Klaric, T. S., P. Q. Thomas, M. Dottori, W. K. Leong, S. A. Koblar and M. D. Lewis (2014). "A reduction in Npas4 expression results in delayed neural differentiation of mouse embryonic stem cells." Stem Cell Res Ther **5**(3): 64.

Kogel, D., C. G. Concannon, T. Muller, H. Konig, C. Bonner, S. Poeschel, S. Chang, R. Egensperger and J. H. Prehn (2012). "The APP intracellular domain (AICD) potentiates ER stress-induced apoptosis." Neurobiol Aging **33**(9): 2200-2209.

Konietzko, U., Z. V. Goodger, M. Meyer, B. M. Kohli, J. Bosset, D. K. Lahiri and R. M. Nitsch (2010). "Co-localization of the amyloid precursor protein and Notch

intracellular domains in nuclear transcription factories." Neurobiol Aging **31**(1): 58-73.

Kuhn, P. H., H. Wang, B. Dislich, A. Colombo, U. Zeitschel, J. W. Ellwart, E. Kremmer, S. Rossner and S. F. Lichtenthaler (2010). "ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons." EMBO J **29**(17): 3020-3032.

Kume, H., K. Maruyama and F. Kametani (2004). "Intracellular domain generation of amyloid precursor protein by epsilon-cleavage depends on C-terminal fragment by alpha-secretase cleavage." Int J Mol Med **13**(1): 121-125.

Lai, A., A. Gibson, C. R. Hopkins and I. S. Trowbridge (1998). "Signal-dependent trafficking of beta-amyloid precursor protein-transferrin receptor chimeras in madin-darby canine kidney cells." J Biol Chem **273**(6): 3732-3739.

Laird, F. M., H. Cai, A. V. Savonenko, M. H. Farah, K. He, T. Melnikova, H. Wen, H. C. Chiang, G. Xu, V. E. Koliatsos, D. R. Borchelt, D. L. Price, H. K. Lee and P. C. Wong (2005). "BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions." J Neurosci **25**(50): 11693-11709.

Laulagnier, K., C. Javalet, F. J. Hemming, M. Chivet, G. Lachenal, B. Blot, C. Chatellard and R. Sadoul (2018). "Amyloid precursor protein products concentrate in a subset of exosomes specifically endocytosed by neurons." Cell Mol Life Sci **75**(4): 757-773.
LeBlanc, A. C., H. Y. Chen, L. Autilio-Gambetti and P. Gambetti (1991). "Differential APP gene expression in rat cerebral cortex, meninges, and primary astroglial, microglial and neuronal cultures." FEBS Lett **292**(1-2): 171-178.

Lee, K. J., C. E. Moussa, Y. Lee, Y. Sung, B. W. Howell, R. S. Turner, D. T. Pak and H. S. Hoe (2010). "Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines." Neuroscience **169**(1): 344-356.

Lemmon, M. A. and J. Schlessinger (2010). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **141**(7): 1117-1134.

Lerma, J. and J. M. Marques (2013). "Kainate receptors in health and disease." Neuron **80**(2): 292-311.

Lin, Y., B. L. Bloodgood, J. L. Hauser, A. D. Lapan, A. C. Koon, T. K. Kim, L. S. Hu, A. N. Malik and M. E. Greenberg (2008). "Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4." Nature **455**(7217): 1198-1204.

Liu, Q., C. V. Zerbinatti, J. Zhang, H. S. Hoe, B. Wang, S. L. Cole, J. Herz, L. Muglia and G. Bu (2007). "Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1." Neuron **56**(1): 66-78.

Lopez-Sanchez, N., U. Muller and J. M. Frade (2005). "Lengthening of G2/mitosis in cortical precursors from mice lacking beta-amyloid precursor protein." Neuroscience **130**(1): 51-60.

Lu, D. C., S. Rabizadeh, S. Chandra, R. F. Shayya, L. M. Ellerby, X. Ye, G. S. Salvesen, E. H. Koo and D. E. Bredesen (2000). "A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor." Nat Med **6**(4): 397-404.

Lyckman, A. W., A. M. Confaloni, G. Thinakaran, S. S. Sisodia and K. L. Moya (1998). "Post-translational processing and turnover kinetics of presynaptically targeted amyloid precursor superfamily proteins in the central nervous system." J Biol Chem **273**(18): 11100-11106.

Marinangeli, C., B. Tasiaux, R. Opsomer, S. Hage, A. O. Sodero, I. Dewachter, J. N. Octave, S. O. Smith, S. N. Constantinescu and P. Kienlen-Campard (2015). "Presenilin transmembrane domain 8 conserved AXXXAXXXG motifs are required for the activity of the gamma-secretase complex." J Biol Chem **290**(11): 7169-7184.

Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald and K. Beyreuther (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(12): 4245-4249.

McLoughlin, D. M. and C. C. Miller (1996). "The intracellular cytoplasmic domain of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein interacts with phosphotyrosine-binding domain proteins in the yeast two-hybrid system." FEBS Lett **397**(2-3): 197-200.

Mills, J. and P. B. Reiner (1999). "Mitogen-activated protein kinase is involved in N-methyl-D-aspartate receptor regulation of amyloid precursor protein cleavage." Neuroscience **94**(4): 1333-1338.

Milosch, N., G. Tanriover, A. Kundu, A. Rami, J. C. Francois, F. Baumkotter, S. W. Weyer, A. Samanta, A. Jaschke, F. Brod, C. J. Buchholz, S. Kins, C. Behl, U. C. Muller

and D. Kogel (2014). "Holo-APP and G-protein-mediated signaling are required for sAPPalpha-induced activation of the Akt survival pathway." Cell Death Dis **5**: e1391.

Minopoli, G., A. Gargiulo, S. Parisi and T. Russo (2012). "Fe65 matters: new light on an old molecule." IUBMB Life **64**(12): 936-942.

Miyashita, A., H. Hatsuta, M. Kikuchi, A. Nakaya, Y. Saito, T. Tsukie, N. Hara, S. Ogishima, N. Kitamura, K. Akazawa, A. Kakita, H. Takahashi, S. Murayama, Y. Ihara, T. Ikeuchi, R. Kuwano and I. Japanese Alzheimer's Disease Neuroimaging (2014). "Genes associated with the progression of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." Transl Psychiatry **4**: e396.

Mott, R. T. and C. M. Hulette (2005). "Neuropathology of Alzheimer's disease." Neuroimaging Clin N Am **15**(4): 755-765, ix.

Muller, T., C. G. Concannon, M. W. Ward, C. M. Walsh, A. L. Tirniceriu, F. Tribl, D. Kogel, J. H. Prehn and R. Egensperger (2007). "Modulation of gene expression and cytoskeletal dynamics by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD)." Mol Biol Cell **18**(1): 201-210.

Muller, T., H. E. Meyer, R. Egensperger and K. Marcus (2008). "The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease." Prog Neurobiol **85**(4): 393-406.

Muller, T., A. Schrotter, C. Loosse, K. Pfeiffer, C. Theiss, M. Kauth, H. E. Meyer and K. Marcus (2013). "A ternary complex consisting of AICD, FE65, and TIP60 down-regulates Stathmin1." Biochim Biophys Acta **1834**(1): 387-394.

Müller, U. and W. Klemens (2012). Structure and function of the APP Intracellular Domain in Health and Disease. Understanding Alzheimer's Disease. Z. Inga, IntechOpen.

Muller, U. C., T. Deller and M. Korte (2017). "Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family." Nat Rev Neurosci **18**(5): 281-298.

Multhaup, G., A. Schlicksupp, L. Hesse, D. Beher, T. Ruppert, C. L. Masters and K. Beyreuther (1996). "The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I)." Science **271**(5254): 1406-1409.

Munter, L. M., P. Voigt, A. Harmeier, D. Kaden, K. E. Gottschalk, C. Weise, R. Pipkorn, M. Schaefer, D. Langosch and G. Multhaup (2007). "GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42." EMBO J **26**(6): 1702-1712.

Muresan, Z. and V. Muresan (2004). "A phosphorylated, carboxy-terminal fragment of beta-amyloid precursor protein localizes to the splicing factor compartment." Hum Mol Genet **13**(5): 475-488.

Naumann, N., A. Alpar, U. Ueberham, T. Arendt and U. Gartner (2010). "Transgenic expression of human wild-type amyloid precursor protein decreases neurogenesis in the adult hippocampus." Hippocampus **20**(8): 971-979.

Neve, R. L., P. Harris, K. S. Kosik, D. M. Kurnit and T. A. Donlon (1986). "Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2." Brain Res **387**(3): 271-280.

Nikolaev, A., T. McLaughlin, D. D. O'Leary and M. Tessier-Lavigne (2009). "APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases." Nature **457**(7232): 981-989.

Nishimoto, I., T. Okamoto, Y. Matsuura, S. Takahashi, T. Okamoto, Y. Murayama and E. Ogata (1993). "Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o)." Nature **362**(6415): 75-79.

Nitsch, R. M., B. E. Slack, R. J. Wurtman and J. H. Growdon (1992). "Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors." Science **258**(5080): 304-307.

Norton, S., F. E. Matthews, D. E. Barnes, K. Yaffe and C. Brayne (2014). "Potential for primary prevention of Alzheimer's disease: an analysis of population-based data." Lancet Neurol **13**(8): 788-794.

Nunan, J., N. A. Williamson, A. F. Hill, M. F. Sernee, C. L. Masters and D. H. Small (2003). "Proteasome-mediated degradation of the C-terminus of the Alzheimer's disease beta-amyloid protein precursor: effect of C-terminal truncation on production of beta-amyloid protein." J Neurosci Res **74**(3): 378-385.

Ohsawa, I., C. Takamura, T. Morimoto, M. Ishiguro and S. Kohsaka (1999). "Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells." Eur J Neurosci **11**(6): 1907-1913.

Oishi, M., A. C. Nairn, A. J. Czernik, G. S. Lim, T. Isohara, S. E. Gandy, P. Greengard and T. Suzuki (1997). "The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid precursor protein is phosphorylated at Thr654, Ser655, and Thr668 in adult rat brain and cultured cells." Mol Med **3**(2): 111-123.

Ooe, N., K. Kobayashi, K. Motonaga, K. Saito and H. Kaneko (2009). "Dynamic regulation of bHLH-PAS-type transcription factor NXF gene expression and neurotrophin dependent induction of the transcriptional control activity." Biochem Biophys Res Commun **378**(4): 761-765.

Ott, M. O. and S. L. Bullock (2001). "A gene trap insertion reveals that amyloid precursor protein expression is a very early event in murine embryogenesis." Dev Genes Evol **211**(7): 355-357.

Palop, J. J. and L. Mucke (2009). "Epilepsy and cognitive impairments in Alzheimer disease." Arch Neurol **66**(4): 435-440.

Palop, J. J. and L. Mucke (2016). "Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease." Nat Rev Neurosci **17**(12): 777-792.

Pandey, K. N. (2009). "Functional roles of short sequence motifs in the endocytosis of membrane receptors." Front Biosci (Landmark Ed) **14**: 5339-5360.

Pardossi-Piquard, R. and F. Checler (2012). "The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD." J Neurochem **120 Suppl 1**: 109-124.

Pardossi-Piquard, R., A. Petit, T. Kawarai, C. Sunyach, C. Alves da Costa, B. Vincent, S. Ring, L. D'Adamio, J. Shen, U. Muller, P. St George Hyslop and F. Checler (2005). "Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP." Neuron **46**(4): 541-554.

Passer, B., L. Pellegrini, C. Russo, R. M. Siegel, M. J. Lenardo, G. Schettini, M. Bachmann, M. Tabaton and L. D'Adamio (2000). "Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor." J Alzheimers Dis **2**(3-4): 289-301.

Pierrot, N., D. Tyteca, L. D'Auria, I. Dewachter, P. Gailly, A. Hendrickx, B. Tasiaux, L. E. Haylani, N. Muls, F. N'Kuli, A. Laquerriere, J. B. Demoulin, D. Campion, J. P. Brion, P. J. Courtoy, P. Kienlen-Campard and J. N. Octave (2013). "Amyloid precursor protein controls cholesterol turnover needed for neuronal activity." EMBO Mol Med **5**(4): 608-625.

Pimplikar, S. W. and A. Suryanarayana (2011). "Detection of APP intracellular domain in brain tissue." Methods Mol Biol **670**: 85-91.

Prince, M., E. Albanese, M. Gherchet and M. Prina (2014). World Alzheimer Report 2014: Dementia and Risk Reduction, Alzheimer's Disease International (ADI), London.

Prince, M., A. Wimo, M. Gherchet, G.-C. Ali, Y.-T. Wu and M. Prina (2015). World Alzheimer Report 2015: The global impact of Dementia, Alzheimer's Disease International (ADI), London.

Puzzo, D., L. Privitera, E. Leznik, M. Fa, A. Staniszewski, A. Palmeri and O. Arancio (2008). "Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus." J Neurosci **28**(53): 14537-14545.

Qi-Takahara, Y., M. Morishima-Kawashima, Y. Tanimura, G. Dolios, N. Hirotani, Y. Horikoshi, F. Kametani, M. Maeda, T. C. Saido, R. Wang and Y. Ihara (2005). "Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase." J Neurosci **25**(2): 436-445.

Qiu, J., D. R. Dunbar, J. Noble, C. Cairns, R. Carter, V. Kelly, K. E. Chapman, J. R. Seckl and J. L. Yau (2016). "Decreased Npas4 and Arc mRNA Levels in the Hippocampus of Aged Memory-Impaired Wild-Type But Not Memory Preserved 11beta-HSD1 Deficient Mice." J Neuroendocrinol **28**(1).

Raber, J., Y. Huang and J. W. Ashford (2004). "ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology." Neurobiol Aging **25**(5): 641-650.

Rajendran, L., M. Honsho, T. R. Zahn, P. Keller, K. D. Geiger, P. Verkade and K. Simons (2006). "Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(30): 11172-11177.

Ramamoorthi, K., R. Fropf, G. M. Belfort, H. L. Fitzmaurice, R. M. McKinney, R. L. Neve, T. Otto and Y. Lin (2011). "Npas4 regulates a transcriptional program in CA3 required for contextual memory formation." Science **334**(6063): 1669-1675.

Ramelot, T. A., L. N. Gentile and L. K. Nicholson (2000). "Transient structure of the amyloid precursor protein cytoplasmic tail indicates preordering of structure for binding to cytosolic factors." Biochemistry **39**(10): 2714-2725.

Ramelot, T. A. and L. K. Nicholson (2001). "Phosphorylation-induced structural changes in the amyloid precursor protein cytoplasmic tail detected by NMR." J Mol Biol **307**(3): 871-884.

Reinhard, C., M. Borgers, G. David and B. De Strooper (2013). "Soluble amyloid-beta precursor protein binds its cell surface receptor in a cooperative fashion with glypican and syndecan proteoglycans." J Cell Sci **126**(Pt 21): 4856-4861.

Represa, A. and Y. Ben-Ari (2005). "Trophic actions of GABA on neuronal development." Trends Neurosci **28**(6): 278-283.

Ring, S., S. W. Weyer, S. B. Kilian, E. Waldron, C. U. Pietrzik, M. A. Filippov, J. Herms, C. Buchholz, C. B. Eckman, M. Korte, D. P. Wolfer and U. C. Muller (2007). "The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice." J Neurosci **27**(29): 7817-7826.

Robakis, N. K., N. Ramakrishna, G. Wolfe and H. M. Wisniewski (1987). "Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the cerebrovascular and the neuritic plaque amyloid peptides." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(12): 4190-4194.

Robinson, A., S. Grosgen, J. Mett, V. C. Zimmer, V. J. Haupenthal, B. Hundsdorfer, C. P. Stahlmann, Y. Slobodskoy, U. C. Muller, T. Hartmann, R. Stein and M. O. Grimm (2014). "Upregulation of PGC-1alpha expression by Alzheimer's disease-associated pathway: presenilin 1/amyloid precursor protein (APP)/intracellular domain of APP." Aging Cell **13**(2): 263-272.

Roncarati, R., N. Sestan, M. H. Scheinfeld, B. E. Berechid, P. A. Lopez, O. Meucci, J. C. McGlade, P. Rakic and L. D'Adamio (2002). "The gamma-secretase-generated intracellular domain of beta-amyloid precursor protein binds Numb and inhibits Notch signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 7102-7107.

Rossjohn, J., R. Cappai, S. C. Feil, A. Henry, W. J. McKinstry, D. Galatis, L. Hesse, G. Multhaup, K. Beyreuther, C. L. Masters and M. W. Parker (1999). "Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein." Nat Struct Biol **6**(4): 327-331.

Ryan, K. A. and S. W. Pimplikar (2005). "Activation of GSK-3 and phosphorylation of CRMP2 in transgenic mice expressing APP intracellular domain." J Cell Biol **171**(2): 327-335.

Ryan, M. M., G. P. Morris, B. G. Mockett, K. Bourne, W. C. Abraham, W. P. Tate and J. M. Williams (2013). "Time-dependent changes in gene expression induced by secreted amyloid precursor protein-alpha in the rat hippocampus." BMC Genomics **14**: 376.

Sahara, S., Y. Yanagawa, D. D. O'Leary and C. F. Stevens (2012). "The fraction of cortical GABAergic neurons is constant from near the start of cortical neurogenesis to adulthood." J Neurosci **32**(14): 4755-4761.

Saito, Y., Y. Sano, R. Vassar, S. Gandy, T. Nakaya, T. Yamamoto and T. Suzuki (2008). "X11 proteins regulate the translocation of amyloid beta-protein precursor (APP) into detergent-resistant membrane and suppress the amyloidogenic cleavage of APP by beta-site-cleaving enzyme in brain." J Biol Chem **283**(51): 35763-35771.

Salbaum, J. M. and F. H. Ruddle (1994). "Embryonic expression pattern of amyloid protein precursor suggests a role in differentiation of specific subsets of neurons." J Exp Zool **269**(2): 116-127.

Sannerud, R., C. Esselens, P. Ejsmont, R. Mattera, L. Rochin, A. K. Tharkeshwar, G. De Baets, V. De Wever, R. Habets, V. Baert, W. Vermeire, C. Michiels, A. J. Groot, R. Wouters, K. Dillen, K. Vints, P. Baatsen, S. Munck, R. Derua, E. Waelkens, G. S. Basi, M. Mercken, M. Vooijs, M. Bollen, J. Schymkowitz, F. Rousseau, J. S. Bonifacino, G. Van Niel, B. De Strooper and W. Annaert (2016). "Restricted Location of PSEN2/gamma-Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular Abeta Pool." Cell **166**(1): 193-208.

Sano, Y., T. Nakaya, S. Pedrini, S. Takeda, K. Iijima-Ando, K. Iijima, P. M. Mathews, S. Itohara, S. Gandy and T. Suzuki (2006). "Physiological mouse brain Abeta levels are not related to the phosphorylation state of threonine-668 of Alzheimer's APP." PLoS One **1**: e51.

Santos, S. F., N. Pierrot, N. Morel, P. Gailly, C. Sindic and J. N. Octave (2009). "Expression of human amyloid precursor protein in rat cortical neurons inhibits calcium oscillations." J Neurosci **29**(15): 4708-4718.

Sarasa, M., V. Sorribas, J. Terradoa, S. Climent, J. M. Palacios and G. Mengod (2000). "Alzheimer beta-amyloid precursor proteins display specific patterns of expression during embryogenesis." Mech Dev **94**(1-2): 233-236.

Sastre, M., H. Steiner, K. Fuchs, A. Capell, G. Multhaup, M. M. Condron, D. B. Teplow and C. Haass (2001). "Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch." EMBO Rep **2**(9): 835-841.

Sastre, M., R. S. Turner and E. Levy (1998). "X11 interaction with beta-amyloid precursor protein modulates its cellular stabilization and reduces amyloid beta-protein secretion." J Biol Chem **273**(35): 22351-22357.

Sato, T., N. Dohmae, Y. Qi, N. Kakuda, H. Misonou, R. Mitsumori, H. Maruyama, E. H. Koo, C. Haass, K. Takio, M. Morishima-Kawashima, S. Ishiura and Y. Ihara (2003). "Potential link between amyloid beta-protein 42 and C-terminal fragment gamma 49-99 of beta-amyloid precursor protein." J Biol Chem **278**(27): 24294-24301.

Sato, Y., C. Liu, B. S. Wojczyk, A. Kobata, S. L. Spitalnik and T. Endo (1999). "Study of the sugar chains of recombinant human amyloid precursor protein produced by Chinese hamster ovary cells." Biochim Biophys Acta **1472**(1-2): 344-358.

Saura, C. A., S. Y. Choi, V. Beglopoulos, S. Malkani, D. Zhang, B. S. Shankaranarayana Rao, S. Chattarji, R. J. Kelleher, 3rd, E. R. Kandel, K. Duff, A. Kirkwood and J. Shen (2004). "Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration." Neuron **42**(1): 23-36.

Scheinfeld, M. H., E. Ghersi, K. Laky, B. J. Fowlkes and L. D'Adamio (2002). "Processing of beta-amyloid precursor-like protein-1 and -2 by gamma-secretase regulates transcription." J Biol Chem **277**(46): 44195-44201.

Scheinfeld, M. H., S. Matsuda and L. D'Adamio (2003). "JNK-interacting protein-1 promotes transcription of A beta protein precursor but not A beta precursor-like proteins, mechanistically different than Fe65." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1729-1734.

Schilling, S., A. Mehr, S. Ludewig, J. Stephan, M. Zimmermann, A. August, P. Strecker, M. Korte, E. H. Koo, U. C. Muller, S. Kins and S. Eggert (2017). "APLP1 Is a Synaptic Cell Adhesion Molecule, Supporting Maintenance of Dendritic Spines and Basal Synaptic Transmission." J Neurosci **37**(21): 5345-5365.

Schrenk-Siemens, K., S. Perez-Alcala, J. Richter, E. Lacroix, J. Rahuel, M. Korte, U. Muller, Y. A. Barde and M. Bibel (2008). "Embryonic stem cell-derived neurons as a cellular system to study gene function: lack of amyloid precursor proteins APP and APLP2 leads to defective synaptic transmission." Stem Cells **26**(8): 2153-2163.

Schwenk, J., E. Perez-Garci, A. Schneider, A. Kollewe, A. Gauthier-Kemper, T. Fritzius, A. Raveh, M. C. Dinamarca, A. Hanuschkin, W. Bildl, J. Klingauf, M. Gassmann, U. Schulte, B. Bettler and B. Fakler (2016). "Modular composition and dynamics of native GABAB receptors identified by high-resolution proteomics." Nat Neurosci **19**(2): 233-242.

Seabrook, G. R., D. W. Smith, B. J. Bowery, A. Easter, T. Reynolds, S. M. Fitzjohn, R. A. Morton, H. Zheng, G. R. Dawson, D. J. Sirinathsinghji, C. H. Davies, G. L. Collingridge and R. G. Hill (1999). "Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein." Neuropharmacology **38**(3): 349-359.

Senechal, Y., P. H. Kelly and K. K. Dev (2008). "Amyloid precursor protein knockout mice show age-dependent deficits in passive avoidance learning." Behav Brain Res **186**(1): 126-132.

Sergeant, N., J. P. David, D. Champain, A. Ghestem, A. Wattez and A. Delacourte (2002). "Progressive decrease of amyloid precursor protein carboxy terminal fragments (APP-CTFs), associated with tau pathology stages, in Alzheimer's disease." J Neurochem **81**(4): 663-672.

Serneels, L., T. Dejaegere, K. Craessaerts, K. Horre, E. Jorissen, T. Tousseyn, S. Hebert, M. Coolen, G. Martens, A. Zwijsen, W. Annaert, D. Hartmann and B. De Strooper (2005). "Differential contribution of the three Aph1 genes to gamma-secretase activity in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1719-1724.

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

Seubert, P., C. Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, S. Sinha, M. Schlossmacher, J. Whaley, C. Swindlehurst and et al. (1992). "Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids." Nature **359**(6393): 325-327.

Shankar, G. M., B. L. Bloodgood, M. Townsend, D. M. Walsh, D. J. Selkoe and B. L. Sabatini (2007). "Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway." J Neurosci **27**(11): 2866-2875.

Shariati, S. A. and B. De Strooper (2013). "Redundancy and divergence in the amyloid precursor protein family." FEBS Lett **587**(13): 2036-2045.

Shariati, S. A., P. Lau, B. A. Hassan, U. Muller, C. G. Dotti, B. De Strooper and A. Gartner (2013). "APLP2 regulates neuronal stem cell differentiation during cortical development." J Cell Sci **126**(Pt 5): 1268-1277.

Shen, J. and R. J. Kelleher, 3rd (2007). "The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(2): 403-409.

Shu, R., W. Wong, Q. H. Ma, Z. Z. Yang, H. Zhu, F. J. Liu, P. Wang, J. Ma, S. Yan, J. M. Polo, C. C. Bernard, L. W. Stanton, G. S. Dawe and Z. C. Xiao (2015). "APP intracellular domain acts as a transcriptional regulator of miR-663 suppressing neuronal differentiation." Cell Death Dis **6**: e1651.

Small, D. H., V. Nurcombe, G. Reed, H. Clarris, R. Moir, K. Beyreuther and C. L. Masters (1994). "A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth." J Neurosci **14**(4): 2117-2127.

Soba, P., S. Eggert, K. Wagner, H. Zentgraf, K. Siehl, S. Kreger, A. Lower, A. Langer, G. Merdes, R. Paro, C. L. Masters, U. Muller, S. Kins and K. Beyreuther (2005). "Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion." EMBO J **24**(20): 3624-3634.

Spiegel, I., A. R. Mardinly, H. W. Gabel, J. E. Bazinet, C. H. Couch, C. P. Tzeng, D. A. Harmin and M. E. Greenberg (2014). "Npas4 regulates excitatory-inhibitory balance within neural circuits through cell-type-specific gene programs." Cell **157**(5): 1216-1229.

Stamer, K., R. Vogel, E. Thies, E. Mandelkow and E. M. Mandelkow (2002). "Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress." J Cell Biol **156**(6): 1051-1063.

Stanga, S., C. Vrancx, B. Tasiaux, C. Marinangeli, H. Karlstrom and P. Kienlen-Campard (2018). "Specificity of presenilin-1- and presenilin-2-dependent gamma-secretases towards substrate processing." J Cell Mol Med **22**(2): 823-833.

Stanga, S., N. Zanou, E. Audouard, B. Tasiaux, S. Contino, G. Vandermeulen, F. Rene, J. P. Loeffler, F. Clotman, P. Gailly, I. Dewachter, J. N. Octave and P. Kienlen-Campard (2016). "APP-dependent glial cell line-derived neurotrophic factor gene expression drives neuromuscular junction formation." FASEB J **30**(5): 1696-1711.

Steinbach, J. P., U. Muller, M. Leist, Z. W. Li, P. Nicotera and A. Aguzzi (1998). "Hypersensitivity to seizures in beta-amyloid precursor protein deficient mice." Cell Death Differ **5**(10): 858-866.

Steiner, H., R. Fluhrer and C. Haass (2008). "Intramembrane proteolysis by gamma-secretase." J Biol Chem **283**(44): 29627-29631.

Strilic, B., L. Yang, J. Albarran-Juarez, L. Wachsmuth, K. Han, U. C. Muller, M. Pasparakis and S. Offermanns (2016). "Tumour-cell-induced endothelial cell necroptosis via death receptor 6 promotes metastasis." Nature **536**(7615): 215-218.

Su, J. H., B. J. Cummings and C. W. Cotman (1993). "Identification and distribution of axonal dystrophic neurites in Alzheimer's disease." Brain Res **625**(2): 228-237.

Suzuki, T. and T. Nakaya (2008). "Regulation of amyloid beta-protein precursor by phosphorylation and protein interactions." J Biol Chem **283**(44): 29633-29637.

Takahashi, K., T. Niidome, A. Akaike, T. Kihara and H. Sugimoto (2009). "Amyloid precursor protein promotes endoplasmic reticulum stress-induced cell death via C/EBP homologous protein-mediated pathway." J Neurochem **109**(5): 1324-1337.

Takami, M., Y. Nagashima, Y. Sano, S. Ishihara, M. Morishima-Kawashima, S. Funamoto and Y. Ihara (2009). "gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment." J Neurosci **29**(41): 13042-13052.

Tang, T. C., Y. Hu, P. Kienlen-Campard, L. El Haylani, M. Decock, J. Van Hees, Z. Fu, J. N. Octave, S. N. Constantinescu and S. O. Smith (2014). "Conformational changes induced by the A21G Flemish mutation in the amyloid precursor protein lead to increased Abeta production." Structure **22**(3): 387-396.

Tanzi, R. E., J. F. Gusella, P. C. Watkins, G. A. Bruns, P. St George-Hyslop, M. L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D. M. Kurnit and R. L. Neve (1987). "Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus." Science **235**(4791): 880-884.

Taylor, C. J., D. R. Ireland, I. Ballagh, K. Bourne, N. M. Marechal, P. R. Turner, D. K. Bilkey, W. P. Tate and W. C. Abraham (2008). "Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory." Neurobiol Dis **31**(2): 250-260.

Teese, M. G. and D. Langosch (2015). "Role of GxxxG Motifs in Transmembrane Domain Interactions." Biochemistry **54**(33): 5125-5135.

Thal, D. R., U. Rub, M. Orantes and H. Braak (2002). "Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD." Neurology **58**(12): 1791-1800.

Tian, Y., B. Bassit, D. Chau and Y. M. Li (2010). "An APP inhibitory domain containing the Flemish mutation residue modulates gamma-secretase activity for Abeta production." Nat Struct Mol Biol **17**(2): 151-158.

Trazzi, S., V. M. Mitrugno, E. Valli, C. Fuchs, S. Rizzi, S. Guidi, G. Perini, R. Bartesaghi and E. Ciani (2011). "APP-dependent up-regulation of Ptch1 underlies proliferation impairment of neural precursors in Down syndrome." Hum Mol Genet **20**(8): 1560-1573.

Tyan, S. H., A. Y. Shih, J. J. Walsh, H. Maruyama, F. Sarsoza, L. Ku, S. Eggert, P. R. Hof, E. H. Koo and D. L. Dickstein (2012). "Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function." Mol Cell Neurosci **51**(1-2): 43-52.

Vassar, R., P. H. Kuhn, C. Haass, M. E. Kennedy, L. Rajendran, P. C. Wong and S. F. Lichtenthaler (2014). "Function, therapeutic potential and cell biology of BACE proteases: current status and future prospects." J Neurochem **130**(1): 4-28.

Verbeek, M. M., I. Otte-Holler, J. A. Fransen and R. M. de Waal (2002). "Accumulation of the amyloid-beta precursor protein in multivesicular body-like organelles." J Histochem Cytochem **50**(5): 681-690.

Verret, L., E. O. Mann, G. B. Hang, A. M. Barth, I. Cobos, K. Ho, N. Devidze, E. Masliah, A. C. Kreitzer, I. Mody, L. Mucke and J. J. Palop (2012). "Inhibitory

interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model." Cell **149**(3): 708-721.

Villemagne, V. L., K. E. Pike, G. Chetelat, K. A. Ellis, R. S. Mulligan, P. Bourgeat, U. Ackermann, G. Jones, C. Szoeke, O. Salvado, R. Martins, G. O'Keefe, C. A. Mathis, W. E. Klunk, D. Ames, C. L. Masters and C. C. Rowe (2011). "Longitudinal assessment of Abeta and cognition in aging and Alzheimer disease." Ann Neurol **69**(1): 181-192.

Vingtdeux, V., M. Hamdane, S. Begard, A. Loyens, A. Delacourte, J. C. Beauvillain, L. Buee, P. Marambaud and N. Sergeant (2007). "Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation." Neurobiol Dis **25**(3): 686-696.

Vingtdeux, V., M. Hamdane, M. Gompel, S. Begard, H. Drobecq, A. Ghestem, M. E. Grosjean, V. Kostanjevecki, P. Grognet, E. Vanmechelen, L. Buee, A. Delacourte and N. Sergeant (2005). "Phosphorylation of amyloid precursor carboxy-terminal fragments enhances their processing by a gamma-secretase-dependent mechanism." Neurobiol Dis **20**(2): 625-637.

Vingtdeux, V., M. Hamdane, A. Loyens, P. Gele, H. Drobeck, S. Begard, M. C. Galas, A. Delacourte, J. C. Beauvillain, L. Buee and N. Sergeant (2007). "Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies." J Biol Chem **282**(25): 18197-18205.

von Koch, C. S., H. Zheng, H. Chen, M. Trumbauer, G. Thinakaran, L. H. van der Ploeg, D. L. Price and S. S. Sisodia (1997). "Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice." Neurobiol Aging **18**(6): 661-669.

von Rotz, R. C., B. M. Kohli, J. Bosset, M. Meier, T. Suzuki, R. M. Nitsch and U. Konietzko (2004). "The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor." J Cell Sci **117**(Pt 19): 4435-4448.

Waldron, E., S. Isbert, A. Kern, S. Jaeger, A. M. Martin, S. S. Hebert, C. Behl, S. Weggen, B. De Strooper and C. U. Pietrzik (2008). "Increased AICD generation does not result in increased nuclear translocation or activation of target gene transcription." Exp Cell Res **314**(13): 2419-2433.

Wang, B., Z. Wang, L. Sun, L. Yang, H. Li, A. L. Cole, J. Rodriguez-Rivera, H. C. Lu and H. Zheng (2014). "The amyloid precursor protein controls adult hippocampal neurogenesis through GABAergic interneurons." J Neurosci **34**(40): 13314-13325.

Wang, Y. and Y. Ha (2004). "The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain." Mol Cell **15**(3): 343-353.

Wang, Y. and E. Mandelkow (2016). "Tau in physiology and pathology." Nat Rev Neurosci **17**(1): 5-21.

Wang, Z., B. Wang, L. Yang, Q. Guo, N. Aithmitti, Z. Songyang and H. Zheng (2009). "Presynaptic and postsynaptic interaction of the amyloid precursor protein promotes peripheral and central synaptogenesis." J Neurosci **29**(35): 10788-10801.

Weidemann, A., S. Eggert, F. B. Reinhard, M. Vogel, K. Paliga, G. Baier, C. L. Masters, K. Beyreuther and G. Evin (2002). "A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing." Biochemistry **41**(8): 2825-2835.

Weidemann, A., G. Konig, D. Bunke, P. Fischer, J. M. Salbaum, C. L. Masters and K. Beyreuther (1989). "Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein." Cell **57**(1): 115-126.

Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo and M. W. Kirschner (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(5): 1858-1862.

Weyer, S. W., M. Zagrebelsky, U. Herrmann, M. Hick, L. Ganss, J. Gobbert, M. Gruber, C. Altmann, M. Korte, T. Deller and U. C. Muller (2014). "Comparative analysis of single and combined APP/APLP knockouts reveals reduced spine density in APP-KO mice that is prevented by APPsalpha expression." Acta Neuropathol Commun **2**: 36.

Wiley, J. C., M. Hudson, K. C. Kanning, L. C. Schecterson and M. Bothwell (2005). "Familial Alzheimer's disease mutations inhibit gamma-secretase-mediated liberation of beta-amyloid precursor protein carboxy-terminal fragment." J Neurochem **94**(5): 1189-1201.

Wiley, J. C., E. A. Smith, M. P. Hudson, W. C. Ladiges and M. Bothwell (2007). "Fe65 stimulates proteolytic liberation of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain." J Biol Chem **282**(46): 33313-33325.

Willem, M., S. Tahirovic, M. A. Busche, S. V. Ovsepian, M. Chafai, S. Kootar, D. Hornburg, L. D. Evans, S. Moore, A. Daria, H. Hampel, V. Muller, C. Giudici, B. Nuscher, A. Wenninger-Weinzierl, E. Kremmer, M. T. Heneka, D. R. Thal, V.

Giedraitis, L. Lannfelt, U. Muller, F. J. Livesey, F. Meissner, J. Herms, A. Konnerth, H. Marie and C. Haass (2015). "eta-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus." Nature **526**(7573): 443-447.

Xiong, M., O. D. Jones, K. Peppercorn, S. M. Ohline, W. P. Tate and W. C. Abraham (2017). "Secreted amyloid precursor protein-alpha can restore novel object location memory and hippocampal LTP in aged rats." Neurobiol Learn Mem **138**: 291-299.

Xu, X., H. Zhou and T. G. Boyer (2011). "Mediator is a transducer of amyloid-precursor-protein-dependent nuclear signalling." EMBO Rep **12**(3): 216-222.

Yaffe, K., M. Haan, A. Byers, C. Tangen and L. Kuller (2000). "Estrogen use, APOE, and cognitive decline: evidence of gene-environment interaction." Neurology **54**(10): 1949-1954.

Yang, L., Z. Wang, B. Wang, N. J. Justice and H. Zheng (2009). "Amyloid precursor protein regulates Cav1.2 L-type calcium channel levels and function to influence GABAergic short-term plasticity." J Neurosci **29**(50): 15660-15668.

Yang, Z., B. H. Cool, G. M. Martin and Q. Hu (2006). "A dominant role for FE65 (APBB1) in nuclear signaling." J Biol Chem **281**(7): 4207-4214.

Yoshikai, S., H. Sasaki, K. Doh-ura, H. Furuya and Y. Sakaki (1990). "Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene." Gene **87**(2): 257-263.

Young-Pearse, T. L., J. Bai, R. Chang, J. B. Zheng, J. J. LoTurco and D. J. Selkoe (2007). "A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference." J Neurosci **27**(52): 14459-14469.

Young-Pearse, T. L., A. C. Chen, R. Chang, C. Marquez and D. J. Selkoe (2008). "Secreted APP regulates the function of full-length APP in neurite outgrowth through interaction with integrin beta1." Neural Dev **3**: 15.

Yu, C., S. H. Kim, T. Ikeuchi, H. Xu, L. Gasparini, R. Wang and S. S. Sisodia (2001). "Characterization of a presenilin-mediated amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment gamma. Evidence for distinct mechanisms involved in gamma -secretase processing of the APP and Notch1 transmembrane domains." J Biol Chem **276**(47): 43756-43760.

Zambrano, N., G. Minopoli, P. de Candia and T. Russo (1998). "The Fe65 adaptor protein interacts through its PID1 domain with the transcription factor CP2/LSF/LBP1." J Biol Chem **273**(32): 20128-20133.

Zhang, Y. W., R. Wang, Q. Liu, H. Zhang, F. F. Liao and H. Xu (2007). "Presenilin/gamma-secretase-dependent processing of beta-amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(25): 10613-10618.

Zhang, Z., M. Song, X. Liu, S. Su Kang, D. M. Duong, N. T. Seyfried, X. Cao, L. Cheng, Y. E. Sun, S. Ping Yu, J. Jia, A. I. Levey and K. Ye (2015). "Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease." Nat Commun **6**: 8762.

Zhou, F., K. Gong, B. Song, T. Ma, T. van Laar, Y. Gong and L. Zhang (2012). "The APP intracellular domain (AICD) inhibits Wnt signalling and promotes neurite outgrowth." Biochim Biophys Acta **1823**(8): 1233-1241.

Annexe I : CV scientifique

Informations personnelles :



Nom et prénom : Opsomer Rémi

Nationalité : Belge

Date de naissance : 23/09/1990

Éducation :

Date : Octobre 2013 – Maintenant

Titre du diplôme : Docteur en sciences biomédicales et pharmaceutiques.

Nom de l'institution : Université catholique de Louvain/Secteur des sciences de la santé.

Titre de la thèse : Transcriptional regulation and neuronal activity controlled by the Amyloid Precursor Protein.

Date : 27/06/2013

Titre du diplôme : Master en sciences biomédicales.

Nom de l'institution : Université catholique de Louvain/Secteur des sciences de la santé.

Titre du mémoire : Etude du rôle de l'interleukine 22 dans des modèles de dermatite de contact

Grade : Grande Distinction

Date : 30/06/2011

Titre du diplôme : Bachelier en sciences biomédicales.

Nom de l'institution : Université catholique de Louvain/Secteur des sciences de la santé.

Grade : Grande distinction

Expériences scientifiques :

Date : Octobre 2013 – Maintenant

Chercheur scientifique (Thèse de doctorat) à ***Institute of Neuroscience (IoNS)*** – Université catholique de Louvain - Bruxelles dans le groupe « Alzheimer dementia group ».

Date : Avril 2013 – Juin 2013

Stage de recherche à la ***Rega Institute for Medical Research***, Katholiek Universiteit Leuven (KUL)- Department of Microbiology and Immunology – in « Immunobiology » group.

Date : Novembre 2011 – Mars 2013

Stage de mémoire à la ***Ludwig Institute for Cancer Research (LICR)*** – Brussels branch – Immunology and signalling.

Publications :

- Amyloid Precursor Protein (APP) controls excitatory/inhibitory synaptic inputs by regulating the transcriptional activator Neuronal PAS Domain Protein 4 (NPAS4). **Rémi Opsomer1**, Sabrina Contino1†, Florian Perrin12†, Bernadette Tasiaux1, Pierre Doyen3, Maxime Vergouts3, Céline Vrancx1, Anna Doshina1, Nathalie Pierrot1, Jean-Noël Octave1, Serena Stanga1, Pascal Kienlen-Campard1*. Front Mol Neurosci. (**In reviewing**).
- Influence of the T43I Mutation on the Transmembrane Structure and g-Secretase Processing of C99. Tang TC, Kienlen-Campard P, Dass S, Hu Y, Perrin F, **Opsomer R**, Van Hees J, Octave JN, Constantinescu SN, Smith SO. (**Submitted**)
- Contribution of the endosomal-lysosomal and proteasomal systems in Amyloid-β Precursor Protein derived fragments processing.

Caroline Evrard, Pascal Kienlen-Campard, **Rémi Opsomer**, Bernadette Tasiaux, Jean-Noël Octave, Luc Buée, Nicolas Sergeant, Valerie Vingtdeux. PLOS One. April 13 (**Submitted**).

- Expression of IL-20-related cytokines in PPD-induced allergic contact dermatitis and their role in a mouse model. Astrid B. Van Belle1, Perrine M. Cochez1, Magali de Heusch1, Lisa Pointner1, **Remi Opsomer2**, Peggy Raynaud1, Younes Achouri1, Emilie Hendrickx1, Pamela Cheou1, Guy Warnier3, Jean-Christophe Renauld1, Marie Baeck4,5 and Laure Dumoutier1. Journal of Investigative dermatology. 2018 March 30 (**Submitted).**
- Constitutive down-regulation of protein kinase C epsilon in hSOD1G93A astrocytes influences mGluR5 signaling and regulation of glutamate uptake. Vergouts M, Doyen PJ, Peeters M, **Opsomer R**, Hermans E. Glia. 2018 Apr;66(4):749-761
- b-Sheet Structure within the Extracellular Domain of C99 Regulates Amyloidogenic Processing. Hu Y, Kienlen-Campard P, Tang TC, Perrin F, **Opsomer R**, Decock M, Pan X, Octave JN, Constantinescu SN, Smith SO. Scientific Reports. 2017 Dec 7;7(1):17159
- PKC epsilon-dependent calcium oscillations associated with metabotropic glutamate receptor 5 prevent agonist-mediated receptor desensitization in astrocytes. Vergouts M, Doyen PJ, Peeters M, **Opsomer R**, Michiels T, Hermans E. J Neurochem. 2017 May;141(3):387-399.
- Cortical cells reveal APP as a new player in the regulation of GABAergic neurotransmission. Doshina A, Gourgue F, Onizuka M, **Opsomer R**, Wang P, Ando K, Tasiaux B, Dewachter I, Kienlen-Campard P, Brion JP, Gailly P, Octave JN, Pierrot N. Sci Rep. 2017 Mar 23;7(1):370.
- Presenilin 2-Dependent Maintenance of Mitochondrial Oxidative Capacity and Morphology. Contino S, Porporato PE, Bird M, Marinangeli C, **Opsomer R**, Sonveaux P, Bontemps F, Dewachter I, Octave JN, Bertrand L, Stanga S, Kienlen-Campard P. Front Physiol. 2017 Oct 12;8:796

- Presenilin transmembrane domain 8 conserved AXXXAXXXG motifs are required for the activity of the γ-secretase complex. Marinangeli C, Tasiaux B*, **Opsomer R***, Hage S, Sodero AO, Dewachter I, Octave JN, Smith SO, Constantinescu SN, Kienlen-Campard P. J Biol Chem. 2015 Mar 13;290(11):7169-84

Annexe II : Publications en collaboration

β-sheet structure within the Extracellular Domain of C99 Regulates Amyloidogenic Processing

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

β-Sheet Structure within the Extracellular Domain of C99 Regulates Amyloidogenic Processing

Received: 12 September 2017
Accepted: 20 November 2017
Published online: 07 December 2017

Yi Hu[1], Pascal Kienlen-Campard[2], Tzu-Chun Tang[1], Florian Perrin[2,3], Rémi Opsomer[2], Marie Decock[2], Xiaoshu Pan[1], Jean-Noel Octave[2], Stefan N. Constantinescu[3] & Steven O. Smith[1]

Familial mutations in C99 can increase the total level of the soluble Aβ peptides produced by proteolysis, as well as the Aβ42/Aβ40 ratio, both of which are linked to the progression of Alzheimer's disease. We show that the extracellular sequence of C99 forms β-sheet structure upon interaction with membrane bilayers. Mutations that disrupt this structure result in a significant increase in Aβ production and, in specific cases, result in an increase in the amount of Aβ42 relative to Aβ40. Fourier transform infrared and solid-state NMR spectroscopic studies reveal a central β-hairpin within the extracellular sequence comprising Y10-E11-V12 and L17-V18-F19 connected by a loop involving H13-H14-Q15. These results suggest how familial mutations in the extracellular sequence influence C99 processing and provide a structural basis for the development of small molecule modulators that would reduce Aβ production.

The amyloid-β precursor protein (APP) is a type I membrane protein with a bulky extracellular domain, a single transmembrane (TM) helix and a relatively short, disordered C terminal tail. It is widely expressed in different cell types, including neurons[1]. APP is processed by the successive cleavage of two proteases. The first cleavage is carried out between its extracellular and TM domains by either α- or β-secretase, generating N-terminal soluble fragments (soluble αAPP or soluble βAPP, respectively) and membrane-anchored C-terminal fragments (α- or β-CTF, respectively). The γ-secretase complex further cleaves the TM domain of the α- and β-CTFs (Fig. 1). Cleavage of the β-CTF (also called C99) generates the amyloid-β (Aβ) peptides with various lengths, with Aβ40 peptide being the most dominant. Among the Aβ peptides, the 42-residue Aβ42 peptide is considered to be the most toxic and prone to aggregation[2,3], and is the principal component of amyloid plaques in AD patients[4].

It is well known that mutations in the extracellular sequence influence cleavage by the β-secretases. There is a cluster of amino acids near the β-secretase cleavage site at Lys595-Ala598 where mutations increase β-secretase cleavage[5,6]. Engineered mutations within this cluster are widely used to enhance the production of Aβ from APP[7]. (In the following, we use the β-CTF numbering, which also coincides with the numbering of the Aβ peptides. Asp1 is the first residue of the β-CTF or Aβ rather than Asp597, which corresponds to substrate numbering based on the APP695 isoform of APP.)

It is perhaps more surprising that mutations in the extracellular sequence also influence the cleavage of the β-CTF within its transmembrane domain by γ-secretase. The extracellular sequence is considerably distant from the γ-secretase cleavage site and is not conserved among different γ-secretase substrates. For example, the A21G (Flemish), E22Q (Dutch), E22G (Arctic), E22K (Italian), and D23N (Iowa) mutations[8–11] in the extracellular sequence have very different effects on APP processing[12] and Aβ peptide degradation[13]. While mutations at Ala21 increase Aβ secretion, mutations at Glu22 and Asp23 generally decrease the level of total secreted Aβ peptides[12,14,15].

[1]Department of Biochemistry and Cell Biology, Stony Brook University, Stony Brook, NY, 11794, USA. [2]Institute of Neuroscience, Université catholique de Louvain, Brussels, 1200, Belgium. [3]Ludwig Institute for Cancer Research and de Duve Institute, Université catholique de Louvain, Brussels, 1200, Belgium. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.N.C. (email: stefan.constantinescu@bru.licr.org) or S.O.S. (email: steven.o.smith@stonybrook.edu)



Figure 1. Sequence and processing of C99. (**A**) Sequence of the extracellular (blue) and transmembrane (green) domains of C99. C99 or the β-CTF corresponds to residues 1–99. The C-terminal three residues of C55 (i.e. the first 55 residues of C99) are shown in purple. The α-, β-, γ- and ε-cleavage sites are shown.

Immediately on the N-terminal side of Ala21 is the L17-V18-F19-F20 sequence. This sequence was previously shown to be part of an inhibitory motif that reduces the production of soluble Aβ peptides upon γ-secretase processing[14]. The level of soluble Aβ increases dramatically upon deletion or mutation of this motif. This increase was observed without a change in ε-cleavage, which produces the free APP intracellular domain (AICD)[14]. Peptides derived from this motif (e.g. Aβ17-21) are able to noncompetitively inhibit cleavage of TM peptides derived from APP suggesting that there is a binding site within the γ-secretase complex distinct from the active site that influences γ-secretase processing.

In contrast to mutation of Ala21 and the LVFF sequence, mutations in the G25-S26-N27-K28 region, which is a few residues downstream of Ala21, reduce the level of secreted Aβ40 and Aβ42. Specifically, mutations at Ser26 and Lys28 lead to a decrease in Aβ40 and Aβ42, without a corresponding loss of the AICD cleavage product, indicating that the mutations do not reduce overall γ-secretase cleavage[16]. Kukar *et al.*[17] found that the K28A/K28Q mutations shift the major cleavage site to the position of Gly33 from Val40. These results suggest that the transition region between the extracellular and TM domains can have a substantial effect on the position of γ-cleavage within the TM domain.

In order to understand how extracellular mutations influence enzymatic cleavage within the TM domain of the β-CTF and/or the release of soluble Aβ, we use Fourier transform infrared (FTIR) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to establish the structure of the extracellular domain of the β-CTF and combine these results with structural and functional studies of extracellular mutants to assess how the substrate structure influences soluble Aβ production. Recently, we were able to show that the inhibitory LVFF sequence of the β-CTF has β-strand secondary structure[18]. Here we demonstrate that the LVFF and upstream YEV sequences associate to form a β-hairpin. We also identify a third β-component at the N-terminus that stabilizes the β-structure of the extracellular domain. A loss of β-structure within the extracellular domain correlates with an increase in secreted Aβ peptides. We then narrow down the elements within the LVFF motif that when mutated are responsible for the β-strand structure and the increase in Aβ secretion.

The increase in soluble Aβ that is observed upon mutation or deletion of the LVFF sequence can result either from an increase in processing of the β-CTF and/or a decrease in binding of the Aβ peptide to the plasma membrane. Previous studies have shown that the LVFF region of the β-CTF can bind to membranes[19] suggesting that this sequence also mediates membrane binding of the cleaved Aβ peptides. To address the location of the LVFF sequence relative to the membrane bilayer, we target Phe19 and Phe20 within this sequence using ^{31}P, ^{13}C rotational-echo double-resonance (REDOR) NMR and fluorescence spectroscopy. REDOR NMR measurements can determine the proximity of ring- ^{13}C-labeled Phe19 and Phe20 side chains to the ^{31}P phosphate of the phospholipid head-groups, while fluorescence measurements on peptides containing either a F19W or F20W mutation can probe membrane binding on the basis of intrinsic tryptophan fluorescence.

Together these studies provide insights into how the extracellular sequence may influence the processing and release of soluble Aβ. The structure and folding of the N-terminal sequence are likely to be relevant not only for the release of the Aβ peptides from the γ-secretase complex, but also for the formation of soluble and membrane-bound Aβ oligomers, both of which are reported to be toxic to neuronal cells.

Results

Role of the Extracellular Sequence in C99 Processing. To address the influence of the extracellular sequence on the processing of the β-CTF (referred to below as C99) to Aβ38, Aβ40 and Aβ42, we mutated the N-terminal residues from Asp1 to Val24 to alanine in groups of 3 or 4 amino acids (Fig. 2). Within the first 12 residues, alanine mutations of the D1-A2-E3 and D7-S8-G9 sequences lead to a reduction in the levels of secreted Aβ38, Aβ40 and Aβ42. In contrast, mutation of the Y10-E11-V12 sequence leads to increases in the secreted Aβ peptides, with the most significant increase in Aβ42. These results indicate that the structure or interactions of the most N-terminal residues of C99 influence γ-secretase processing.

Within the second 12 residues of the C99 sequence, mutation of the H13-H14-Q15-K16 and E22-D23-V24 sequences to alanine results in a slight decrease in the level of soluble Aβ40 and Aβ42 peptides. However, mutation of the intervening L17-V18-F19-F20 sequence results in a significant increase in secreted Aβ40 and Aβ42. Comparison of the mutational results from Asp1 to Val24 clearly shows that the largest influence of mutation occurs at the LVFF sequence, but with unexpected alternation of regions that promote and inhibit amyloidogenic processing.

The increase in the secreted Aβ40 and Aβ42 upon mutation of the extracellular LVFF sequence is due in part to an increase in ε-cleavage at the C-terminus of the TM domain of the β-CTF, which releases the AICD. Measurements of AICD release using a luciferase reporter assay show a significant increase in ε-cleavage in the LVFF-to-AAAA mutant relative to the wild-type sequence and a corresponding increase in AICD[18]. These results indicate the influence of the LVFF-to-AAAA mutation is largely on γ-secretase processing rather than on α- or β-secretase processing[18].

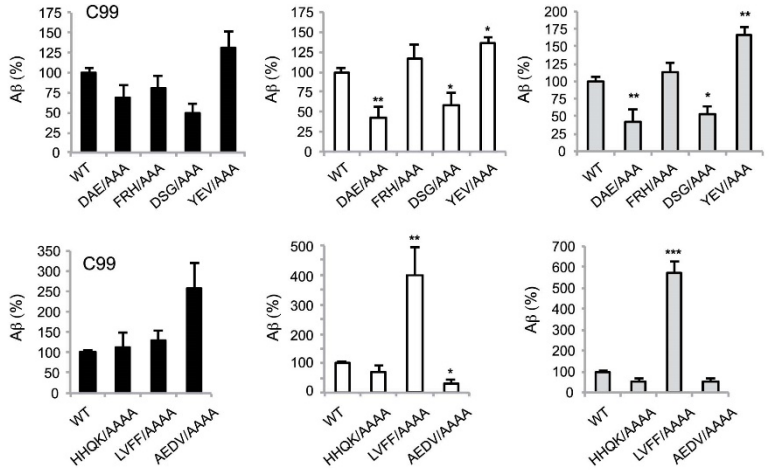


Figure 2. Alanine scanning mutagenesis of the extracellular domain of C99 reveals sequence specific increases and decreases in Aβ production. Comparison of the levels of Aβ38, Aβ40 and Aβ42 produced by γ-secretase cleavage of wild- type β-CTF and the corresponding N terminal alanine mutants. Values are the means ± S.E., $n > 5$; $^{*}p < 0.05$; $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$, compared with control.

Global Secondary Structure of C55 by FTIR Spectroscopy. The C55 peptide corresponds to the first 55 residues of the β-CTF or C99, and encompasses the extracellular sequence, the TM domain and an intracellular cluster of positive charges. This is the minimal sequence containing the entire extracellular and TM domains of C99 needed for γ-secretase processing[18]. The amide I vibration (1600–1700 cm^{-1}) in FTIR spectra is a sensitive marker of protein secondary structure. The FTIR spectrum of C55 reconstituted into membrane bilayers (Fig. 3A) exhibits both an intense band at 1655 cm^{-1} corresponding to α-helical structure and a weaker band at 1626 cm^{-1} corresponding to β-strand or β-sheet structure. The α-helical band represents the membrane-spanning portion of C55 stretching from roughly Lys28 to Leu52 (Fig. 1)[18], while the β-strand or sheet component is associated with the extracellular sequence of C55. We have previously shown that mutation of the LVFF motif resulted in loss of the β-strand component within the extracellular domains of both C55 and C99[18]. The β-strand structure was shown to be consistent with NMR chemical shifts within the LVFF sequence and shown to convert to α-helix in the presence of detergent (Fig. S1). We now probe whether the β-strand structure of the extracellular domain extends to the N-terminus, whether the β-sheet formed is intra- or intermolecular and whether disruption of this sequence correlates with changes in γ-secretase processing.

Figure 3 presents the FTIR spectra of C55 containing alanine mutations stretching from the N-terminal D1-A2-E3 sequence to the E22-D23-V24 sequence just before the TM domain. We observe a loss of the IR band at 1626 cm^{-1} in the LVFF to AAAA mutant (Fig. 3H) as observed previously[18]. However, we also observe loss of the 1626 cm^{-1} band upon mutation of YEV to alanine (Fig. 3E), but not upon mutation of the intervening HHQ sequence (Fig. 3F). We attribute this pattern to the presence of a β-hairpin in which the HHQ sequence forms a loop connecting antiparallel YEV and LVFF β-strands. At the N-terminus, mutation of DAE and FRH appears to broaden the 1626 cm^{-1} band (Fig. 3B and C). IR spectra of parallel samples of the DAE and FRH to AAA mutants (data not shown) reveal variability in the frequency and breadth of the 1626 cm^{-1} band, suggesting that the most N-terminal amino acids interact with the β-hairpin formed by the LVFF and YEV sequences to form a three-stranded β-sheet.

The FTIR measurements showing loss of β-sheet secondary structure in the YEV and LVFF mutants correlates with the processing results in Fig. 2 where mutation of the YEV and LVFF sequences leads to the largest increases in secreted Aβ.

Phe19 and Phe20 are Critical Determinants of the β-Sheet Structure in C99. To better define the residues that control the structure of the extracellular domain, single and double amino acid replacements were performed in the LVFF region of C99 (Fig. 4). Comparison of γ-secretase processing of the wild-type C99 sequence (LVFF) with that of the LVAA and AAFF mutants shows that the F19-F20 dipeptide has a slightly greater contribution to increased production of Aβ40 and Aβ42 than the L17-V18 dipeptide (Fig. 4A). For the F19-F20 dipeptide, the individual mutation of FA or AF results in comparable increases in Aβ40 and Aβ42.

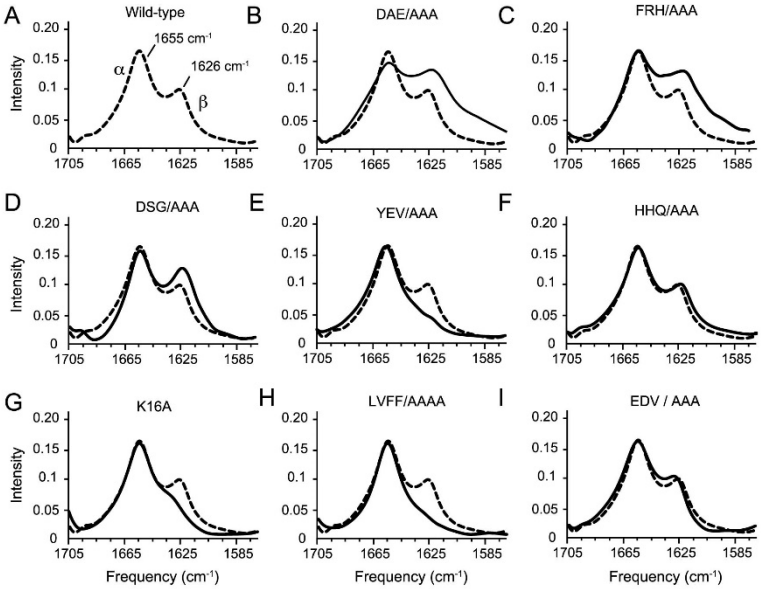


Figure 3. FTIR spectroscopy of wild-type and alanine mutants of C55. Comparison of FTIR spectra of wild-type C55 (**A**) reconstituted into membrane bilayers with spectra of the C55 protein containing alanine mutations at (**B**) DAE, (**C**) FRH, (**D**) DSG, (**E**) YEV, (**F**) HHQ, (**G**) K, (**H**) LVFF, and (**I**) EDV. The bilayers were formed with dimyristoylphosphocholine (DMPC) and dimyristoylphosphoglycerol (DMPG) in a molar ratio of 10:3. The molar ratio of C55:total lipid was 1:50.

Parallel studies were also undertaken on C55, the substrate used for the structural studies (Fig. 4B). For C55, mutation of LVFF to AAAA results in significant increase in secreted Aβ40 and Aβ42. However, with the individual amino acid changes, the F19A mutant leads to more secreted Aβ40 and Aβ42 than the F20A mutant.

FTIR measurements on the single and double mutants within the LVFF motif in C55 were also undertaken (Fig. 5). In comparison with wild-type C55 (LVFF), mutation of FF-to-AA (i.e. LVAA) results in a dramatic decrease in the 1626 cm^{-1} amide I vibrational band, indicating loss of β structure (Fig. 5D). In contrast, the LV-to-AA mutant (i.e. AAFF) behaves more like the wild-type LVFF sequence (Fig. 5C). We next undertook single mutations of the F19-F20 motif and found that the single F19A mutation results in complete loss of β structure (Fig. 5E). The single F20A mutation has a much milder phenotype (Fig. 5F). These data suggest that F19 is critical to the formation of β structure in the extracellular domain of C55.

Phe19 Penetrates into the Membrane Interface. Structural studies undertaken on C99 have shown that the highly hydrophobic LVFF sequence is buried in the hydrophobic region of membranes or micelles[19]. The membrane environment can have a strong influence on the folding of hydrophobic or amphipathic sequences. To address the location of the LVFF sequence relative to the membrane bilayer, we undertook both fluorescence and NMR studies. For the fluorescence measurements, we individually replaced Phe19 and Phe20 with tryptophan, whose fluorescence spectrum is sensitive to its chemical environment.

First, to confirm that the phenylalanine to tryptophan substitution does not disrupt the β-sheet structure in the region of Leu17-A21, FTIR studies were performed on the F19W and F20W mutants reconstituted into the DMPC/DMPG bilayers (Fig. 5G). Both FTIR spectra exhibit the 1626 cm^{-1} marker of β-sheet secondary structure. In contrast, comparison of the fluorescence spectra of the F19W and F20W mutants shows a blue shift and increase in the fluorescence curve from 357 to 346 nm (Fig. 5H) only for F19W. These changes indicate that the environment surrounding Trp19 of C55 is more hydrophobic than for Trp20 and suggest that Phe19 inserts into the head group region of the membrane bilayer, while Phe20 is more exposed to the aqueous hydrophilic environment outside of the bilayer.

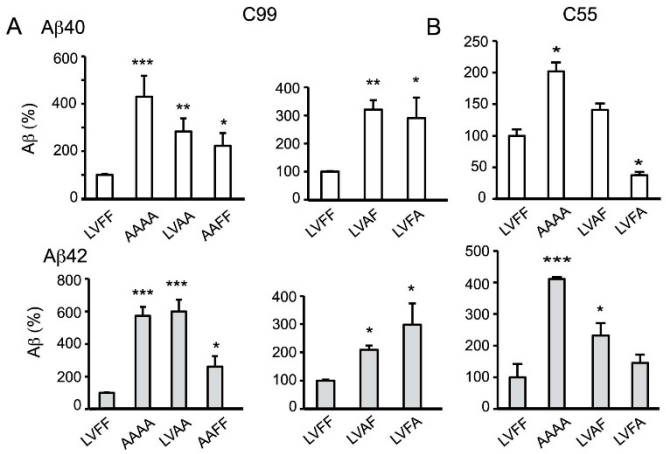


Figure 4. Influence of double and single mutants within the LVFF sequence on γ-secretase processing of C99 (**A**) and C55 (**B**). Values are the means ± S.E., n > 5; *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, compared with control.

NMR spectroscopy provides a second approach for comparing the ability of Phe19 and Phe20 to penetrate into the lipid headgroup region of the membrane bilayer. In the NMR experiments, we specifically label the Phe19 and Phe20 rings with ^{13}C and measure their proximity to the ^{31}P phosphate groups of the phospholipids via ^{13}C-to-^{31}P dipolar couplings using rotational echo double resonance (REDOR) NMR difference spectroscopy. The REDOR difference spectrum exhibits intensity changes when the ^{13}C resonances of specifically ^{13}C-labeled residues are within ~ 6–7 Å of a ^{31}P phosphate[20]. Figure 5I compares the REDOR difference spectrum of C55 labeled with ring-^{13}C-Phe19 with the REDOR difference spectrum of C55 labeled with ring-^{13}C-Phe20. The strong intensity observed in the Phe19 ring-^{13}C resonances in Fig. 5I is consistent with insertion of the Phe19 ring into the lipid head group region of the bilayer.

It is well known that the Aβ peptides bind to membrane bilayers[21] and it is generally assumed that the binding is mediated by the hydrophobic C-terminal sequence. The observation that extracellular sequence of C55 binds to membrane bilayers raises the possibility that this sequence contributes to membrane binding in the context of the Aβ peptides. If this is correct, then the LVFF-to-AAAA mutation may reduce membrane binding and lead to an increase in soluble Aβ as in Figs 2 and 3. FTIR experiments on Aβ40 and A342 show that the Aβ peptide rapidly adopts stable anti-parallel β-structure when added to a solution of large (100 nm diameter) unilamellar vesicles composed of DMPC (Fig. S2). Mutation of LVFF to AAAA results in Aβ40 and Aβ42 peptides with largely random coil structure, and decreases the ability of these peptides to bind to DMPC membrane bilayers (Fig. S3).

Extracellular β-Sheet of C55 is Stabilized by Intramolecular Interactions. The structural and functional data described above suggest that the Y10-E11-V12 and L17-V18-F19 sequences form anti-parallel β-strands that associate to yield the observed β-hairpin structure. The antiparallel geometry is consistent with the weak 1695 cm^{-1} band in the wild-type spectrum, as well as isotope-induced shifts upon ^{13}C labeling[18]. The H13-H14-Q15 to AAA mutation does not influence the wild-type structure, suggesting that it acts as a linker between the anti-parallel β strands. The C-terminal β-strand may start as early as Lys16, as the K16A mutation does disrupt the β structure (Fig. 3G). Since the side-chain orientation alternates by 180° in β-sheet structure, this suggests that Lys16, Val18 and Phe20 would lie on one side of the β-sheet, while Leu17 and Phe19 would lie on the other (and inserted into the headgroup region of the membrane). This further suggests that Tyr10 and Val12 are also inserted into the headgroup region of the bilayer while Glu11 is oriented away. The C55 D1-A2-E3 and F4-R5-H6 to AAA mutations both appear to generate more heterogeneity in the β structure as evidenced by the broadened amide I vibrations at 1626 cm^{-1} (Fig. 2B,C). In contrast, the D7-S8-G9 to alanine mutant peptide has an FTIR spectrum resembling wild-type (Fig. 2D), arguing that it has a role in bridging the N-terminus and the downstream β components. The mutations of D1-A2-E3 and F4-R5-H6 to alanine have the effect of increasing the overall hydrophobicity of these segments. One possibility is that these now newly generated hydrophobic segments interact with the hydrophobic LVFF sequence and further stabilize its structure. This would lead to the decrease in the amount of soluble Aβ observed in Fig. 2. These data suggest that the N-terminus only partially stabilizes the β-sheet structure, and that changes in this region either by mutation or by other interacting molecules might be able to prevent amyloidogenic processing.

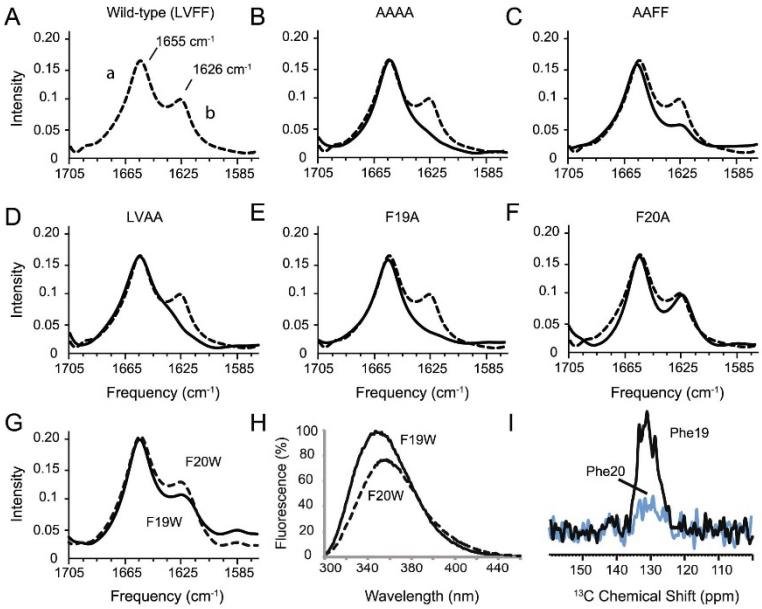


Figure 5. Contribution of Phe19 and Phe20 to β-sheet structure and membrane binding using single alanine mutants of C55. Comparison of FTIR spectra of wild-type C55 (**A**) reconstituted into DMPC:DMPG bilayers with spectra of the C55 protein containing mutations at (**B**) LVFF, (**C**) LV, (**D**) FF, (**E**) Phe19 and (**F**) Phe20. The molar ratio of the DMPC:DMPG was 10:3, and the molar ratio of C55:total lipid was 1:50. (**G**) Membrane penetration of Phe19 and Phe20 shows differences in the orientation of the LVFF phenylalanines. Comparison of FTIR spectra of wild-type C55 with C55 containing either the F19W (black) and F20W (dashed line) mutations shows that the mutations do not influence the C55 secondary structure. (**H**) Tryptophan fluorescence of F19W (black) and F20W (dashed line) C55. The fluorescence spectra were obtained with a 200:1 lipid to protein molar ratio. Experiments with 300:1 and 100:1 gave similar results. (**I**) ^{13}C-^{31}P REDOR NMR NMR measurements reveal membrane insertion of Phe19 within the LVFF sequence. ^{13}C-observe, ^{31}P-dephase REDOR spectra were obtained of wild-type C55 containing ^{13}C-ring labeled Phe19 (solid-line) or ^{13}C-ring labeled Phe20 (blue) reconstituted into DMPC:DMPG (10:3 molar ratio) bilayers.

A model based on the FTIR and REDOR NMR data with the short three-residue LVF and YEV sequences as interacting β-strands with Phe19 oriented toward the lipid membrane is shown in Fig. 6. To test this model, two dimensional (2D) ^{13}C dipolar assisted rotational resonance (DARR) NMR experiments were carried out on C55 labeled with $^{13}C\zeta$-Tyr10, $^{13}C1$-Val12, $^{13}C\alpha$ -Leu17 and ^{13}C-ring-Phe19. As in the REDOR experiment, $^{13}C\ldots{}^{13}C$ distances are obtained through measurements of dipolar couplings. The resonances along the diagonal of the 2D plot correspond to the one-dimensional (1D) NMR spectrum. Off-diagonal cross peaks arise from ^{13}C sites that are separated in space by less than ~6 Å. A portion of the 2D DARR NMR spectrum of membrane-bound C55 is shown in Fig. 6A. Cross peaks are observed between $^{13}C1$-Val12 and $^{13}C\alpha$-Leu17, as well as between $^{13}C\zeta$-Tyr10 and ^{13}C-ring Phe19 consistent with the intra-molecular β-sheet formation within the extracellular N-terminus of C55.

The possibility arises that the KLVFFAE sequence on different peptides can pair together to form anti-parallel β-strands[22]. To verify that the LVFF and YEV sequences form an intra- rather than inter-molecular β-sheet structure, we introduced the E22K mutation into C55. If the inter-molecular β-sheet structure is correct, disrupting the salt bridge between Glu22 and Lys16 from the opposing strands might potentially dissociate the β-sheet structure. The FTIR spectrum of E22K shows that the β-sheet structure is not only conserved upon E22K mutation, but the intensity of the β-sheet signature band at around 1626 cm^{-1} is enhanced, suggesting a more stable anti-parallel β-sheet (Fig. S4). The increase in β-sheet structure in the E22K mutant is consistent with mutational studies at Glu22 and Asp23 that generally reveal a decrease in total secreted Aβ peptides upon mutation[12,14,15].

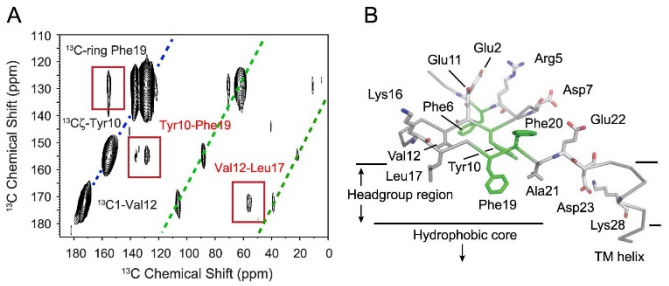


Figure 6. Structure of the extracellular sequence of C55. (**A**) Solid-state DARR NMR of intra-residue contacts between Val12 - Leu17 and Tyr10 - Phe19. The C55 peptide labeled with ^{13}Cζ-Tyr10, ^{13}C1-Val12, ^{13}Cα-Leu17 and ^{13}C-ring-Phe19 was reconstituted into DMPC:DMPG bilayers as previously described[18]. (**B**) Model of the C55 extracellular region based on FTIR and NMR data showing the regions of the β-secondary structure, Val12 - Leu17 and Tyr10 - Phe19 contacts, and orientations of Phe19-Phe20 relative to the membrane bilayer surface.

FTIR spectra were also obtained of C39, corresponding to the extracellular and TM domains of the α-CTF. These data show that the β-strand IR band is lost upon deletion of the N-terminal 16 amino acids of C55 (Fig. S4) arguing that the LVFFAE sequence alone (i.e. in the context of the α-CTF) is not able to form anti-parallel structure.

Discussion

The mechanism of intra-membrane cleavage of APP remains a mystery despite recent progress in establishing the structure of the γ-secretase complex. Here, we address the structure of the membrane-embedded γ-secretase substrate that generates the Aβ peptides associated with AD. We find that the extracellular sequence of C55, the minimal substrate processed by the γ-secretase complex to Aβ, is not disordered, but folds into a defined structure in the absence of γ-secretase. The LVFF and YEV sequences in the N-terminus of C55 contribute to a β-hairpin, in which the hydrophobic Leu17, Phe19, Tyr10 and Val12 residues are inserted into the head group region of the bilayer. This structure is stabilized by the N-terminus and constitutes a default brake to the production of soluble Aβ. Together, these results provide insights into γ-secretase processing of wild-type and mutant β-CTF into Aβ.

The mechanism by which the extracellular β-sheet structure impairs the release of the soluble Aβ peptide is not known. One possibility is that the β-sheet modulates interactions with the γ-secretase complex. For example, Tian *et al.*[14] showed that deletion of the LVFFA sequence (L17-A21) increases the production of soluble Aβ at least 10-fold without a change in AICD release. The authors argued that there is an LVFF binding site on γ-secretase and that substrate binding inhibits γ-secretase activity. β-sheet may be required for this inhibitory interaction. Alternatively, the inhibitory interaction of the LVFF sequence may be with the membrane bilayer as suggested by the structural and mutational studies reported here. Of interest, it has recently been reported that pathologic amyloidogenic processing in neurons occurs mainly in late endosomes and lysosomes[23]. The acid pH present in the lumen of those organelles may disrupt the extracellular β-sheet of C99 due to protonation of residues that stabilize the β-sheet. Straub and coworkers[24] have suggested the presence of a protonation switch involving Glu22 and Asp23, which may be neutralized at low pH and favor cholesterol binding. In our model, this would disrupt charge pairing with (for e.g.) Asp23 and Lys28. Comparison of FTIR spectra of C55 reconstituted into POPC:PS bilayers at pH 5 and pH 7 exhibit broadening and loss of intensity of the 1626 cm^{-1} β-sheet resonance consistent with disruption at lower pH (Fig. S5).

The structure of the extracellular sequence may influence its interaction with nicastrin. Studies several years ago found that the interaction of the N-terminal NH_3+ of C99 with nicastrin enhances γ-secretase activity and argued that Glu333 on the nicastrin ectodomain was involved in substrate recognition[25]. Glu333 is 63 Å from the catalytic Asp385 of presenilin in the cryo-EM structure of the γ-secretase complex[26]. Such an interaction would require unraveling of the extracellular sequence. N-terminal mutations that disrupt the membrane bound β-sheet may facilitate unraveling of the N-terminus and possibly improve the ability of nicastrin to bind to the substrate and recruit it to the complex. We observe an increase in AICD release in the LVFF-to-AAAA mutant of C99 consistent with this as a possible mechanism. However, more recent studies on the Notch substrate do not reveal an interaction between nicastrin and the extracellular sequence[27]. Rather, substrate binding to the γ-secretase complex was found to be driven by interactions with the TM domain.

Finally, the structure and membrane interactions of the extracellular domain of C99 may influence dimerization and/or the orientation of the TM helix, and correspondingly influence its ability to be cleaved by the γ-secretase complex. Familial mutations in the TM domain have previously been suggested to influence dimerization and result in an increase in the Aβ42/40 ratio[28], although recent cross-linking studies indicate that dimerization blocks γ-secretase activity[29]. In our systems, the C55 peptides exist in a monomer-dimer equilibrium[18].

The dimer structure is mediated by the $G^{29}xxxG^{33}xxxG^{37}$ interface within the TM domain (Fig. S6A), and we have recently shown that the familial A21G mutation leads to an increase in dimerization of C55 and an increase in total secreted Aβ peptides[18]. Importantly, this mutation destabilizes the LVFF β-sheet structure.

The dimer interface mediated by GxxxG motifs in C55 differs from the interface mediated by the $G^{38}xxxA^{42}$ motif first suggested using computational methods[28] and later observed using solution NMR spectroscopy on TM peptides beginning with Gln15[30]. In this regard, removal of first 16 amino acids of C55 to form the C39 peptide, which serves as our model of the α-CTF, disrupts the extracellular β-sheet structure when reconstituted into membrane bilayers (Fig. S4A) and results in an increase in TM dimerization (Fig. S6B).

On the basis of our studies, small molecules or peptides that disrupt the membrane bound β-sheet structure in the β-CTF would be expected to increase Aβ production, whereas therapeutics that stabilize β-sheet structure would reduce Aβ production. Nicolau and coworkers found that palmitoylation of Aβ1-15 targeted this sequence to liposomal membranes and induced β-structure[31,32]. Antibodies formed against this membrane-bound sequence restored memory defects in mice[33]. Together these studies support the idea that membrane binding may induce β-sheet structure in the N-terminus of the β-CTF and that this β-sheet structure could be a target of regulation.

The observation that the LVFF sequence is inserted into the head group region of the membrane parallels the findings of Sanders and coworkers[19] who proposed that LVFF insertion may facilitate its interaction with cholesterol. Both structural and functional studies indicate that cholesterol interacts directly with the β-CTF. Structurally, a cholesterol-binding site was identified in the JM region of the β-CTF between the extracellular and TM domains[19]. Cholesterol and cholesterol-rich domains were linked to γ-secretase activity and the level of secreted Aβ[34]. In our previous studies of C55 reconstituted into POPS:POPC membrane bilayers[18], we found that the largest changes upon cholesterol addition were at Phe19 and Gly25. The changes in membrane-embedded Phe19 would agree with a direct interaction between C99 and cholesterol. However, parallel FTIR studies found no large differences in the 1626 cm^{-1} β-sheet band in the presence or absence of cholesterol suggesting that cholesterol is not regulating the binding of the extracellular sequence to the membrane[18]. Nevertheless, the insertion of Tyr10 into the head group region of the bilayer may play a role in cholesterol binding. The common cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) motif described for cholesterol binding contains a tyrosine followed by a lysine or arginine within five residues[35].

The structure of the extracellular region of C99 also has implications for the structure of Aβ monomers, oligomers and fibrils. γ-secretase cleavage of C99 releases monomers of the Aβ peptides into the extracellular environment where they associate into oligomers that rearrange to form protofibrils and mature fibrils. The LVFF region of both Aβ40 and Aβ42 in mature fibrils interacts with the hydrophobic C-terminus of the Aβ peptide after it is released from the membrane bilayer following γ-secretase cleavage. Additionally, the LVFF sequence forms parallel and in-register β-sheet via hydrogen bonding interactions with adjacent molecules along the fibril axis during fibril formation[36]. Importantly, the N-terminal region of the Aβ peptide including the YEV sequence is not ordered in fibrils or (in the case of a recent cryoEM structure of Aβ42[37]) bends around to allow the N-terminus to interact with C-terminus. This suggests that loss of the YEV – LVFF hairpin occurs during the conversion of membrane-bound Aβ into soluble protofibrils and fibrils. In fact, several studies have concluded that the N-terminus competes with the hydrophobic C-terminus of Aβ in forming a hydrophobic cluster, and consequently slows the formation of mature fibrils[38]. Our studies indicate that the β-sheet structure involving the N-terminus is induced by membrane binding and is retained in Aβ monomers and oligomers (see also[39]). Together, our current results and these previous studies argue that release of the hydrophobic Aβ C-terminus from the membrane bilayer upon cleavage of the membrane spanning domain of C99 sets into motion the rearrangement of interactions involving the critical LVFF motif, which ultimately leads to the release of N-terminal interactions as fibrils form.

Methods

Materials. ^{13}C-labeled amino acids were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA). Other amino acids and octyl-β-glucoside were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). DMPC, DMPG, POPC and POPS were obtained from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) as lyophilized powders and used without further purification. Human APP-specific antibody (WO-2) was obtained from Millipore (Billerica, MA). All cell culture reagents were from Invitrogen (Carlsbad, CA). The plasmids used to express human APP695 or β-CTF in eukaryotic cells have been previously described[40]. The different mutants were generated by site-directed mutagenesis according to manufacturer's instructions (Quick-Change™, Stratagene, La Jolla, CA).

Cell Cultures and Transfection. CHO cells were cultured in F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics at 37 °C and 5% CO_2 and transfected 24 h after seeding as previously described[40].

Western Blotting. Western blotting was performed on cell lysates (10 μg protein). Membranes were incubated at 4 °C overnight with APP C-terminal (APP Cter) polyclonal antibody (1:5000), washed and incubated with 1:10,000 secondary anti-rabbit antibody conjugated to horseradish peroxidase, followed by ECL revelation (Amersham, Uppsala, Sweden).

AICD Reporter Gene Assay. AICD release was measured by a reporter gene assay previously described[41]. CHO cells were transfected with C99, Tip60Gal4, Fe65 expression vectors, Gal4RE-luc and *Renilla* luciferase vectors. Luciferase activity was measured 48 h after transfection by the Dual Glo® luciferase assay (Promega, Madison, WI) Luciferase activity corrected for transfection efficiencies was calculated as the firefly/*Renilla* luciferase ratio.

ECLIA Assays. Aβ production was monitored in the culture media 48 h after transfection. Briefly, samples were cleared by centrifugation (12,000 *g*, 3 min, 4 °C). Aβ38/Aβ40/Aβ42 were quantified in 25 µl of cellular medium by multiplex 4G8 or 6E10 Aβ ECLIA assays according to the manufacturer's instructions (MesoScale Discovery, Gaithersburg, MD).

Statistical Analyses. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism™ software (GraphPad, La Jolla, CA). Statistical significance was evaluated by One-way ANOVA followed by Dunnett's post-hoc test or as indicated.

Peptide Synthesis and Purification. C55 peptides (Asp1-Lys55) corresponding to the TM and juxtamembrane regions of APP were synthesized by solid-phase methods (Keck Facility, Yale University). The purity was confirmed with MALDI-TOF mass spectrometry and analytical reverse phase HPLC.

Protein Expression and Purification. The C55 sequence was subcloned into a pET21a vector and expressed with an added methionine encoded at the N-terminus and a linker plus His-tag (KLAAALEHHHHHH) at the C-terminus. This vector was used in the transformation of BL21 strain of *E. coli*. The transformed cells were plated on Luria Broth (LB) plates with ampicillin resistance and incubated at 37 °C overnight. A single colony from the plate was then selected and seeded into 20 ml of LB overnight. The resulting cell culture was used to inoculate 500 ml of LB with vigorous shaking at 37 °C. When the OD_{600} reached 0.8, 1 mM of isopropyl thiogalactoside was added to induce the overexpression of the proteins at 23 °C for 16–20 hours. The cells were harvested by centrifugation and broken using a French press. The C55 protein was purified with a Nickel NTA column using the following procedure. Cell pellets were washed 3 times with the 35 ml of lysis buffer (75 mM Tris, 300 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.8) until the washed solution became clear. The pellets were then dissolved in 35 ml of urea/SDS buffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 8 M urea, 0.2% SDS, pH 7.8) and mixed overnight at room temperature. The resulting solution was centrifuged at 25,000 *g* for 20 min. The supernatants were collected and mixed with the pre-equilibrium Nickel beads for 2 hours at room temperature. The column was then washed with urea/SDS buffer and the proteins were eluted with 250 mM imidazole in Tris-buffered saline solution (pH 7.8) containing octyl-β-D-glucoside. The eluted fractions were collected and checked by SDS-PAGE. The protein purity was further confirmed with SDS-PAGE and mass spectroscopy.

Reconstitution of C55 and C39 into Membrane Bilayers. Peptides were reconstituted into DMPC:DMPG or POPC:PS bilayers using methods described previously[18]. Briefly, the peptides were cosolubilized with lipids and octyl-β-glucoside in hexafluoroisopropanol. The organic solvent is removed under vacuum and the peptide-lipid-detergent mix is solubilized in buffer. The high critical micelle concentration of octyl-β-glucoside relative to other detergents makes it easy to slowly dialyze detergent away from the lipid and peptide, which greatly reduces peptide aggregation during the reconstitution process. The peptide:lipid molar ratio was 1:50 and the molar ratios between DMPC:DMPG or POPC:PS was 10:3, similar to the ratio of neutral-to-negatively charged lipids in plasma membrane. The mixture was then incubated for 3 h, frozen and put under vacuum overnight to remove the solvent. The dried peptide-lipid-detergent mixture was rehydrated by dissolving in HEPES buffer (5 mM HEPES, 50 mM NaCl, pH 7.2) and the detergent was removed by dialysis.

ATR-FTIR Spectroscopy. Polarized attenuated total reflection (ATR) FTIR spectra were obtained on a Bruker IFS 66 V/S spectrometer. ATR-FTIR spectroscopy was used to characterize the global secondary structure C55 and C39 in bilayers. The wild-type and mutant peptides reconstituted in bilayers were layered down on a germanium plate and bulk water was removed by a gentle strain of nitrogen gas.

Fluorescence Spectroscopy. Tryptophan fluorescence measurements on C55 F19W and F20W with and without LUVs were performed using a Horiba Jobin Yvon Fluorolog FL3-22 spectrofluorimeter. The samples were placed into a quartz cuvette with a path length of 5 mm and fluorescence was immediately measured. Spectra were collected from 300–450 nm.

Solid-State NMR Spectroscopy. 2D dipolar assisted rotational resonance (DARR) NMR experiments were performed at a ^{13}C frequency of 125 MHz on a Bruker AVANCE spectrometer. The MAS spinning rate was set to 9–11 KHz (± 5 Hz) depending on whether the spinning sidebands will overlap with the labeled ^{13}C frequencies. The ramped amplitude cross polarization contact time was 2 ms. Two-pulse phase-modulated decoupling was used during the evolution and acquisition periods with a radiofrequency field strength of 80 kHz. The DARR mixing time was 600 ms. The sample temperature was maintained at 198 K (±2 K).

REDOR NMR experiments[20] were performed at a ^{13}C frequency of 242 MHz on a Bruker AVANCE spectrometer with a dephasing period of 20 rotor cycles at 10 KHz MAS rate (2 ms). The REDOR filtered spectra (ΔS) were obtained by subtracting spectra with (S) and without (S_0) rotor-synchronized ^{15}N π pulses (10–11 µs). To reduce artifacts, S and S_0 spectral acquisition was interleaved and difference spectra were acquired scan-by-scan. ΔS spectra were summed over 60–100 K scans using ~5–6 mgs of rhodopsin in a typical sample.

Data Availability. The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Selkoe, D. J. Alzheimer disease: Mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann. Intern. Medic.* **140**, 627–638 (2004).
2. Burdick, D. *et al.* Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/β amyloid peptide analogs. *J. Biol. Chem.* **267**, 546–554 (1992).
3. Kienlen-Campard, P., Miolet, S., Tasiaux, B. & Octave, J. N. Intracellular amyloid-β 1-42, but not extracellular soluble amyloid-β peptides, induces neuronal apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 15666–15670, https://doi.org/10.1074/jbc.M200887200 (2002).
4. Portelius, E. *et al.* Mass spectrometric characterization of brain amyloid beta isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **120**, 185–193, https://doi.org/10.1007/s00401-010-0690-1 (2010).
5. Citron, M. *et al.* Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* **360**, 672–674, https://doi.org/10.1038/360672a0 (1992).
6. Di Fede, G. *et al.* A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science* **323**, 1473–1477, https://doi.org/10.1126/science.1168979 (2009).
7. Johnston, J. A. *et al.* Increased β-amyloid release and levels of amyloid precursor protein (APP) in fibroblast cell lines from family members with the Swedish Alzheimer's disease APP670/671 mutation. *FEBS Lett.* **354**, 274–278, https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01137-0 (1994).
8. Hendriks, L. *et al.* Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the β-amyloid precursor protein gene. *Nat. Genet.* **1**, 218–221, https://doi.org/10.1038/ng0692-218 (1992).
9. Levy, E. *et al.* Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* **248**, 1124–1126 (1990).
10. Kamino, K. *et al.* Linkage and mutational analysis of familial Alzheimer disease kindreds for the APP gene region. *Am. J. Hum. Genet.* **51**, 998–1014 (1992).
11. Grabowski, T. J., Cho, H. S., Vonsattel, J. P., Rebeck, G. W. & Greenberg, S. M. Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Ann. Neurol.* **49**, 697–705, https://doi.org/10.1002/ana.1009 (2001).
12. De Jonghe, C. *et al.* Flemish and Dutch mutations in amyloid β precursor protein have different effects on amyloid β secretion. *Neurobiol. Dis.* **5**, 281–286, https://doi.org/10.1006/nbdi.1998.0202 (1998).
13. Betts, V. *et al.* Aggregation and catabolism of disease-associated intra-Aβ mutations: reduced proteolysis of Aβ A21G by neprilysin. *Neurobiol. Dis.* **31**, 442–450, https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.06.001 (2008).
14. Tian, Y., Bassit, B., Chau, D. M. & Li, Y. M. An APP inhibitory domain containing the Flemish mutation residue modulates γ-secretase activity for Aβ production. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 151–158, https://doi.org/10.1038/nsmb.1743 (2010).
15. Nilsberth, C. *et al.* The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Aβ protofibril formation. *Nat. Neurosci.* **4**, 887–893, https://doi.org/10.1038/nn0901-887 (2001).
16. Ren, Z., Schenk, D., Basi, G. S. & Shapiro, I. P. Amyloid β-protein precursor juxtamembrane domain regulates specificity of γ-secretase-depcndent cleavages. *J. Biol. Chem.* **282**, 35350–35360, https://doi.org/10.1074/jbc.M702739200 (2007).
17. Kukar, T. L. *et al.* Lysine 624 of the amyloid precursor protein (APP) is a critical determinant of amyloid β peptide length: Support for a sequential model of γ-secretase intramembrane proteolysis and regulation by the amyloid β precursor protein (APP) juxtamembrane region. *J. Biol. Chem.* **286**, 39804–39812, https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274696 (2011).
18. Tang, T. C. *et al.* Conformational changes induced by the A21G Flemish mutation in the amyloid precursor protein lead to increased Abeta production. *Structure* **22**, 387–396, https://doi.org/10.1016/j.str.2013.12.012 (2014).
19. Barrett, P. J. *et al.* The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science* **336**, 1168–1171, https://doi.org/10.1126/science.1219988 (2012).
20. Gullion, T. & Schaefer, J. In *Advances in Magnetic Resonance, Vol. 13; Conference on "High Resolution NMR in* Solids", *January 19–21, 1989* (ed W.S. Warren) 57–84 (Academic Press, Inc., 1989).
21. Terzi, E., Hölzemann, G. & Seelig, J. Self-association of β-amyloid peptide(1-40) in solution and binding to lipid-membranes. *J. Mol. Biol.* **252**, 633–642 (1995).
22. Balbach, J. J. *et al.* Amyloid fibril formation by $A\beta_{16-22}$, a seven-residue fragment of the Alzheimer's β-amyloid peptide, and structural characterization by solid state NMR. *Biochemistry* **39**, 13748–13759, https://doi.org/10.1021/bi0011330 (2000).
23. Sannerud, R. *et al.* Restricted location of PSEN2/gamma-secretase determines substrate specificity and generates an intracellular Aβ pool. *Cell* **166**, 193–208, https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.020 (2016).
24. Panahi, A., Bandara, A., Pantelopulos, G. A., Dominguez, L. & Straub, J. E. Specific binding of cholesterol to C99 domain of amyloid precursor protein depends critically on charge state of protein. *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 3535–3541, https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.6b01624 (2016).
25. Shah, S. *et al.* Nicastrin functions as a gamma-secretase-substrate receptor. *Cell* **122**, 435–447, https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.022 (2005).
26. Bai, X. C. *et al.* An atomic structure of human gamma-secretase. *Nature* **525**, 212-+, https://doi.org/10.1038/nature14892 (2015).
27. Bolduc, D. M., Montagna, D. R., Gu, Y., Selkoe, D. J. & Wolfe, M. S. Nicastrin functions to sterically hinder γ-secretase–substrate interactions driven by substrate transmembrane domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, E509–518, https://doi.org/10.1073/pnas.1512952113, (2015).
28. Gorman, P. M. *et al.* Dimerization of the transmembrane domain of amyloid precursor proteins and familial Alzheimer's disease mutants. *BMC Neurosci.* **9**, https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-17 (2008).
29. Winkler, E., Julius, A., Steiner, H. & Langosch, D. Homodimerization protects the amyloid precursor protein C99 fragment from cleavage by γ-secretase. *Biochemistry* **54**, 6149–6152, https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00986 (2015).
30. Nadezhdin, K. D., Bocharova, O. V., Bocharov, E. V. & Arseniev, A. S. Dimeric structure of transmembrane domain of amyloid precursor protein in micellar environment. *FEBS Lett.* **586**, 1687–1692, https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.04.062 (2012).
31. Hickman, D. T. *et al.* Sequence-independent control of peptide conformation in liposomal vaccines for targeting protein misfolding diseases. *J. Biol. Chem.* **286**, 13966–13976, https://doi.org/10.1074/jbc.M110.186338 (2011).
32. Nicolau, C., Greferath, R., Balaban, T. S., Lazarte, J. E. & Hopkins, R. J. A liposome-based therapeutic vaccine against beta-amyloid plaques on the pancreas of transgenic NORBA mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 2332–2337, https://doi.org/10.1073/pnas.022627199 (2002).
33. Muhs, A. *et al.* Liposomal vaccines with conformation-specific amyloid peptide antigens define immune response and efficacy in APP transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 9810–9815, https://doi.org/10.1073/pnas.0703137104 (2007).
34. Beel, A. J. *et al.* Structural studies of the transmembrane C-terminal domain of the amyloid precursor protein (APP): Does APP function as a cholesterol sensor? *Biochemistry* **47**, 9428–9446 (2008).
35. Li, H., Yao, Z. X., Degenhardt, B., Teper, G. & Papadopoulos, V. Cholesterol binding at the cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 1267–1272, https://doi.org/10.1073/pnas.031461598 (2001).
36. Tycko, R. & Wickner, R. B. Molecular structures of amyloid and prion fibrils: Consensus versus controversy. *Acc. Chem. Res.* **46**, 1487–1496, https://doi.org/10.1021/ar300282r (2013).
37. Gremer *et al.* Fibril structure of amyloid-β (1–42) by cryo–electron microscopy. *Science* **358**, 116–119, https://doi.org/10.1126/science.aao2825 (2017).
38. Maji, S. K. *et al.* Amino acid position-specific contributions to amyloid β-protein oligomerization. *J. Biol. Chem.* **284**, 23580–23591, https://doi.org/10.1074/jbc.M109.038133 (2009).

39. Fu, Z. *et al.* Capping of Aβ42 oligomers by small molecule inhibitors. *Biochemistry* **53**, 7893–7903, https://doi.org/10.1021/bi500910b (2014).
40. Kienlen-Campard, P. *et al.* Amyloidogenic processing but not amyloid precursor protein (APP) intracellular C-terminal domain production requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GXXXG motifs. *J. Biol. Chem.* **283**, 7733–7744, https://doi.org/10.1074/jbc.M707142200 (2008).
41. Hattangadi, S. M., Wong, P., Zhang, L. B., Flygare, J. & Lodish, H. F. From stem cell to red cell: Regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood* **118**, 6258–6268, https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-356006 (2011).

Acknowledgements
This work was supported by NIH-NSF instrumentation grants (S10 RR13889 and DBI-9977553), and a grant from the NIH to SOS (AG 27317). We gratefully acknowledge the W.M. Keck Foundation for support of the NMR facilities in the Center of Structural Biology at Stony Brook. Support to SNC was from Ludwig Cancer Research, FRS-FNRS, projects ARC ARC10/15–027 and IAP BeMeGI, Fondation contre le cancer and Salus Sanguinis. Support to PKC was from Foundation for Research on Alzheimer's disease, the Interuniversity Attraction Pole Programme-Belgian Sate-Belgian Science Policy (IAP-P7/16), Fondation Médicale Reine Elisabeth (FMRE), projects ARC ARC 14/19-059. We thank Martine Ziliox for assistance with the NMR experiments, Joanne Van Hees for generating the C55 wild-type and mutant constructs, and Nicolas Sergeant (INSERM, Lille) for the kind gift of the APP Cter antibody.

Author Contributions
Conceptualization, P.K.-C., S.N.C. and S.O.S.; Investigation, Y.H., T-C.T, F.P., R.O., M.D. and X.P.; Writing – Original Draft, S.N.C. and S.O.S.; Writing – Review & Editing, Y.H., P.K-C., S.N.C. and S.O.S.; Funding Acquisition, P.K-C., J-N.O., S.N.C. and S.O.S.; Resources, P.K-C., J-N.O., S.N.C. and S.O.S.; Supervision, P.K-C., J-N.O., S.N.C. and S.O.S.

Additional Information
Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-017-17144-0.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2017

Cortical cells reveal APP as a new player in the regulation of GABAergic neurotransmission

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Cortical cells reveal APP as a new player in the regulation of GABAergic neurotransmission

Received: 10 October 2016
Accepted: 21 February 2017
Published online: 23 March 2017

Anna Doshina[1], Florian Gourgue[1], Michiho Onizuka[1], Remi Opsomer[1], Peng Wang[1], Kunie Ando[2], Bernadette Tasiaux[1], Ilse Dewachter[1], Pascal Kienlen-Campard[1], Jean-Pierre Brion[2], Philippe Gailly[1], Jean-Noël Octave[1] & Nathalie Pierrot[1]

The amyloid precursor protein (APP) modulates synaptic activity, resulting from the fine tuning of excitatory and inhibitory neurotransmission. GABAergic inhibitory neurotransmission is affected by modifications in intracellular chloride concentrations regulated by Na^+-K^+-$2Cl^-$ cotransporter 1 (NKCC1) and neuronal K^+-Cl^- cotransporter 2 (KCC2), allowing entrance and efflux of chloride, respectively. Modifications in NKCC1 and KCC2 expression during maturation of cortical cells induce a shift in GABAergic signaling. Here, we demonstrated that APP affects this GABA shift. Expression of APP in cortical cells decreased the expression of KCC2, without modifying NKCC1, eliciting a less inhibitory GABA response. Downregulation of KCC2 expression by APP was independent of the APP intracellular domain, but correlated with decreased expression of upstream stimulating factor 1 (USF1), a potent regulator of *Slc12a5* gene expression (encoding KCC2). KCC2 was also downregulated *in vivo* following APP expression in neonatal mouse brain. These results argue for a key role of APP in the regulation of GABAergic neurotransmission.

The amyloid precursor protein (APP) is critically involved in the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD)[1], the most prevalent cause of dementia affecting more than 44 million people worldwide (from World Alzheimer Report 2015). Accumulation of amyloid beta peptide (Aβ), derived from the proteolytic cleavage of APP[2], is one of the main hallmarks of AD[3,4]. Consecutive cleavage of APP by two membrane-bound aspartic proteases termed β- and γ-secretases not only leads to the production of Aβ but also generates the APP intracellular domain (AICD), a physiologically active catabolite that could control the transcription of several genes[5]. Besides producing Aβ, many physiological functions of APP have been described[6,7]. Amongst these, APP and/or its catabolites were shown to influence synaptic excitatory[8,9] and inhibitory[10–14] neurotransmission, both *in vitro* and *in vivo*[15].

In the adult central nervous system, γ-amino-butyric acid (GABA) is a major inhibitory neurotransmitter that shapes cortical activity[16]. Interplay between excitation and inhibition ensures the stability of cortical activity by preventing runaway excitation[17,18] and regulates behavioral functions, such as learning and memory, supported by the long-term potentiation (LTP) mechanism[16,19]. GABA-mediated inhibition involves both conductance-based (shunting) and voltage-based (hyperpolarization) mechanisms[20]. Even though GABA is mainly hyperpolarizing and inhibitory in the mature brain, its actions are primarily depolarizing and sometimes excitatory in the developing brain[21–24]. GABAergic neurotransmission is mediated by two main types of receptors: metabotropic $GABA_B$ receptors ($GABA_BR$) and ionotropic $GABA_A$ receptors ($GABA_AR$). Since $GABA_AR$ are ligand-gated ion channels that mainly allow the bidirectional flux of Cl^- ions, the nature of GABAergic neurotransmission, depolarizing versus hyperpolarizing, is essentially determined by intracellular concentrations of Cl^- ($[Cl^-]_i$) and the membrane potential.

The two main cation-chloride cotransporters regulating the $[Cl^-]_i$ in the central nervous system (CNS) are Na^+-K^+-$2Cl^-$ cotransporter 1 (NKCC1) allowing the entrance of Cl^- and K^+-Cl^- cotransporter 2 (KCC2), allowing the efflux of chloride[20,25,26]. Changes in NKCC1 and KCC2 expression levels influence the polarity of inhibitory currents mediated by GABA or glycine, another inhibitory neurotransmitter. For instance, increased KCC2 expression levels lead to an increase in Cl^- extrusion, a reduction in $[Cl^-]_i$ and subsequent conversion of inhibitory neurotransmission from depolarizing to hyperpolarizing[27].

[1]Institute of Neuroscience, Université catholique de Louvain, 1200, Brussels, Belgium. [2]Laboratory of Histology and Neuropathology, Université libre de Bruxelles, 1070, Brussels, Belgium. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.-N.O. (email: jean-noel.octave@uclouvain.be)

In APP-deficient mice, attenuation of GABA-mediated inhibitory post-synaptic currents was shown to contribute to the impairment of synaptic plasticity illustrated by LTP and behavioural deficits[10,11]. Theta-gamma oscillation coupling, involved in inhibitory transmission[28], was also demonstrated to be impaired in these mice[13]. Moreover, APP overexpression, but not a subsequent A3 increase, leads to hypersynchronous network activity in an APP transgenic mouse model of AD and is associated with changes in GABAergic neurotransmission[14]. Furthermore, in a mouse model of Down syndrome (DS), where APP is overexpressed, dysregulation of cation Cl cotransporters expression leads to excitatory $GABA_AR$ signaling[29]. These DS mice carry an extra copy of mouse chromosome 16 syntenic to the long arm of human chromosome 21[30] containing the human *APP* gene[31].

In the present work, the influence of APP on the regulation of NKCC1 and KCC2 expression and effects on GABAergic neurotransmission were studied. We show that NKCC1 expression was not modified in human APP (hAPP) expressing cells, while KCC2 expression was decreased. Using Ca^{2+} imaging and gramicidin perforated patch, we demonstrate that GABA was less hyperpolarizing and less inhibitory in hAPP expressing cells. We conclude that KCC2 expression depends on APP expression levels, involving the juxta-/transmembrane domain of APP and could rely on the KCC2 transcriptional regulator USF1. KCC2 expression was also decreased following hAPP expression *in vivo*.

Results

Evolution of KCC2 and NKCC1 expression and GABAergic Ca^{2+} responses during primary cortical culture development. The transition of GABAergic neurotransmission from depolarizing to hyperpolarizing that takes place not only *in vivo* but also in primary neuronal cultures *in vitro* is associated with a gradual change in NKCC1 and KCC2 expression (for review see ref. 20). Since dynamics and magnitude of these changes depend on the model used, we first decided to fully characterize our experimental model of primary cortical cell cultures. In these cultures, NKCC1 and KCC2 mRNA levels were analysed between 4 and 17 days *in vitro* (DIV). Significant 3- to 4-fold increase in NKCC1 and KCC2 mRNA levels was observed by 7 DIV (Fig. 1a). KCC2 mRNA continued to increase as the culture developed, whereas NKCC1 mRNA gradually decreased after 7 DIV (Fig. 1a). These changes were mirrored by modifications in NKCC1 and KCC2 protein levels (Fig. 1a). As previously reported, the developmental upregulation of KCC2 mRNA and protein levels is essentially due to the KCC2b isoform[32,33]. The KCC2 and NKCC1 antibodies, as well as the primers used in PCR experiments, recognize both isoforms of KCC2 (KCC2a and KCC2b) and NKCC1 (NKCC1a and NKCC1b).

During the early developmental period, depolarizing GABAergic potentials activate voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCCs) and increase intracellular Ca^{2+} levels ($[Ca^{2+}]_i$)[34–36]. We monitored GABA-induced Ca^{2+} responses during the maturation of cortical cell cultures by using Fura-2 AM Ca^{2+}-sensitive dye (Fig. 1b). Measurements of fluorescence intensity changes showed that cells cultured up to 7 DIV responded to exogenous GABA application (100 µM) with a rapid and reversible increase in $[Ca^{2+}]_i$. Beyond 7 DIV, the percentage of neurons that responded to GABA decreased with the duration of the culture (Fig. 1b).

Given that by 17 DIV the response to GABA was almost completely gone, depolarization with a high concentration of extracellular KCl (50 mM) still induced robust increases in $[Ca^{2+}]_i$, suggesting that decreased responsiveness to GABA was due to a decrease in the extent of GABA-induced depolarization (Supplementary Fig. 1a). These observations are consistent with previous findings in cultured neurons[37,38]. Moreover, GABA responses were blocked by the L-type VDCC antagonist nimodipine (10 µM) (Supplementary Fig. 1b), indicating that the GABA-induced Ca^{2+} increase is mediated by Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels. Furthermore, treatment with the $GABA_B$ agonist baclofen (10 µM) did not change $[Ca2^+]_i$, while the $GABA_A$ specific agonist isoguvacine (30 µM) increased $[Ca2^+]_i$, indicating that $GABA_B$ receptors are not involved in GABA-induced changes in $[Ca^{2+}]_i$ (Supplementary Fig. 1b). Taken together, the results indicate that maturation related changes in expression of NKCC1 and KCC2 tightly correlate with the evolution of GABA-induced Ca^{2-} responses in our cortical cell model. Furthermore, a shift in GABAergic signaling is apparent in our cultures starting from 7 DIV and GABA induced depolarization is almost completely absent by 17 DIV.

Human APP expression decreases KCC2 expression and renders GABA signaling less hyperpolarizing and less inhibitory in primary cortical cultures. To address whether APP could modulate GABAergic neurotransmission by affecting expression levels of NKCC1 and KCC2, we expressed human APP (hAPP) in cultured rat cortical cells. Full-length neuronal wild-type hAPP expression was achieved by infecting primary cortical cultures with a recombinant adenoviral vector at 6 DIV, i.e. prior to the occurrence of the GABA shift. At 13 DIV, we probed blots with an antibody which discriminates between hAPP and endogenous rat APP by recognizing amino-acids 4–10 of human Aβ, as well as using an antibody that recognizes the 19 carboxyl-terminal amino acids of both human and endogenous APP (total APP) (Fig. 2a). Seven days after infection, expression of hAPP increased the total content of APP by about 1.6 fold (159.6 ± 33%) (Fig. 2a). Moreover transgene expression was homogeneous, did not affect cell density and viability and remained stable over time (Supplementary Fig. 2a–c). Expression of hAPP did not affect NKCC1 expression, but decreased KCC2 mRNA and protein levels by about 50% (44.8 ± 5.3 and 57.4 ± 5.4% of control, respectively) (Fig. 2a). In some cases, oligomeric forms of KCC2 could be detected and decreased to the same extent as the monomeric protein in hAPP expressing cells (46.8 ± 12% of control Supplementary Fig. 3a). Moreover, KCC2 immunofluorescent signal was significantly decreased in hAPP expressing neurons (49.6 ± 4.2% of control, Supplementary Fig. 3b). Infection of cortical cells with an adenovirus encoding human recombinant green fluorescent protein (hrGFP) was not toxic and did not modify expression levels of NKCC1 and KCC2 (Supplementary Fig. 4a and b). In addition, KCC2 and NKCC1 expression remained unchanged in cortical cultures infected with hAPP adenovirus at 13 DIV after the occurrence of the GABA shift (data not shown).

Given that NKCC1 and KCC2 are regulators of neuronal chloride gradients and that these gradients are important for GABAergic transmission polarity, the decrease in KCC2 levels suggested that hAPP expression

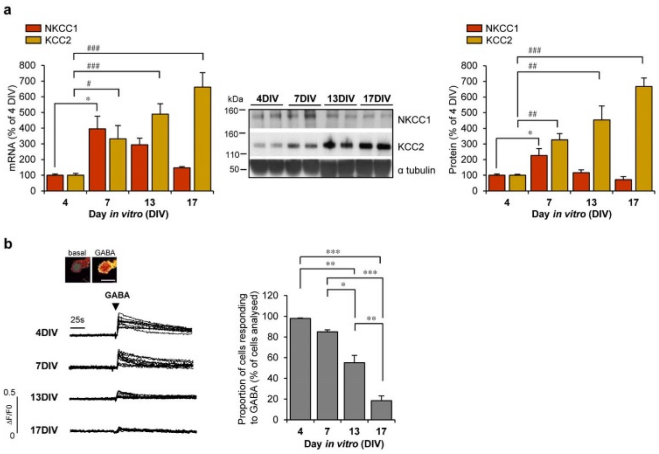


Figure 1. Developmental changes in cations Cl^- cotransporters expression and GABA-induced responses in rat cortical cells cultures. (**a**) Left panel: Time course of *Slc12a2* (encoding NKCC1) and *Slc12a5* (encoding KCC2) mRNA levels analysed between 4 and 17 days *in vitro* (DIV) in primary rat cortical cultures by RT-qPCR (n = 7 each analysed in 5 independent experiments). Results were normalized to GAPDH mRNA and expressed as percentage (mean ± s.e.m.) of 4 DIV (*$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple-comparison post-test). Middle panel: Representative Western blot of cell lysates from cortical cultures analysed between 4 and 17 DIV. Expression of NKCC1 and KCC2 was monitored using specific antibodies. Blots were further probed with an anti-α tubulin antibody. Right panel: quantification of NKCC1 and KCC2/α tubulin ratios. Results were expressed as percentage (mean ± s.e.m.) of 4 DIV (n = 11 of each analysed in 6 independent experiments, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, ANOVA for NKCC1 and Kruskal-Wallis test for KCC2). (**b**) GABA-induced calcium responses in cortical cells during culture development. Top, ratiometric fluorescent dye image in one cell before (basal) and immediately after applying 100 µM GABA. Scale bar, 10 µm. Representative traces of ten cell recordings displaying a $[Ca2^+]_i$ increase in response to GABA. Traces are expressed as ΔF/F0, where ΔF corresponds to a change in F340/F380 ratio and F0 is the basal fluorescence value. Right panel, percentage (mean ± s.e.m.) of cells responding to GABA (n = 215 cells for each time point analysed in 4 independent experiments, *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, Kruskal-Wallis test).

could have an impact on GABAergic transmission polarity. To test this hypothesis, we monitored GABA-induced depolarization between 13 and 17 DIV by loading control or hAPP expressing cells with Fura-2AM calcium sensitive dye and treating them with GABA (100 µM). As shown in Fig. 2b, hAPP expressing cells displayed increased GABA-induced response as compared to controls. Indeed, the proportion of cells responding to GABA as well as the amplitude of this response were increased in hAPP expressing neurons (75.15 ± 3.9 of total cells analysed and 190.4 ± 2.76% of control, respectively). It is noteworthy that GABA-induced fluorescence was unaffected in hrGFP infected cells (Supplementary Fig. 4c). Furthermore, the increase in $[Ca^{2+}]_i$ observed in hAPP expressing cells was not due to higher expression of the α3 and α1 $GABA_AR$ subunits, predominantly expressed in the adult and developing cortex, respectively[39,40] (Supplementary Fig. 5a). Since expression of the α1C pore-forming subunit of L-type VDCC ($Ca_v1.2$) was previously shown to be modified by APP[41], we measured $Ca_v1.2$ expression as well as another pore forming subunit of L-type channels, α1D ($Ca_v1.3$) in hAPP expressing primary cortical cells. $Ca_v1.2$ and $Ca_v1.3$ expression remained unchanged in hAPP expressing cells (Supplementary Fig. 5b).

In order to confirm that the GABA-induced rise in $[Ca^{2+}]_i$ observed in hAPP expressing neurons was sensitive to changes in chloride concentration, we incubated primary cortical neurons with the NKCC1 inhibitor bumetanide[42]. It was assumed that by decreasing $[Cl^-]_i$, bumetanide would render GABA more hyperpolarizing which in turn would result in a reduced GABA-induced Ca^{2+} response. As expected, in hAPP expressing neurons treated with 10 µM bumetanide[42], the proportion of cells responding to GABA as well as the amplitude of the GABA response were decreased compared to untreated hAPP expressing cells (19.63 ± 5.7% of total cells analysed and 50.3 ± 4.6% of untreated hAPP) (Fig. 2b), indicating that changes in $[Cl^-]_i$ may contribute to GABA-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ observed in hAPP expressing neurons. Taken together the results suggest that GABA is more depolarizing in hAPP expressing neurons, which could be due to a modification in $[Cl^-]_i$ levels resulting from a decrease in KCC2 expression in these cells.

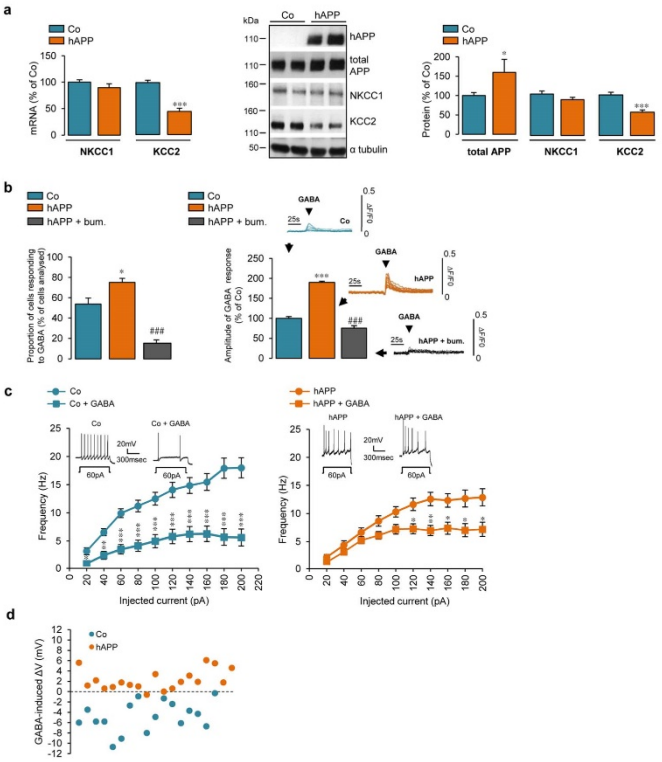


Figure 2. Expression of human APP in cortical cultures decreases KCC2 expression and changes GABA-induced responses. (**a**) Left panel: Comparative RT-qPCR analyses of *Slc12a2* (coding for NKCC1) and *Slc12a5* (coding for KCC2) mRNA levels in primary rat cortical cultures infected or not (control, Co) at 6 DIV with an adenovirus coding for human APP (hAPP). Results were obtained between 13 and 17 DIV (n = 20 for each condition in 9 independent experiments), normalized to GAPDH mRNA and expressed as percentage (mean ± s.e.m.) of Co (***$P < 0.001$, Student's *t*-test). Middle panel: Representative Western blot of cell lysates from Co and hAPP cultures. hAPP and total APP, were detected between 13 and 17 DIV with the WO2 and anti-APP C-terminal antibody, respectively. Blots were further probed using anti-NKCC1, -KCC2, and -α tubulin antibodies. Right panel: quantification of total APP, NKCC1 and KCC2/α tubulin ratios expressed as percentage (mean ± s.e.m.) of Co (Co n = 28 and hAPP n = 30 in 16 independent experiments, *$P < 0.05$, ***$P < 0.001$, Mann-Whitney test (total APP) and Student's *t*-test (NKCC1 and KCC2)). (**b**) GABA (100 µM)-induced calcium response in Co and hAPP cultures measured between 13 and 17 DIV incubated with or without 10 µM bumetanide (bum.) for 1 h. Insets: representative traces of ten cell recordings. Traces are expressed as ΔF/F0, where ΔF corresponds to a change in F340/F380 ratio and F0 is the basal fluorescence value. Percentage (mean ± s.e.m.) of cells responding to GABA (left panel) and amplitude of this response (right panel) (Co n = 138, hAPP n = 122, hAPP+ bum. n = 208 cells in 4 independent experiments), ANOVA test followed by Bonferroni's multiple-comparison post-test (compared to controls: *$P < 0.05$, ***$P < 0.001$; to untreated hAPP: ###$P < 0.001$). Frequency and representative traces of action potentials depending on the current injected (**c**) and difference in membrane potential (ΔV) (**d**) in Co and hAPP expressing cortical neurons before or after GABA (100 µM) application measured between 13 and 19 DIV (Co n = 17 and hAPP n = 19 cells in 6 independent experiments, in (**c**) *$P < 0.05$, **$P < 0.01$, ***$P < 0.001$, Student's *t*-test applied for each current step).

Given the increased depolarization evoked by GABA in hAPP expressing neurons observed by calcium imaging, gramicidin perforated patch recordings in hAPP expressing neurons were performed in order to evaluate the effect of GABA (100 µM) on evoked action potential (AP) frequency and resting membrane potential between 13 DIV and 19 DIV. As expected, addition of GABA reduced AP frequency in control neurons by about 65% (Fig. 2c). On the other hand in hAPP expressing neurons, AP frequency was reduced only by about 35% indicating that GABA was less inhibitory in these cells (Fig. 2c). Furthermore, while application of GABA elicited a significant hyperpolarization in most control cells analysed (ΔVm $-4.83\,mV \pm -0.55$), hAPP expressing neurons either slightly depolarized or did not display a change in membrane potential in response to GABA (ΔVm $2.25\,mV \pm 0.36$) (Fig. 2d and Supplementary Fig. 6a). The effect of GABA measured by patch clamp in neurons infected with hrGFP was not significantly different compared to controls (Supplementary Fig. 6b and c). These results support the idea that GABA is more depolarizing in hAPP expressing neurons compared to controls. However, the more depolarizing effect of GABA in hAPP expressing cells is not sufficient to elicit excitation. Indeed, GABA remained inhibitory in hAPP expressing neurons, but to a lesser extent than in controls.

APP dependent KCC2 downregulation in primary cortical cultures involves the juxta-/transmembrane domain of APP and could rely on USF1. We next investigated whether KCC2 downregulation was related to APP expression level. NKCC1 and KCC2 expression was first measured in cultured cortical cells from wild type ($App^{+/+}$) and APP deficient ($App^{-/-}$) mice. At 13 DIV, the absence of APP and/or its cleavage products did not modify NKCC1 and KCC2 mRNA and protein levels (Supplementary Fig. 7a). Nevertheless, tendency towards increased KCC2 expression was observed. Given that APP belongs to a multi-gene family of paralogs including amyloid precursor-like proteins (APLPs) 1 and 2[43], APLP1 and APLP2 could functionally compensate for the loss of APP[44,45]. Indeed, we observed a non-significant increase in APLP1 expression in $App^{-/-}$ compared to $App^{+/-}$ cells, suggesting partial compensation of APP deletion by APLP1 (Supplementary Fig. 7b). To bypass compensatory mechanisms that might have masked APP function, APP expression was reduced in cortical cells using an shRNA construct designed to target endogenous APP (APP shRNA). The knock-down of endogenous rat APP was achieved by infecting cells on 6 DIV with recombinant lentiviruses encoding APP shRNA. At 13 DIV, blots were probed with an antibody that recognizes the 19 carboxyl-terminal amino acids of endogenous APP (Supplementary Fig. 8a). One week after APPshRNA lentiviral infection, a $68.8 \pm 8.6\%$ decrease in endogenous APP expression was observed, while APLP1 and APLP2 protein levels remained unchanged (Supplementary Fig. 8a). Using this knock-down approach, NKCC1 expression was not modified after APPshRNA lentiviral infection (Fig. 3a). By contrast, a significant increase in KCC2 mRNA and protein levels (219.3 ± 24.2 and $268.2 \pm 28.1\%$ of control, respectively), was observed (Fig. 3a). Moreover, infection of cortical cells with a recombinant lentivirus encoding neomycin resistance (neo) did not change KCC2 protein levels (Supplementary Fig. 8b). The results thus indicate that KCC2 expression depends on APP expression.

We next investigated whether cleavage products of APP could be involved in the regulation of KCC2 expression. APP is a type-I transmembrane protein with a large extracellular domain and a short intracellular domain (Supplementary Fig. 9), both contributing to APP function (for review, see ref. 5). We first tested whether the APP intracellular domain (AICD), a transcriptional regulator[46], could be involved in the downregulation of KCC2. Primary cortical cell cultures were infected with a recombinant adenovirus encoding a hAPP variant containing the APP extracellular and transmembrane domains, but lacking its intracellular domain (APPΔC) (Fig. 3b). Expression of APPΔC greatly decreased KCC2 mRNA and protein levels (Fig. 3b) (29.4 ± 3.8 and $18.3 \pm 1.8\%$ of control, respectively). Moreover, KCC2 expression was unaffected in cells infected by a control adenovirus encoding β-galactosidase (β-gal, Supplementary Fig. 10). Taken together, the results ruled out involvement of AICD in the hAPP dependent KCC2 decrease.

Using a similar strategy, the question of whether the extracellular domain of APP could play a role in regulating KCC2 expression was investigated. An adenoviral vector encoding the transmembrane and intracellular domains of hAPP i.e. the naturally occurring APP C99 fragment, which begins at the β-secretase cleavage site (CTFβ) (Supplementary Fig. 9) was used. Expression of C99 decreased KCC2 mRNA and protein levels to a similar extent as observed with full-length hAPP (52.3 ± 10.8 and $66.5 \pm 5.3\%$ of control, respectively) (Fig. 3b), indicating that the hAPP extracellular domain does not play a role in the hAPP-dependent regulation of KCC2 expression.

γ-secretase processing of APP is physiologically important since it leads not only to AICD production but also to that of Aβ, which plays an important role in the pathophysiology of AD and has been assigned many functions[6]. Involvement of γ-secretase processing in hAPP dependent KCC2 downregulation was studied using a highly potent and selective γ-secretase inhibitor, L-685,458 (1 µM)[47]. Inhibition of γ-secretase activity for 24 h in hAPP expressing cells significantly decreased extracellular human Aβ 1-40 levels (Supplementary Fig. 11a) and induced APP carboxyl-terminal fragments (CTFs) accumulation (Supplementary Fig. 11b), but did not affect NKCC1 and KCC2 mRNA and protein levels (Fig. 3c). Together, the results indicate that the hAPP-mediated decrease in KCC2 is AICD and γ-secretase activity independent and does not involve the hAPP extracellular domain.

The KCC2b promoter has 10 putative transcription factor binding sites[48]. Amongst these, the only two transcription factors clearly described as potent regulators of *Slc12a5* gene encoding KCC2 are early growth response 4 (EGR4) and upstream stimulating factor 1 (USF1)[48,49]. Given that hAPP is able to decrease KCC2 mRNA levels, expression of KCC2 transcriptional regulators EGR4 and USF1 was measured in hAPP expressing cells. Although EGR4 can modulate KCC2 expression in developing neurons[48], EGR4 mRNA level was unchanged in hAPP expressing cells and in cultures infected with APPshRNA lentiviral vector (Fig. 3d). By contrast, a 50% decrease in USF1 mRNA was seen in hAPP expressing cells ($53.5 \pm 7.7\%$ of control, Fig. 3e). Unfortunately, commercially available EGR4 antibodies did not detect the EGR4 protein in our cortical cell extracts. On the other hand, USF1 protein levels were decreased in hAPP expressing cells ($57.8 \pm 11.5\%$ of control) (Fig. 3e). Moreover, mRNA and

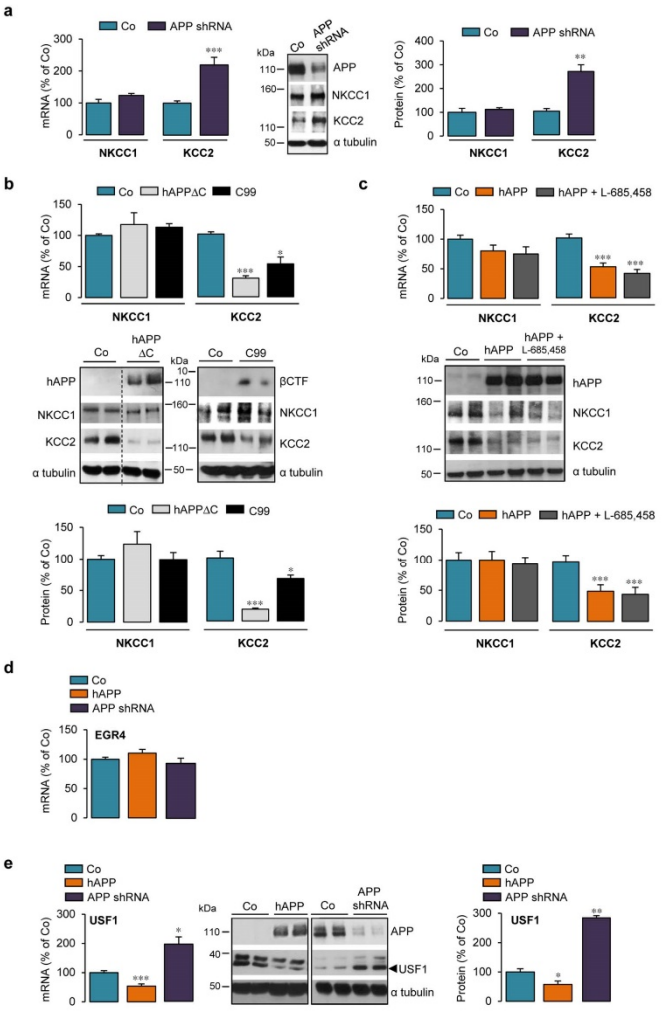


Figure 3. APP dependent KCC2 downregulation in primary cortical cultures involves juxta-/transmembrane domain of APP and could rely on USF1. (**a–e**) Comparative RT-qPCR analyses of *Slc12a2* (encoding NKCC1) and *Slc12a5* (encoding KCC2) (**a–c**) or EGR4 and USF1 (**d**,**e**) mRNA levels in primary rat cortical cultures infected or not (control, Co) at 6 DIV with shRNA APP lentiviruses (**a**,**d**,**e**) or adenoviruses encoding human (hAPP) truncated in its carboxyl- or amino terminal-domain (b: hAPPΔC, C99, c: hAPP). In (**c**) hAPP expressing cells were treated with 1 μM L-685,458 γ-secretase inhibitor for 24 h. Analysis was performed between 13 and 17 DIV. Results were normalized to GAPDH mRNA. (**a–c**,**e**) Representative Western blots of

cell lysates from cortical cultures infected or not (control, Co) at 6 DIV with shRNA APP lentiviruses (**a**,**e**), hAPPΔC, C99 or hAPP adenoviral constructs (in cropped Western blots **b** and **c**). Between 13 DIV and 17 DIV, expression of hAPP and βCTF was monitored with the specific WO2 antibody and expression of endogenous APP was assessed using the anti-APP C-terminal antibody. Blots were further probed using anti-NKCC1, -KCC2, USF1 and -α tubulin antibodies. NKCC1, KCC2 and USF1 signals were normalized to α tubulin, quantified and expressed as percentage (mean ± s.e.m.) of Co: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$; (**a**) Student's *t*-test for NKCC1 and Mann-Whitney test for KCC2; (**b**) Kruskal-Wallis test; (**c**,**e**): ANOVA (except for USF1 mRNA in (**e**) Kruskal-Wallis test. (**a**) Co n = 8 and APPshRNA n = 14 (mRNA) and Co n = 5 and APPshRNA n = 7 (protein) analysed in 5 and 3 independent experiments, respectively; (**b**) Co n = 11, APPΔC and C99 n = 7 of each in 5 independent experiments; (**c**) hAPP n = 7 and hAPP + L-685,458 n = 8, each in 3 independent experiments. In d and e, hAPP and Co n = 11 in 5 independent experiments; APPshRNA n = 6 (mRNA) and n = 11 (protein) in 3 independent experiments.

protein levels of USF1 were increased in cultures infected with an APPshRNA lentiviral vector (201 ± 25.2 and 282 ± 7.7% of control, respectively) (Fig. 3e). Taken together, the results suggest that APP can modulate USF1 and KCC2 expression in a similar manner providing a hint to a putative mechanism of APP dependent KCC2 expression regulation.

KCC2 expression is decreased in AAV hAPP transduced mouse brains. Since adenoviral hAPP transduction decreased KCC2 expression *in vitro*, we wondered whether hAPP transduction could affect KCC2 and NKCC1 levels *in vivo*. Therefore, serotype 2 associated-adenoviruses encoding full-length neuronal wild-type human APP and green fluorescent protein were produced (AAV-hAPP and AAV-GFP, respectively). AAV constructs were first tested *in vitro* by infecting cultured cortical cells at 6 DIV. At 13 DIV, hAPP and GFP could be detected in AAV-hAPP and AAV-GFP infected cells by Western blotting, respectively (Fig. 4a and Supplementary Fig. 12a, respectively). Moreover, we show that hAPP expression, while not affecting NKCC1 expression, decreased KCC2 protein levels by more than 50% (43.6 ± 17.1% of control) (Fig. 4a). Furthermore, infection of cortical cells with AAV-GFP did not modify expression levels of neither NKCC1 nor KCC2 (Supplementary Fig. 12a).

A shift in polarity of $GABA_A$ responses was shown to occur during the first two postnatal weeks in rodent hippocampus[50]. Moreover, unlike in the human neocortex[51,52], KCC2 is robustly upregulated perinatally in rodents and continues to increase during the first postnatal month[20,53]. Based on these observations and in order to mimic the timing of adenoviral transductions made *in vitro* (6 DIV), mice pups were intraventricularly injected with an AAV-hAPP or -GFP construct on postnatal day 1 or 2 (P1-P2), i.e. prior to the occurrence of the $GABA_A$ transmission polarity shift[50]. Brains of injected mice pups were recovered at P30, the time point when cortical synaptic maturation had been completed (for a review see ref. 54). By western-blotting, hAPP expression in the posterior part of cerebral hemispheres of AAV-hAPP injected mice was examined (Fig. 4b). In these samples, KCC2 protein expression decreased while NKCC1 expression remained unchanged (Fig. 4b). Furthermore, protein levels of NKCC1 and KCC2 were not affected by AAV-GFP injection (Supplementary Fig. 12b). These results indicate that hAPP was able to decrease KCC2 expression both *in vitro* and *in vivo*.

Discussion

In this study, the influence of APP on regulation of NKCC1 and KCC2 expression with an emphasis on GABAergic neurotransmission was investigated. It was shown that hAPP was able to decrease KCC2 expression both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, the decrease in KCC2 expression observed *in vitro* was associated with a less inhibitory and less hyperpolarizing GABA signaling. In addition, our study unveiled an involvement of the juxta-/transmembrane domain of APP in this regulation.

Several lines of evidence coming from mice overexpressing or lacking APP indicate that APP could play a role in GABAergic neurotransmission[10–15,55]. Our study investigated the link between APP and indirect GABAergic neurotransmission actors - cation-chloride cotransporters NKCC1 and KCC2. Our results show that expression of human APP was able to decrease KCC2 without modifying NKCC1. Deidda *et al*. have previously shown that in a mouse model of Down's syndrome NKCC1 expression is increased and leads to excitatory $GABA_AR$ signaling[29]. These mice have an extra copy of mouse chromosome 16 which is syntenic to the long arm of human chromosome 21[56,57] and therefore carry 3 copies of APP gene[58,59]. In this study, no significant KCC2 expression change was observed. Even though APP is overexpressed in these mice, the genomic region triplicated in this model codes for a whole range of genes besides APP that could be able to influence cation-chloride cotransporters expression. In a recent study by Chen and al., a decrease in KCC2 protein levels was observed in *APP*$^{-/-}$ mice[55]. The authors have shown that APP and KCC2 can interact and that APP functions to limit tyrosine-phosphorylation and ubiquitination and thus subsequent degradation of KCC2. While in our study we have analyzed the impact of APP on KCC2 expression around the timing of the GABA shift occurrence, we were also interested to see whether APP could influence KCC2 levels in adult mice. Therefore, we have analyzed expression levels of KCC2 in the cortices of *App*$^{-/-}$ mice at several ages. At the age of 8 months, we observed indeed a decrease in KCC2 protein in *App*$^{-/-}$ mice (data not shown), confirming the results of Chen *et al.*[55]. In contrast, at the age of 3 months, the absence of APP induced a slight increase in KCC2 expression, in particular at the mRNA level (data not shown), indicating that APP can regulate KCC2 protein level by different mechanisms, depending on the age studied.

As illustrated by evoked action potential measurements in hAPP expressing primary cortical cultures, GABA dependent inhibition as well as GABA-induced hyperpolarization were decreased. However, we recorded spiking activity using cell-attached mode from the cell bodies of hAPP expressing neurons and therefore addressed

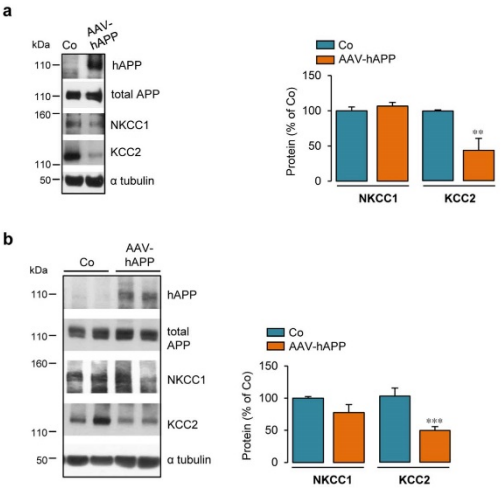


Figure 4. NKCC1 and KCC2 expression in AAV-hAPP transduced cortical cells and mouse brains. (**a**) Representative Western blot of cell lysates from primary rat cortical cultures infected or not (control, Co) at 6 DIV with serotype 2 associated-adenoviruses encoding wild-type human APP (AAV-hAPP). At 13 DIV, expression of hAPP was monitored with the specific WO2 antibody and expression of both hAPP and endogenous APP (total APP) was analysed using the anti-APP C-terminal antibody. Blots were further probed using anti-NKCC1, -KCC2 and -α tubulin antibodies. Right panels: quantification of NKCC1 and KCC2/α tubulin ratios. Results were expressed as percentage (mean ± s.e.m.) of Co (n = 3 of each analysed in 3 independent experiments, $^{**}P < 0.01$, Student's *t*-test except for KCC2 in (**a**): Mann-Whitney test. (**b**) Representative Western blot of brain homogenates of mice intraventricularly injected at P1-P2 with AAV-hAPP. 30 days post injection, expression of hAPP was monitored with the specific WO2 antibody and expression of both hAPP and endogenous APP (total APP) with the anti-APP C-terminal antibody. Blots were further probed using anti-NKCC1, -KCC2, and -α tubulin antibodies. NKCC1 and KCC2/α tubulin ratios were quantified (right panel). Results were expressed as percentage (mean ± s.e.m.) of Co ($^{***}P < 0.001$; Mann-Whitney test). Co n = 7 mice and AAV-hAPP n = 5 mice.

changes only in their global excitability. Given this we cannot exclude that specific cell compartments like certain neuronal processes may respond to GABA differently as KCC2 expression pattern could be modified by hAPP[60,61]. Furthermore, we can't rule out that reduced KCC2 expression could be compensated by a change in its post-translational regulation (for review[62]). Although we measured no change in expression levels of $GABA_AR$ subunits α3 and α1, the function of theses receptors could be modified by hAPP.

Numerous physiological functions have been assigned to cleavage products of APP. Therefore, we studied which part of hAPP could be important for reduced KCC2 expression. Constructs lacking the APP intracellular domain (APPΔC) and extracellular domain (C99) were expressed in primary cortical cells and both constructs decreased KCC2 expression. However, APPΔC decreased KCC2 expression to a greater extent than full-length hAPP. This difference could be due to a trafficking disparity between APPΔC and full-length APP[63]. For example, the APP C-terminal domain contains the YENPTY internalization motif which is required for APP endocytosis necessary for APP processing[5]. Experiments using APPΔC and C99 supported the idea that the juxta-/transmembrane domain of APP containing Aβ sequence would be important for APP dependent KCC2 regulation. This domain not only contains Aβ sequence, but also contributes to APP dimerization (reviewed in ref. 64). Furthermore, even though the γ-secretase inhibitor L-685,458 did not affect KCC2 expression, we cannot exclude that Aβ could modify KCC2 expression. Indeed, after L-685,458 treatment, residual Aβ was still detectable by ECLIA. It is noteworthy that decreased KCC2 expression has been observed in the hippocampus AD11 mice which express an anti-NGF antibody and develop AD-like hallmarks including amyloid deposits[65]. In addition, mice overexpressing p60TRP, a G-protein coupled receptor known to promote non-amyloidogenic processing of APP, bare an increase in KCC2 expression[66]. Given these observations, it would be interesting to investigate whether these KCC2 expression changes could be linked to a dysregulation in APP processing.

Given that hAPP altered KCC2 mRNA levels, we investigated whether expression of potent transcriptional regulators of KCC2 (EGR4 and USF1) could be modified by APP[48,49]. EGR4 mRNA levels did not change in hAPP expressing neurons, whereas a correlation between USF1 and KCC2 expression was observed in these cells. Nevertheless, as EGR4 protein was undetectable, we cannot assess whether its expression level would be unchanged in hAPP expressing cells. Moreover, even if the correlation we observed could implicate USF1 in APP dependent KCC2 regulation, there are nine other transcription factor binding sites located in the KCC2 promoter[48].

Although APP is not overexpressed in sporadic AD, APP is an important player in this pathology where its metabolism and/or function are highly impaired. Therefore, we wondered whether KCC2 and NKCC1 expression could be modified in sporadic AD. We extended our analysis by examining KCC2 and NKCC1 expression in frontal cortex brain tissues from human control subjects and patients suffering from dementia clinically diagnosed with late onset AD (Supplementary Table 1). While NKCC1 expression remained unchanged, we detected a significant decrease in KCC2 expression in the brains of these patients (Supplementary Fig. 13). A potential involvement of Aβ in APP dependent KCC2 regulation cannot be excluded and one could speculate that increased levels of Aβ and/or an alteration in the physiological function of APP could influence KCC2 expression in AD. Nevertheless, AD is a complex disease involving numerous factors that could contribute to the changes we observed. Indeed, in AD there is loss of cholinergic neurons and it is known that KCC2 can be regulated by cholinergic neurotransmission[67]. Furthermore, excitability problems in AD have been noticed (i.e. increased risk for epilepsy) (reviewed in ref. 68) and KCC2 expression can be regulated by neuronal activity[62]. In addition, another important actor in AD, the microtubule associated protein tau, was shown to influence GABAergic transmission and might therefore influence levels of KCC2[69]. It is noteworthy that KCC2 and NKCC1 expression or functional changes have been observed in many other pathologies including epilepsy[62], autism[70], Fragile X syndrome[71], traumatic brain injury[72], Down syndrome[29] where an APP/Aβ dysregulation has been described[7,31,73].

Our study adds yet another dimension to the previous work as it highlights the involvement of APP in the regulation of KCC2 expression, which could influence the polarity of GABAergic neurotransmission. Moreover, it should be mentioned that such regulation could also be extended to the excitatory system. Indeed, KCC2 plays an important structural role in dendrites independent of its Cl^- transport function making it a synchronizing factor in the development of both inhibitory and excitatory neurotransmission[74]. KCC2 is involved in the functioning and development of synapses and could help to stabilize them. Given that APP is known to modulate neurite outgrowth and synapse development[75,76], one might speculate that APP-dependent KCC2 regulation plays a role in these mechanisms. Furthermore, our study introduces a potential developmental aspect for APP dependent KCC2 regulation. Indeed, decreased KCC2 expression was observed only when hAPP adenoviral infection was performed at 6 DIV, prior to the appearance of the GABA shift, suggesting that hAPP expression might block the developmental upregulation of KCC2 in primary cortical cultures. Therefore, it would be interesting to study the involvement of APP in inhibitory and excitatory synapse development with a focus on KCC2.

In conclusion, our results point to a new important role of APP in the regulation of KCC2 expression, which could influence GABAergic neurotransmission. This information advances our understanding of the physiological function of APP and sheds light on new mechanisms that could contribute to AD pathology.

Methods

Animals. All animal procedures used in the study were carried out in accordance with institutional and European guidelines and experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee from the Université catholique de Louvain (UCL, Brussels, Belgium). *App*$^{-/-}$ transgenic mice[77] were kept on C57Bl6/J genetic background and obtained from Jackson Laboratories (strain name: B6.129S7-Apptm1Dbo/J). Animals were housed on a 12 hour light/dark cycle in standard animal care facilities. Both pregnant Wistar rats used for embryonic cortical cell cultures and mice pups of either sex used for intraventricular injections (C57Bl6/J genetic background) were obtained from the Université catholique de Louvain (UCL, Brussels, Belgium) animal facility.

Culture reagents and antibodies. Unless specified, reagents for cell culture, western blotting and calcium imaging were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Antibodies were from the sources indicated: mouse monoclonal WO2 anti-hAPP, rabbit polyclonal anti-KCC2 and rabbit polyclonal anti-APLP1 and APLP2 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA, catalog nos. MABN10, 07–432 and Calbiochem catalog nos. 171615 and 171616, respectively); mouse monoclonal anti-NKCC1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa city, IA, USA, catalog no. T4); rabbit polyclonal anti-APP C-terminus and mouse monoclonal α tubulin, (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA, catalog nos. A8717 and T6074, respectively); rabbit polyclonal anti-hrGFP (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, cat no. 240141) and anti-GFP (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA, catalog no. AB10145); rabbit anti-$GABA_AR$ subunits α1 and α3 (Alomone Labs, Jerusalem, Israel, catalog nos AGA-001 and AGA-003, respectively); mouse monoclonal anti-CaV1.3 and anti-CACNA1C (Abcam, Cambridge, UK, cat nos; ab85491, and ab84814, respectively) and rabbit anti-USF1 (C-20) (Bio-Connect life sciences, Huissen, The Netherlands, catalog no. sc-229).

Cell culture. 17–18 day-old embryos of either sex were taken from Wistar rats or wild type and *APP*$^{-/-}$ mice euthanized with CO_2. Cortices were isolated and gently disrupted by passing the tissue through a Pasteur pipette with a fire-polished tip. The cells were plated in culture dishes (4×10^5 cells/cm^2) pre-treated with 10 µg/ml poly-L-lysine in phosphate buffered saline (PBS) and cultured for 6 days *in vitro* in Neurobasal medium supplemented with 2% (v/v) B-27 medium and 0.5 mM L-glutamine prior to infection with recombinant viruses. The cultures were maintained at 37 °C under a 5% CO_2 atmosphere.

Preparation of recombinant viruses and infection of cell culture. *Adenoviruses.* Recombinant adenoviruses encoding wild-type human APP695 (AdhAPP), β-cleaved C-terminal fragment of hAPP fused to the APP signal peptide (AdC99) and human recombinant Green Fluorescent Protein-2 (AdhrGFP) were prepared as described previously using the AdEasy™ XL Adenoviral Vector System (Stratagene, La Jolla, CA, USA, catalog no. 240010)[78]. Briefly, either the pShuttle-CMV-internal ribosomal entry site (IRES)-hrGFP-2 vector (for AdGFP) or the same vector containing the cDNA encoding either human APP695 or its C-terminal region (residues 597 to residue 695 for AdC99) was cloned into the pAdEasy-1 vector. Adenoviruses were purified according to the manufacturer's instructions.

The construction and purification of recombinant adenoviruses encoding β-galactosidase (Adβgal) and human APP695 truncated at its C-terminal region from residues 652 to 695 (AdhAPPΔC) were made as described previously[78]. The AdhAPPΔC construct contains a stop codon after the three lysine residues that follow the APP transmembrane domain. Cells infected with AdhrGFP and Adβgal were used as control. After 6 days *in vitro* (6 DIV), the cells were infected at a multiplicity of infection (MOI) of 10 in a minimal volume of culture medium for 4 h. Infection medium was replaced by fresh culture medium every two days up to analysis (between 13 DIV and 19 DIV).

Lentiviruses. Two different pLKO.1 vectors encoding shRNA targeting APP mRNA were obtained from Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA, (catalog nos. TRCN0000054874 Clone ID: NM_007471.2-2185s1c1 and TRCN0000054876 Clone ID: NM_007471.2-1583s1c1, respectively) and used for construction of recombinant lentiviruses, as previously described[79]. Briefly, lentiviruses were produced by calcium phosphate cotransfection of the target plasmid together with lentiviral packaging plasmids (gag-pol, rev, and VsVg plasmids, a kind gift from Pr. T. Michiels (de Duve Institute, Brussels, Belgium)) into HEK293T/17 cells (ATCC®, Manassas, VA, USA, catalog no. CRL-11268™). Supernatants containing the lentiviruses were harvested 48 h after transfection. Lentiviruses were concentrated and purified with the Lenti-X ™ Concentrator kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA, catalog no. PT4421-2) according to the manufacturer's instructions. Aliquots (30 µl) of concentrated lentiviral solution were added to cell cultures on 6 DIV. A recombinant lentivirus encoding the neomycin resistance gene (pTM898neo, a kind gift from Pr. T. Michiels (de Duve Institute, Brussels, Belgium)) was used as a negative control. Cells were analysed on 13 DIV.

Adeno Associated Viruses (AAV). pAAV-MCS Vector of AAV-DJ/8 Helper Free Expression System was used in order to clone hAPP (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, USA catalog no. VPK-410-DJ-8). This pAAV-hAPP vector contains inverted terminal repeats of an AAV2 sequence bordering a CMV promoter driving expression of hAPP. A control AAV vector pAAV-CMV-GFP was obtained from Connie Cepko (Addgene, Cambridge, MA, USA, catalog no. #67631). pHelper and pRC2-mi342 plasmids used for AAV cross-packaging were obtained from AAVpro Helper Free System (AAV2) (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France, catalog no. #6230). AAV2 particles were generated based on the AAVpro Helper Free System protocol. Briefly, HEK 293 T/17 cells (ATCC®, Manassas, VA, USA, catalog no. CRL-11268™) were transfected with 45 µg total of pAAV-hAPP or pAAV-CMV-GFP, pHelper and pRC2-mi342 plasmids (ratio 1:1:1) using the Mirus TransIT 293 (Mirus Bio, Madison, WI, USA, catalog no. MIR 2700) transfection reagent (3 µl/1 µg of DNA). After 72 hours of transfection, cell pellets were recovered and AAV2 viral particles were extracted using the AAVpro® Extraction Solution (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France, catalog no. #6235). AAV2 particles dedicated to *in vivo* usage were purified using the ViraBind™ AAV Purification Mega Kit (Cell Biolabs, inc. San Diego, CA, USA, catalog no. #VPK-141). The genomic titer of the virus was measured using the AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2 (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France, catalog no. #6233). Cultures were transduced on 6 DIV using AAV2-hAPP or AAV2-GFP at an MOI of 3000. A maximum of 100 µl microliters of crude viral extract or purified virus was added to each well of a 12 well plate containing approximately 900,000 cells in 1 ml.

For AAV2 - hAPP and - GFP transduction in neonatal mouse brain, one or two days after birth (P1-P2), C57Bl6/J neonates were cryoanesthetized and injected using a 10 µl Hamilton glass syringe (Filter Service, Eupen, Belgium, catalog no. HA 7635-01) at an angle of 30 °C to a depth of 1.5 mm. Purified concentrated viral vector (2 µl) was slowly injected into each cerebral lateral ventricle. A total of 4.5×10^8 genomic equivalents (4 µl) was injected into each mouse brain. After injection, pups were allowed to completely recover on a warming blanket and then returned to the home cage for later analysis.

Treatments. Cells were treated for 1 h with bumetanide 10 µM (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA, catalog no. B3023) prior to Ca^{2+} imaging. On 12 DIV and for 24 h, cells were treated with (5 S)-(t-Butoxycarbonylamino)-6-phenyl-(4 R)hydroxy-(2 R)benzylhexanoyl)-L-leu-L-phe amide (L-685,458, 1 µM), a γ-secretase inhibitor (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA, catalog no. L1790).

Western blotting. Cells in culture were washed, scraped off into PBS and centrifuged (10,000 rpm × 2 min). The cell pellets were sonicated in lysis buffer (125 mM Tris (pH 6.8), 20% glycerol, and 4% sodium dodecyl sulphate) supplemented with complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Bâle, Switzerland). For brain protein extraction, samples were homogenized in RIPA buffer (1% (w/v) NP40, 0.5% (w/v) deoxycholic acid, 0.1% (w/v) SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.4) containing 1 mM PMSF, 10 mM NaF, 2 mM sodium orthovanadate and 1% (v/v) protease and phosphatase inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). The samples were clarified by centrifugation at 20 000 g and protein concentrations were determined using a Bicinchoninic Acid Assay (BCA) kit. Samples were heated for 10 min at 70 °C in loading buffer (lysis buffer containing 10% (w/v) 2-Mercaptoethanol and 0.004% (w/v) bromophenol blue).

Cell and brain lysates (20 µg and 40 µg of proteins, respectively) were subjected to SDS-PAGE using 4–12% Nupage™ bis-Tris gels for Western blotting. Nitrocellulose membranes were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: human APP-specific WO2 (1:2 000); anti-APP C-terminal (1:2 000); anti-KCC2 (1:1 000); anti-hrGFP and GFP (1:2 000), anti-NKCC1 (1:100); anti-$GABA_AR$ subunits α1 and α3 (1:2 000 and 1:1 1000; respectively); anti-CaV1.3 (1:1 000), anti-CACNA1C (1:1 000), anti-α tubulin (1:4 000), anti-APLP1 and APLP2 (1:4 000 and 1:2 000, respectively) and anti-USF1 (1:500). Blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, revealed by ECL (Amersham Pharmacia), and quantified using the Quantity One™ software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) with α-tubulin as a loading control.

RNA extraction and real time PCR. Total RNA was isolated by TriPure Isolation Reagent according to the manufacturer's protocol. RNA samples were resuspended in DEPC-treated water. Reverse transcription was carried out with the iScript cDNA synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA, catalog no. 1708891) using 1 µg of total RNA in a total reaction volume of 20 µL. Controls were performed without reverse transcriptase to rule out amplification of contaminant genomic DNA. Real-time PCR was performed for the amplification of NKCC1, KCC2, EGR4, USF1 and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNAs. Primers were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO); **F**, Forward primer; **R**, Reverse primer; **E**, primer efficiency:

NKCC1 rat
E-107.2%, **F**-5′TTCGTGAGAGGAGGAGGAG3′, **R**-5′GATGCCCAGAAGAACCAC3′
KCC2 rat and mouse
E-102.0%, **F**-5′GGTGGAAGTCGTGGAGATG3′, **R**-5′CGAGTGTTGGCTGGATTC3′
USF1 rat
E-95.7%, **F**-5′TGATGATGCTGTTGACGC3′, **R**-5′TGGCTCCCTCCCTGTAAC3′
EGR4 rat
E-108.2%, **F**-5′CGACGAGAAGAAGCGACA3′, **R**-5′CCAGCGAGTAGAAGCCCA3′
GAPDH rat/mouse
E-106.7%, **F**-5′CCCCCAATGTATCCGTTGTG3′, **R**-5′TGATTTCCCGTAGGACCGAT3′

Real-time PCR was carried out in a total volume of 25 µL containing 8 ng cDNA template, 0.3 µM of the appropriate primers and the IQ™ SYBR® Green Supermix 1x (Biorad catalog no. 1708885). The PCR protocol consisted of 40 amplification cycles (95 °C for 30 s, 60 °C for 45 s and 79 °C for 15 s) and was performed using an iCycler IQ™ multicolor Real-Time PCR detection system (Bio-Rad). For quantification, a relative standard curve was established for each target gene using four-fold serial dilutions (from 100 to 0.097 ng) of a cDNA template mix prepared using the same conditions. Each sample was normalized to relative expression levels of GAPDH. Calculation of Ct, standard curve preparation and quantification of mRNAs contained in the samples were performed using the "post run data analysis" software provided with the iCycler system (Bio-Rad).

Cytosolic free Ca^{2+} measurement in single neurons. For cytosolic free Ca^{2+} measurements, all recordings were carried out at 37 °C in Krebs-HEPES buffer (see below) containing 10 µM CNQX (Tocris, Bristol, UK, catalog no. 1045). Acute treatment of neurons with 100 µM GABA (Sigma-Aldrich; St-Louis, MO, USA, catalog no. A2129), 10 µM baclofen (Tocris, catalog no. 0417), 30 µM isoguvacine (Sigma-Aldrich, catalog no. G002) and 10 µM nimodipine (Tocris, catalog no. 0600) was performed in the incubation chamber. Neurons were plated at a density of 1.8 10^5 cells/cm^2 on pre-coated 15 mm round glass coverslips with 10 µg/ml poly-L-lysine in phosphate buffered saline. Seven to eleven days after adenoviral infection, neurons were incubated in the dark in the presence of the Ca^{2+} indicator fura-2 acetoxymethylester (Fura-2 AM; catalog no. F1225) at a final concentration of 2 µM in Krebs-HEPES buffer (10 mM HEPES, 135 mM NaCl, 6 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgCl_2$, 10 mM glucose, pH 7.4) for 30 min at room temperature. Coverslips were then washed and mounted in a heated (37 °C) microscope chamber (1 ml). Cells were alternately excited (1 or 2 Hz) at 340 and 380 nm for 100 ms using a Lambda DG-4 Ultra High Speed Wavelength Switcher (Sutter Instrument, Novato, CA) coupled to a Zeiss Axiovert 200 M inverted microscope (X20 fluorescence objective) (Zeiss Belgium, Zaventem, BE). Images were acquired using a Zeiss Axiocam camera coupled to a 510 nm emission filter and analysed with the Axiovision software. A total of 70–80 neurons was studied in each experiment and non-neuronal cells were excluded from the analysis as previously described by Pickering and coworkers[80]. Changes in intracellular Ca^{2+} fluorescence were estimated from fluorescence emission intensity ratios F340/F380 or ΔF obtained after excitation of cells at wavelengths of 340 nm and 380 nm. These changes were expressed as ΔF/F0 where F0 is the basal fluorescence value corresponding to the mean of ΔF signals measured during a period of 50 s in control conditions (prior to the GABA pulse). The GABA response was defined as a change of ΔF greater than 10% relative to F0. To estimate the amplitude of the response to GABA, F0 was subtracted from the maximum ΔF value occurring during the 50 s GABA pulse.

Electrophysiology. In order to preserve intracellular Cl^- concentrations, gramicidin perforated patch recordings were performed to measure evoked action potentials in primary cortical cell cultures expressing hAPP between 13 DIV and 19 DIV. The recording bath solution contained 145 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 15 mM HEPES and 10 mM glucose (pH adjusted to 7.4 with NaOH, osmolarity: 290 mOsm/l). The internal pipette solution contained 140 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 4 mM MgATP, 0.5 mM EGTA and 10 mM HEPES (pH adjusted to 7.2 with KOH, osmolarity: 280 mOsm/l). A 20 mg/ml stock of gramicidin in dimethyl-sulphoxide (DMSO) was diluted freshly to a final concentration of 80 µg/ml in the internal pipette solution. To facilitate gigaseal formation, patch pipettes were front filled by dipping the tip into the gramicidin-free solution then back filled with the gramicidin containing solution. All recordings were performed at room temperature. To obtain

the frequency-current (f-I) relationship, action potential firing was recorded in response to 10 depolarizing current steps of 20 pA using the Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) in presence or absence of added GABA (100 µM) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA, catalog no. A2129). Data were filtered at 5 kHz through a lowpass Bessel filter and collected at a frequency of 8 kHz using the Digidata 1322 A digitizer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Liquid junction potential and capacitance transients were compensated. 20 to 30 min after cell-attached seal formation (seal resistance >3 GΩ), series resistance (Rs) typically dropped and stabilized at ~30–40 MΩ. Resting membrane potential measured in current clamp mode (I = 0) was stable. Input and series resistance were monitored during the experiment, and recordings were excluded when any of these parameters changed by >10%. The instantaneous firing rate for each current step was calculated from the inter-spike interval using the pClamp software. Electrodes were pulled from capillary glass (Harvard Apparatus, Les Ulis Cedex, France, catalog no. 30-0053) on a Sutter Instruments P97 puller (Sutter Instruments, Novato, CA, USA) and had a resistance of 3–6 MΩ when filled with the internal solution.

Statistics. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.01. The Shapiro-Wilk test was used to test for the normality of data. Parametric testing procedures (Student's *t* test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple-comparison post-test when many subgroups were compared) were applied for normally distributed data, otherwise nonparametric tests were used (Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests followed by Dunn's multiple-comparison post-test when many subgroups were compared). The total number of samples (n) analysed in all experimental conditions (number of repeated measurements) is indicated in figures legends. Results are presented as mean ± s.e.m. and statistical significance was set at *P* values (two-tailed tests) <0.05 ($^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$).

References

1. Nalivaeva, N. N. & Turner, A. J. The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett* **587**, 2046–2054 (2013).
2. Kang, J. *et al.* The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**, 733–736 (1987).
3. Hardy, J. A. & Higgins, G. A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184–185 (1992).
4. Selkoe, D. J. & Hardy, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* (2016).
5. Reinhard, C., Hebert, S. S. & De, S. B. The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J* **24**, 3996–4006 (2005).
6. van der Kant, R. & Goldstein, L. S. Cellular functions of the amyloid precursor protein from development to dementia. *Dev. Cell* **32**, 502–515 (2015).
7. Westmark, C. J. What's hAPPening at synapses? The role of amyloid beta-protein precursor and beta-amyloid in neurological disorders. *Mol. Psychiatry* **18**, 425–434 (2013).
8. Korte, M., Herrmann, U., Zhang, X. & Draguhn, A. The role of APP and APLP for synaptic transmission, plasticity, and network function: lessons from genetic mouse models. *Exp. Brain Res.* **217**, 435–440 (2012).
9. Marchetti, C. & Marie, H. Hippocampal synaptic plasticity in Alzheimer's disease: what have we learned so far from transgenic models? *Rev. Neurosci.* **22**, 373–402 (2011).
10. Dawson, G. R. *et al.* Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* **90**, 1–13 (1999).
11. Senechal, Y., Kelly, P. H. & Dev, K. K. Amyloid precursor protein knockout mice show age-dependent deficits in passive avoidance learning. *Behav. Brain Res.* **186**, 126–132 (2008).
12. Seabrook, G. R. *et al.* Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology* **38**, 349–359 (1999).
13. Zhang, X. *et al.* Impaired theta-gamma coupling in APP-deficient mice. *Sci. Rep* **6**, 21948 (2016).
14. Born, H. A. *et al.* Genetic suppression of transgenic APP rescues Hypersynchronous network activity in a mouse model of Alzeimer's disease. *J. Neurosci.* **34**, 3826–3840 (2014).
15. Palop, J. J. & Mucke, L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat. Neurosci.* **13**, 812–818 (2010).
16. Isaacson, J. S. & Scanziani, M. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron* **72**, 231–243 (2011).
17. Tsodyks, M. V., Skaggs, W. E., Sejnowski, T. J. & McNaughton, B. L. Paradoxical effects of external modulation of inhibitory interneurons. *J. Neurosci.* **17**, 4382–4388 (1997).
18. Troyer, T. W., Krukowski, A. E., Priebe, N. J. & Miller, K. D. Contrast-invariant orientation tuning in cat visual cortex: thalamocortical input tuning and correlation-based intracortical connectivity. *J. Neurosci.* **18**, 5908–5927 (1998).
19. Froemke, R. C. Plasticity of cortical excitatory-inhibitory balance. *Annu. Rev. Neurosci.* **38**, 195–219 (2015).
20. Kaila, K., Price, T. J., Payne, J. A., Puskarjov, M. & Voipio, J. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 637–654 (2014).
21. Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R. & Gaiarsa, J. L. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J. Physiol* **416**, 303–325 (1989).
22. Cherubini, E., Gaiarsa, J. L. & Ben-Ari, Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.* **14**, 515–519 (1991).
23. Ben-Ari, Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 728–739 (2002).
24. Valeeva, G., Tressard, T., Mukhtarov, M., Baude, A. & Khazipov, R. An Optogenetic Approach for Investigation of Excitatory and Inhibitory Network GABA Actions in Mice Expressing Channelrhodopsin-2 in GABAergic Neurons. *J. Neurosci.* **36**, 5961–5973 (2016).
25. Payne, J. A., Stevenson, T. J. & Donaldson, L. F. Molecular characterization of a putative K-Cl cotransporter in rat brain. A neuronal-specific isoform. *J. Biol. Chem.* **271**, 16245–16252 (1996).
26. Blaesse, P., Airaksinen, M. S., Rivera, C. & Kaila, K. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* **61**, 820–838 (2009).
27. Rivera, C. *et al.* The K^{+}/Cl^{-} co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* **397**, 251–255 (1999).
28. Lisman, J. E. & Jensen, O. The theta-gamma neural code. *Neuron* **77**, 1002–1016 (2013).
29. Deidda, G. *et al.* Reversing excitatory GABAAR signaling restores synaptic plasticity and memory in a mouse model of Down syndrome. *Nat. Med* **21**, 318–326 (2015).
30. Dierssen, M. Down syndrome: the brain in trisomic mode. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 844–858 (2012).
31. Patterson, D. *et al.* Mapping of the gene encoding the beta-amyloid precursor protein and its relationship to the Down syndrome region of chromosome 21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8266–8270 (1988).
32. Uvarov, P. *et al.* A novel N-terminal isoform of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J. Biol. Chem.* **282**, 30570–30576 (2007).

33. Ludwig, A., Li, H., Saarma, M., Kaila, K. & Rivera, C. Developmental up-regulation of KCC2 in the absence of GABAergic and glutamatergic transmission. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 3199–3206 (2003).
34. Connor, J. A., Tseng, H. Y. & Hockberger, P. E. Depolarization- and transmitter-induced changes in intracellular Ca2+ of rat cerebellar granule cells in explant cultures. *J. Neurosci.* **7**, 1384–1400 (1987).
35. Yuste, R. & Katz, L. C. Control of postsynaptic Ca2+ influx in developing neocortex by excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Neuron* **6**, 333–344 (1991).
36. Wang, J., Reichling, D. B., Kyrozis, A. & MacDermott, A. B. Developmental loss of. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 1275–1280 (1994).
37. Ganguly, K., Schinder, A. F., Wong, S. T. & Poo, M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic responses from excitation to inhibition. *Cell* **105**, 521–532 (2001).
38. Soriano, J., Rodriguez, M. M., Tlusty, T. & Moses, E. Development of input connections in neural cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 13758–13763 (2008).
39. Mehta, A. K. & Ticku, M. K. An update on GABAA receptors. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **29**, 196–217 (1999).
40. Laurie, D. J., Wisden, W. & Seeburg, P. **H**. The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J. Neurosci.* **12**, 4151–4172 (1992).
41. Yang, L., Wang, Z., Wang, B., Justice, N. J. & Zheng, H. Amyloid precursor protein regulates Cav1.2 L-type calcium channel levels and function to influence GABAergic short-term plasticity. *J. Neurosci.* **29**, 15660–15668 (2009).
42. Payne, J. A. Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K+]o regulation. *Am. J. Physiol* **273**, C1516–C1525 (1997).
43. Wasco, W. *et al.* Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10758–10762 (1992).
44. von Koch, C. S. *et al.* Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging* **18**, 661–669 (1997).
45. Heber, S. *et al.* Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J. Neurosci.* **20**, 7951–7963 (2000).
46. Cao, X. & Sudhof, T. C. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* **293**, 115–120 (2001).
47. Li, Y. M. *et al.* Photoactivated gamma-secretase inhibitors directed to the active site covalently label presenilin 1. *Nature* **405**, 689–694 (2000).
48. Uvarov, P., Ludwig, A., Markkanen, M., Rivera, C. & Airaksinen, M. S. Upregulation of the neuron-specific K^+/Cl^- cotransporter expression by transcription factor early growth response 4. *J. Neurosci.* **26**, 13463–13473 (2006).
49. Markkanen, M., Uvarov, P. & Airaksinen, M. S. Role of upstream stimulating factors in the transcriptional regulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *Brain Res.* **1236**, 8–15 (2008).
50. Farrant, M. & Kaila, K. The cellular, molecular and ionic basis of GABA(A) receptor signalling. *Prog. Brain Res.* **160**, 59–87 (2007).
51. Hyde, T. M. *et al.* Expression of GABA signaling molecules KCC2, NKCC1, and GAD1 in cortical development and schizophrenia. *J. Neurosci.* **31**, 11088–11095 (2011).
52. Vanhatalo, S. *et al.* Slow endogenous activity transients and developmental expression of K^+-Cl^- cotransporter 2 in the immature human cortex. *Eur. J. Neurosci* **22**, 2799–2804 (2005).
53. Clayton, G. H., Owens, G. C., Wolff, J. S. & Smith, R. L. Ontogeny of cation-Cl- cotransporter expression in rat neocortex. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **109**, 281–292 (1998).
54. Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M. & Noble-Hausslein, L. J. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog. Neurobiol.* **106–107**, 1–16 (2013).
55. Chen, M. *et al.* APP modulates KCC2 expression and function in hippocampal GABAergic inhibition. *Elife* **6** (2017).
56. Dierssen, M. Down syndrome: the brain in trisomic mode. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 844–858 (2012).
57. Reeves, R. H. *et al.* A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat. Genet.* **11**, 177–184 (1995).
58. Deidda, G. *et al.* Early depolarizing GABA controls critical-period plasticity in the rat visual cortex. *Nat. Neurosci.* **18**, 87–96 (2015).
59. Seo, H. & Isacson, O. Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down's model mice. *Exp. Neurol.* **193**, 469–480 (2005).
60. Jean-Xavier, C., Mentis, G. Z., O'Donovan, M. J., Cattaert, D. & Vinay, L. Dual personality of GABA/glycine-mediated depolarizations in immature spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 11477–11482 (2007).
61. Doyon, N., Vinay, L., Prescott, S. A. & De, K. Y. Chloride Regulation: A Dynamic Equilibrium Crucial for Synaptic Inhibition. *Neuron* **89**, 1157–1172 (2016).
62. Medina, I. *et al.* Current view on the functional regulation of the neuronal K(+)-Cl(−) cotransporter KCC2. *Front Cell Neurosci* **8**, 27 (2014).
63. Santos, S. F., Tasiaux, B., Sindic, C. & Octave, J. N. Inhibition of neuronal calcium oscillations by cell surface APP phosphorylated on T668. *Neurobiol. Aging* **32**, 2308–2313 (2011).
64. Khalifa, N. B. *et al.* What is the role of amyloid precursor protein dimerization? *Cell Adh. Migr* **4**, 268–272 (2010).
65. Lagostena, L. *et al.* In the adult hippocampus, chronic nerve growth factor deprivation shifts GABAergic signaling from the hyperpolarizing to the depolarizing direction. *J. Neurosci.* **30**, 885–893 (2010).
66. Manavalan, A., Mishra, M., Sze, S. K. & Heese, K. Brain-site-specific proteome changes induced by neuronal P60TRP expression. *Neurosignals* **21**, 129–149 (2013).
67. Liu, Z., Neff, R. A. & Berg, D. K. Sequential interplay of nicotinic and GABAergic signaling guides neuronal development. *Science* **314**, 1610–1613 (2006).
68. Friedman, D., Honig, L. S. & Scarmeas, N. Seizures and epilepsy in Alzheimer's disease. *CNS. Neurosci. Ther* **18**, 285–294 (2012).
69. Li, Y. *et al.* Implications of GABAergic Neurotransmission in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* **8**, 31 (2016).
70. Ben-Ari, Y. Is birth a critical period in the pathogenesis of autism spectrum disorders? *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 498–505 (2015).
71. He, Q., Nomura, T., Xu, J. & Contractor, A. The developmental switch in GABA polarity is delayed in fragile X mice. *J. Neurosci.* **34**, 446–450 (2014).
72. Nabekura, J. *et al.* Reduction of KCC2 expression and GABAA receptor-mediated excitation after *in vivo* axonal injury. *J. Neurosci.* **22**, 4412–4417 (2002).
73. Gentleman, S. M., Nash, M. J., Sweeting, C. J., Graham, D. I. & Roberts, G. W. Beta-amyloid precursor protein (beta APP) as a marker for axonal injury after head injury. *Neurosci. Lett.* **160**, 139–144 (1993).
74. Li, H. *et al.* KCC2 interacts with the dendritic cytoskeleton to promote spine development. *Neuron* **56**, 1019–1033 (2007).
75. Lee, K. J. *et al.* Beta amyloid-independent role of amyloid precursor protein in generation and maintenance of dendritic spines. *Neuroscience* **169**, 344–356 (2010).
76. Tyan, S. H. *et al.* Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Mol. Cell Neurosci.* **51**, 43–52 (2012).
77. Zheng, H. *et al.* beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* **81**, 525–531 (1995).
78. Pierrot, N. *et al.* Amyloid precursor protein controls cholesterol turnover needed for neuronal activity. *EMBO Mol. Med.* **5**, 608–625 (2013).
79. Salmon, P. & Trono, D. Production and titration of lentiviral vectors. *Curr. Protoc. Hum. Genet.* Chapter 12, Unit (2007).
80. Pickering, M., Pickering, B. W., Murphy, K. J. & O'Connor, J. J. Discrimination of cell types in mixed cortical culture using calcium imaging: a comparison to immunocytochemical labeling. *J. Neurosci. Methods* **173**, 27–33 (2008).

Acknowledgements

This work was supported by the Belgian Fonds pour la Recherche Scientifique (FNRS-FRS), Interuniversity Attraction Poles Programme-Belgian State-Belgian Science Policy (PAI/IAP), The Belgian Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (FRSM), the Queen Elisabeth Medical Foundation (FMRE) and the Fondation pour la Recherche sur la Maladie d'Alzheimer (SAO/FRA). The T4 deposited at the DSHB by Lytle, C./Forbush III, B. (DSHB Hybridoma Product T4) is maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242. We thank the Netherlands Brain Bank (NBB) for providing human brain samples. We thank Pr. T. Michiels (de Duve Institute, Brussels, Belgium) for the generous gift of pTM898neo and lentiviral packaging (gag-pol, rev, and VsVg) plasmids. We thank also J. Kerr for his help, and M. Rider for his critical reading.

Author Contributions

N.P., A.D. and J.N.O. designed research. N.P., A.D., F.G. and M.O. performed primary cortical cultures, infection, biochemical experiments and GABA response analysis. R.O. performed breedings and primary cortical cultures from $App^{+/+}$ and $App^{-/-}$ mice. P.W. helped us with setting up the protocol for AAVs injection in mice. A.D. performed electrophysiological analyses. B.T. and P.G. provided technical expertise. K.A. and J.P.B. provided human brain samples from Alzheimer's disease patients. All authors critically discussed results. N.P., A.D. and J.N.O. wrote the manuscript with critical evaluation by P.G., J.P.B., I.D. and P.K.C.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-00325-2

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

© The Author(s) 2017