

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE LILLE 2

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

en Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Neurosciences

**Analyses post-génomiques : étude de l'implication
d'IL-33 et de BIN1 dans la physiopathologie de la
maladie d'Alzheimer**

Soutenue publiquement le 14 mars 2013 par

Anaïs MOUNIER

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Jean-Michel Verdier

Monsieur le Professeur Michel Simonneau

Monsieur le Professeur Dominique Campion

Monsieur le Professeur Philippe Amouyel

Monsieur le Docteur Jean-Charles Lambert

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur du laboratoire

Co-directeur de thèse

Unité INSERM U744 – Institut Pasteur de Lille

*À mes parents,
À ma famille,
À ma grand-mère,*

À David.

Je tiens en premier lieu à remercier les Professeurs Jean-Michel Verdier et Michel Simonneau d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer ce travail. Je remercie également le Professeur Dominique Campion d'avoir accepté d'assister à ma soutenance et de juger ces travaux de thèse.

Je remercie le Professeur Philippe Amouyel de son accueil au sein du laboratoire et de m'avoir ainsi permis de réaliser ces travaux de thèse dans des conditions idéales. Merci également d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse.

Je tiens particulièrement à remercier le Docteur Jean-Charles Lambert qui a encadré mes travaux dès mon arrivée au laboratoire. Merci de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur des sujets si passionnants et pour toute l'aide que tu m'as apportée durant ma thèse. Merci également pour ton dynamisme et ton enthousiasme qui ont toujours été une source de motivation pour moi ainsi que pour ta confiance, ta disponibilité et ta sympathie.

Un grand merci à Julien pour m'avoir formée lors de mon arrivée au laboratoire et pour toute l'aide et les conseils qu'il m'a apporté par la suite. Merci également de ton aide dans la rédaction de ma thèse et de ta sympathie.

Merci à toutes les personnes qui ont travaillé avec moi : Florie, Anne-Marie, Latifa, Yoann, Fancy, pour leur efficacité, leur disponibilité et leur gentillesse. Merci également à toutes les personnes qui m'ont donné de précieuses instructions pour mener à bien mes travaux. Un grand merci à Benjamin pour tout le temps passé à analyser les résultats des analyses à haut débit. Merci à tous les membres de l'équipe neuro que je n'ai pas encore cités pour tout le travail effectué sur le projet BIN1, le projet IL-33 et les autres projets en cours : Franck Hansmannel, Bart Dermaut, Pierre Dourlens, Céline Bellenguez, Florent Letronne, Florence Richard, Marc Gistelinck, Lies Vanden Broeck, Vincent Chouraki, Valérie Buiche, Cloé Dupont, Armelle Chouraki, Alexis Bretteville, Charlotte Delay ... Je remercie également chaleureusement Anne-Marie, Xavier et Yoann pour leur aide précieuse dans la correction de mon manuscrit.

Je tiens également à remercier l'équipe du laboratoire des Biopuces de l'Institut Pasteur de Lille sous la direction du Professeur Yves Lemoine pour leur collaboration dans la réalisation des analyses à haut débit. Je remercie particulièrement le Docteur David Hot, Renaud Blervaque, Ludovic Huot et Stéphanie Slupeck pour toute l'aide apportée et tout le travail effectué ainsi que pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Je remercie également les Docteurs Aline Meirhaeghe, Florence Pinet, Julie Dumont et Louisa Goumidi ainsi que les Professeurs Jean Dallongeville et Florence Richard pour leur sympathie et pour leurs précieux conseils lors de mes différentes présentations orales.

Merci à Anne-Sophie et Chantal pour leur gentillesse et pour toute l'aide apportée au cours de ces quatre années. Merci également à Nadine pour sa bonne humeur et pour avoir résolu tous les problèmes informatiques que j'ai pu rencontrer.

Enfin, je remercie tous les membres de l'unité 744 que je n'ai pas encore cité : Lionel, Rafaëlle, Maggy, Olivia, Marie, Annie, Gianni, Sabine, Marine, Michèle et tous ceux que j'oublie pour leur sympathie et pour la bonne ambiance qui règne au laboratoire. Je n'oublie par également ceux qui sont partis. Merci en particulier à Franck pour sa bonne humeur, pour ces grands moments de débats et surtout pour tout le travail fourni sur BIN1.

Je réserve maintenant cette partie à ceux qui dans ce laboratoire sont devenus des amis proches, un peu comme ma famille du Nord. J'espère que nous passerons encore pleins de bons moments ensemble après la thèse.

Émilie, merci pour ton amitié, tes conseils et pour ton soutien qui arrivait toujours au bon moment. Je regrette nos petites virées à Amazonia mais je suis contente que même depuis ton départ du labo, nous pouvons encore souvent nous voir. Merci à toi et Emeric pour tous les bons moments passés lors des soirées. Je vous souhaite plein de bonheur.

Sophie, je suis étonnée que nous n'ayons pas passé notre thèse le même jour. En tout cas, merci pour tous ces bons moments passés ensemble, pour tous nos délires et pour ta gentillesse. J'espère que nous aurons encore l'occasion de fêter notre anniversaire ensemble. Je te souhaite plein de réussite pour la suite et plein de bonheur avec Maxim.

Ludo, malgré ta fourberie tu restes celui qui a gagné le concours de gentillesse... et ce n'est pas pour rien. Merci pour tous ces bons moments, je ne me lasse pas de tes blagues (surtout celle du canard). Merci également de toute ton aide informatique ces derniers temps et pour ton soutien moral lors de la rédaction de ma thèse.

Florent, merci pour ta bonne humeur que tu gardes en toute circonstance et pour ta gentillesse qui fait que tu es toujours prêt à apporter ton aide aux autres. Malgré ta passion excessive pour les touillettes, tu es un super ami (encore plus quand tu me ramènes des macarons). Je te souhaite bonne chance pour la fin de ta thèse.

Florie, merci pour toute l'aide que tu m'a apporté au laboratoire mais aussi pour tous ces moments de rigolade qu'on a pu passer ensemble, pour ton dynamisme et pour m'avoir fait découvrir le volley (même si je ne suis pas encore au point à ce niveau là).

Merci à Amandine, ma partenaire de Zumba, pour ta bonne humeur communicative et pour toutes nos discussions et nos fous-rires. Je te souhaite bon courage pour ton master et plein de réussite pour la suite.

Marion, encore bravo pour l'obtention de ta bourse de thèse que tu as amplement méritée. Merci aussi pour ton énergie, ta gentillesse et pour tes petits gâteaux délicieux. Je te souhaite bonne chance pour la suite de ta thèse.

Justine, merci pour tous ces bons moments passés ensemble, même après que tu sois partie du laboratoire. Je te souhaite une grande réussite pour la suite de ta carrière.

Merci également à Fancy, Aude et Yoann pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Félicitations pour ces magnifiques bébés.

Il me tiens maintenant à cœur d'adresser un immense merci à ma famille sans laquelle je ne serais jamais arrivé jusque là. Merci à ma mère pour son amour et pour tout le soutien qu'elle m'a apportée au cours de mes études, même depuis que nous ne pouvons plus beaucoup nous voir à cause de la distance. Merci également à Luc, à mon père et mes petites sœurs pour leur amour, leur affection et leurs encouragements. Ma petite Salomé, merci de tout cœur d'être présente à ma soutenance. Merci à ma grand mère, qui ne pourra pas me voir soutenir ma thèse mais pour laquelle j'aurais une grosse pensée.

Merci également à ma belle famille pour leur accueil chaleureux dans le Nord et pour leur soutien.

Enfin, merci à toi David, pour ton soutien sans faille, ton réconfort et pour ton amour. Merci de m'avoir toujours encouragée, d'avoir su me remonter le moral quand j'en avais besoin et de ne t'être jamais plaints quand je rentrais tard ou quand je n'étais pas là le week-end. Merci également pour ta relecture minutieuse de mon manuscrit et pour avoir écouté tous mes exposés avec patience. Le post-doc va être une nouvelle aventure et j'ai hâte de la vivre avec toi.

RESUMÉ

Les analyses génomiques ont permis d'identifier des gènes et des protéines impliqués dans la maladie d'Alzheimer (MA). Au laboratoire, des approches différentes ont mis en évidence deux gènes différentiellement exprimés dans la maladie : le gène *IL-33*, retrouvé comme étant sous-exprimé chez les patients atteints de MA, et le gène *BIN1*, identifié par des approches de GWAS et retrouvé comme étant sur-exprimés dans le cerveau des patients.

Nous avons observé que la protéine IL-33 avait un impact sur le métabolisme du précurseur du peptide amyloïde (APP) de par sa fonction de facteur de régulation transcriptionnelle. Nous avons alors cherché à identifier les gènes modulés par IL-33 ainsi que des sites potentiels de fixation de la protéine sur l'ADN par des analyses à haut débit. Il a été observé qu'IL-33 avait une forte implication dans la transcription des gènes et pouvait agir directement sur l'ADN de par son impact sur les histones. De plus, IL-33 augmenterait l'expression de la préséniline 2, ce qui expliquerait alors son impact sur le métabolisme de l'APP.

Nous avons identifié un polymorphisme fonctionnel dans la région régulatrice du gène *BIN1* associé à la maladie et pouvant expliquer la variation de son expression retrouvée dans le cerveau des patients. Nous avons également retrouvé une interaction de la protéine BIN1 avec Tau. *BIN1* est alors le premier déterminant génétique de la MA retrouvé comme étant associé à Tau et pourrait expliquer le lien entre la pathologie amyloïde et la pathologie Tau.

Nos analyses nous ont donc permis, à partir des résultats d'analyses génomiques, de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la MA.

MOTS CLÉS

Maladie d'Alzheimer, analyses génomiques, IL-33, transcriptomique, polymorphisme, BIN1, Tau

TITLE

Post-genomic analyses : study of IL-33 and BIN1 involvement in Alzheimer's disease physiopathology

ABSTRACT

Genomic analyses allowed to identify genes and proteins involved in Alzheimer's Disease (AD). In the laboratory, genetic and transcriptomic approaches revealed two genes differentially expressed in AD: *IL-33* gene, found to be under-expressed in AD cases brain, and *BIN1* gene, found by GWAS analyses and over-expressed in brains of AD cases.

As regards to IL-33, we observed that this protein have an impact on amyloid precursor protein (APP) metabolism by its transcriptional regulation properties. So, we tried to identify the genes modulated by IL-33 using transcriptomic high-throughput analyses and we identified IL-33 DNA binding sites by ChIP-on-chip approaches. We observed that IL-33 was involved in gene transcription and could act directly on DNA by interaction with histones. We also observed that IL-33 increase the expression of presenilin 2, which can explain its effect on APP metabolism.

As regards to *BIN1*, we identified one functional polymorphism in regulatory region of this gene associated with AD and allowed to explain the expression variation of BIN1 in AD brains. We also found an interaction of BIN1 with Tau. So, *BIN1* would be the first genetic risk factor for AD linked to the "Tau pathway" and could explain the link between amyloid pathology and Tau pathology.

The analyses performed in the laboratory allowed to, from genomic analyses results, a better understanding of mechanisms involved in AD physiopathology.

KEYWORDS

Alzheimer's disease, genomic analyses, IL-33, transcriptomic, polymorphism, BIN1, Tau

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications et communications suivantes :

ARTICLES :

Is the urea cycle involved in Alzheimer's disease?

Franck Hansmannel*, Adeline Sillaire, M. Ilyas Kamboh, Corinne Lendon, Florence Pasquier, Didier Hannequin, Geoffroy Laumet, Anais **Mounier**, Anne-Marie Ayrat, Steven T. DeKosky, Jean-Jacques Hauw, Claudine Berr, David Mann, Philippe Amouyel, Dominique Campion, Jean-Charles Lambert. *J Alzheimers Dis.* 2010;21(3):1013-21.

Increased Expression of BIN1 Mediates Alzheimer Genetic risk by Modulating Tau Pathology.

Julien Chapuis*, Franck Hansmannel*, Marc Gistelinct*, **Anais Mounier***, Caroline Van Cauwenberghe*, Yoann Sottejeau, Kristof Van Kolen, Fancy Geller, Denise Harold, Benjamin Grenier-Boley, Yoichiro Kamatani, Benoit Delepine, Florie Demiautte, Diana Zelenika, Nadège Zommer, Pierre Dourlens, Malika Hamdane, Céline Bellenguez, Jean-François Dartigues, Jean-Jacques Hauw, Florent Letronne, Anne-Marie Ayrat, Kristel Slegers, Ann Schellens, Lies Vanden Broeck, Sebastiaan Engelborghs, Peter Paul De Deyn, Rik Vandenberghe, Michael O'Donovan, GERAD consortium, Michael Owen, Jacques Epelbaum, Marc Mercken, Erik Karran, Dominique Campion, Jean-Noel Octave, Claudine Berr, Marc Lathrop, Patrick Callaerts, David Mann, Julie Williams, Luc Buée, Ilse Dewachter, Christine Van Broeckhoven, Philippe Amouyel, Diederik Moechars, Bart Dermaut#, Jean-Charles Lambert#. In press. *Molecular Psychiatry*.

Assessment of interleukin-33 as an intracellular nuclear factor with potential transcriptional regulation properties

Anais Mounier*, Benjamin Grenier-Boley, Renaud Blervaque, Ludovic Huot, Stéphanie Slupeck, Florie Demiautte, Yoann Sottejeau, Anne-Marie Ayrat, Yves Lemoine, Julien Chapuis, Philippe Amouyel, David Hot, Jean-Charles Lambert*. En soumission

POSTERS

Involvement of IL-33 in Alzheimer's disease.

Anais Mounier, Renaud Blervaque, Ludovic Huot, Stephanie Slupek, Julien Chapuis, Anne-Marie Ayrat, Florent Letronne, Frank Hansmannel, Yves Lemoine, Philippe Amouyel, David Hot, Jean-Charles Lambert. *Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2011, Paris.*

Assessment of BIN1 involvement in the AD pathophysiological process.

Franck Hansmannel, **Anais Mounier**, Marc Gistelink, Benjamin Grenier Boley, Marie-Eve Matuski, Florent Letronne, Anne-Marie Ayrat, Frederic Checler, Luc Buée, Philippe Amouyel, Bart Dermaut, Jean-Charles Lambert. *Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2011, Paris.*

Characterisation of a new ADAM as a key player of the APP metabolism.

Florent Letronne, Geoffroy Laumet, Florie Demiautte, Morvane Colin, Anne-Marie Ayrat, David Hot, Franck Hansmannel, **Anais Mounier**, Claudine Berr, Ludovic Huot, Frederic Checler, Florence Pasquier, Jean-Jacques Hauw, Yves Lemoine, Luc Buée, David Mann, Philippe Amouyel, Jean-Charles Lambert. *Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2011, Paris.*

Genetic variants involved in regulation of BIN1 expression.

Anais Mounier, Julien Chapuis, Franck Hansmannel, Marc Gistelink, Caroline Van Cauwenberghe, Benjamin Grenier-Bolay, Yoichiro Kamatani, Benoit Delepine, Florie Demiautte, Céline Bellenguez, Florent Letronne, Anne-Marie Ayrat, Kristel Slegers, Sebastiaan Engelborghs, Peter Paul De Deyn, Marc Lathrop, Christine Van Broeckhoven, Philippe Amouyel, Diederik Moechars, Bart Dermaut, Jean-Charles Lambert. *Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2012, Vancouver.*

Bridging integrator 1 (BIN1) as a new partner of Tau ?

Julien Chapuis, **Anais Mounier**, Florie Demiautte, Yoann Sottejeau, Franck Hansmannel, Benjamin Grenier-Bolay, Céline Bellenguez, Florent Letronne, Anne-Marie Ayrat, Philippe Amouyel, Bart Dermaut, Jean-Charles Lambert. *Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2012, Vancouver.*

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS	5
INTRODUCTION	7
1) Généralités sur la maladie d'Alzheimer.....	7
1.1 Découverte de la maladie	7
1.2 Epidémiologie	7
1.2.1 Prévalence et incidence de la maladie d'Alzheimer.....	8
1.2.2 Durée de la maladie	9
2) Aspects cliniques et diagnostic de la maladie d'Alzheimer	11
2.1 Manifestations cliniques	11
2.1.1 Une altération progressive de la mémoire	11
2.1.2 Les troubles du langage	11
2.1.3 Autres troubles cognitifs et neurologiques.....	11
2.2 Diagnostic	12
2.2.1 Evaluation neuropsychologique.....	12
2.2.2 Diagnostic différentiel	13
3) Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer	14
3.1 Examen neuropathologique	14
3.2 Les dépôts amyloïdes	14
3.2.1 Formation des dépôts amyloïdes.....	15
3.2.2 Effet pathogène du peptide amyloïde	16
3.2.3 Localisation des dépôts amyloïdes aux différents stades de la maladie...	17
3.2.4 L'amyloïdogénèse	17
3.2.4.1 L'APP : du gène à la protéine	18
3.2.4.2 Fonctions cellulaires et physiologiques de l'APP	19
3.2.4.3 Le métabolisme de l'APP	20
3.2.4.3.1 Les sécrétases	21
3.2.4.3.1.1 L' α -sécrétase	21
3.2.4.3.1.2 La β -sécrétase	22
3.2.4.3.1.3 La γ -sécrétase	23
3.2.4.3.2 Régulation du niveau d'A β dans le cerveau	30
3.3 Les dégénérescences neurofibrillaires.....	31
3.3.1 Structure et composition des DNF.....	32
3.3.2 Localisation des DNF aux différents stades de la maladie	32
3.3.3 La protéine Tau	33
3.3.3.1 Structure et fonctions des différentes isoformes neuronales de Tau .	33
3.3.3.2 Modifications post-traductionnelles de la protéine Tau	35
3.3.3.2.1 Phosphorylations.....	35
3.3.3.2.2 Glycosylations	36
3.3.3.3 Implication de Tau dans la maladie d'Alzheimer	37
3.3.3.3.1 Localisation de la protéine Tau dans les DNF	37
3.3.3.3.2 Effets pathogènes des phosphorylations de Tau.....	37
3.3.3.3.3 Kinases et phosphatases impliquées	39

3.3.3.3.4 Autres mécanismes impliqués dans la pathogénicité de Tau	39
3.4 Autres lésions observées dans la maladie d'Alzheimer	40
3.4.1 L'Angiopathie amyloïde cérébrale	40
3.4.1.1 Définition	40
3.4.1.2 Voies physiopathologiques aboutissant à l'angiopathie amyloïde cérébrale.....	40
3.4.1.3 Conséquences de l'angiopathie amyloïde cérébrale.....	41
3.4.2 Artériosclérose et athérosclérose	42
3.4.3 Inflammation	42
4) La maladie d'alzheimer : une maladie complexe	43
4.1 Les formes familiales de la maladie d'Alzheimer	43
4.1.1 Mutations sur le gène <i>APP</i>	43
4.1.2 Mutations sur le gène <i>PSEN1</i>	46
4.1.3 Mutations sur le gène <i>PSEN2</i>	47
4.2 Hypothèse de la cascade amyloïde	47
4.3 Les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer	50
4.3.1 Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer	50
4.3.1.1 L'âge et le sexe	50
4.3.1.2 Facteurs socio-économiques	50
4.3.1.3 Facteurs vasculaires	51
4.3.1.4 Expositions environnementales	51
4.3.2 Déterminants génétiques de la maladie d'Alzheimer.....	51
4.3.2.1 Etudes de liaison génétique.....	52
4.3.2.2 Etudes d'association	52
4.3.2.3 Résultats des analyses génétiques.....	53
4.3.2.4 L'Apolipoprotéine E.....	54
4.3.2.4.1 Le gène <i>APOE</i> et ses différents allèles	54
4.3.2.4.2 Fonctions principales de l'ApoE	55
4.3.2.4.3 Implication de l'ApoE dans la maladie d'Alzheimer	55
4.3.2.5 Recherche d'autres déterminants génétiques par les analyses gène- candidat	58
5) Identification de gènes impliqués dans la MA par des analyses d'expression	59
5.1 Apport des analyses d'expression.....	59
5.2 Description des analyses transcriptomiques effectuées au laboratoire.....	60
5.3 L'Interleukine 33.....	63
5.3.1 Découverte d'IL-33	63
5.3.2 Une protéine qui possède deux fonctions.....	63
5.3.3 Localisation tissulaire et cellulaire d'IL-33	65
5.3.4 Signalisation et cibles d'IL-33	67
5.3.4.1 Identification d'un récepteur à IL-33.....	67
5.3.4.2 Cibles cellulaires d'IL-33	67
5.3.5 IL-33 : effet protecteur ou délétère ?	68
5.3.5.1 Infection et inflammation	68
5.3.5.2 IL-33 et maladies cardio-vasculaires.....	69
5.3.5.3 IL-33 et maladies fibroprolifératives	69
5.3.5.4 Effets d'IL-33 dans le système nerveux	70
5.4 Implication d'IL-33 dans la MA	70

5.4.1 Association d'IL-33 avec l'AAC.....	70
5.4.2 Etude de l'effet d'IL-33 sur le métabolisme de l'APP.....	71
6) Identification de déterminants génétiques de la MA grâce aux analyses sur génome entier.....	73
6.1 Les Tag-SNP et le développement des analyses à haut débit.....	73
6.1.1 Le déséquilibre de liaison.....	73
6.1.2 Haplotypes et Tag-SNP.....	74
6.1.3 Les études d'association sur génome entier (GWAS).....	75
6.2 BIN1.....	76
6.2.1 BIN1, une protéine proche de l'amphiphysine I.....	76
6.2.2 Le gène <i>BIN1</i> et ses nombreuses isoformes.....	77
6.2.3 Les isoformes neuronales de BIN1.....	78
6.2.3.1 Localisation cellulaire des isoformes neuronales de BIN1.....	79
6.2.3.2 Implication des amphiphysines 1 et 2 dans l'endocytose.....	79
6.2.3.3 Fonction de BIN1 dans le transport des endosomes.....	81
6.2.3.4 Fonction de BIN1 dans l'organisation du cytosquelette.....	81
6.2.3.5 Fonction de BIN1 dans la transduction du signal.....	81
7) Objectifs de travail.....	83
7.1 Etude de l'impact d'IL-33 dans la physiopathologie de la MA.....	83
7.2 Etude de l'implication de BIN1 dans la physiopathologie de la MA.....	83
RÉSULTATS.....	85
1) Etude de l'impact d'IL-33 dans la physiopathologie de la MA.....	85
1.1 Recherche de polymorphismes associés à la MA dans le gène <i>IL-33</i>	85
1.2 Etude des gènes régulés par IL-33.....	86
1.2.1 Présentation du travail.....	86
1.2.2 Résumé des résultats.....	87
1.3 Discussion.....	90
ARTICLE : “Assessment of Interleukin 33 as an intracellular nuclear factor with potential transcriptional regulation properties” En soumission.....	94
2) Etude de l'implication de BIN1 dans la physiopathologie de la MA.....	95
2.1 <i>BIN1</i> est différentiellement exprimé dans la maladie d'Alzheimer.....	95
2.2 Recherche de polymorphismes fonctionnels pouvant expliquer la variation d'expression de <i>BIN1</i> dans la MA.....	96
2.2.1 Identification d'une région d'intérêt en amont du gène <i>BIN1</i>	96
2.2.2 Analyse de tous les polymorphismes situés dans la région d'intérêt.....	96
2.2.3 Etude de la fonctionnalité des polymorphismes retrouvés associés à la MA.....	97
2.2.4 Etude de la fonctionnalité d'autres polymorphismes situés dans la région régulatrice du gène <i>BIN1</i> (non publié).....	98
2.3 Recherche de facteurs capables de moduler l'expression de <i>BIN1</i> (non publié).....	100
2.4 Etude de l'impact de BIN1 dans la physiopathologie de la MA.....	104
2.5 Discussion.....	106

2.5.1 Identification d'un polymorphisme fonctionnel associé à la MA et modulant l'expression de <i>BIN1</i>	106
2.5.2 Recherche de facteurs impliqués dans la modulation de l'expression de <i>BIN1</i>	107
2.5.3 Association entre l'augmentation de l'expression de <i>BIN1</i> et les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la MA.....	108
ARTICLE : «Increased Expression of BIN1 Mediates Alzheimer Genetic risk by Modulating Tau Pathology ».....	109
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	110
1) Implication d'IL-33 dans la physiopathologie de la MA	111
1.1 IL-33 et lésions vasculaires observées dans la MA.....	111
1.2 Effet d'IL-33 sur l'activité de la γ -sécrétase.....	112
1.3 Effet d'IL-33 au niveau de l'endothélium vasculaire cérébral	114
2) Implication de BIN1 dans la physiopathologie de la MA.....	117
2.1 Implication de BIN1 dans le dysfonctionnement synaptique observé dans la MA	117
2.2 Lien entre BIN1 et la toxicité de l'A β	118
2.3 Lien entre BIN1 et la toxicité médiée par Tau	119
CONCLUSION	122
REFERENCES	123

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Aβ	Peptide Amyloïde β
AAC	Angiopathie Amyloïde Cérébrale
ADAM	A Disintegrin And Metalloprotease
ADNc	ADN complémentaire
AICD	APP IntraCellular Domain
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
Aph1	Anterior pharynx defective 1
ApoE	Apolipoprotéine E
APOE	Gène codant pour l'Apolipoprotéine E
APP	Amyloid Precursor Protein
APP-CTFα	APP C-Terminal Fragment α
APP-CTFβ	APP C-Terminal Fragment β
APPsα	APP soluble α
APPsβ	APP soluble β
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BACE1	β-site APP Cleaving Enzyme 1
BACE2	β-site APP Cleaving Enzyme 2
BAR	Bin Amphiphysin Rys
BHE	Barrière Hémato Encéphalique
BIN1	Bridging Integrator 1
CamKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein Kinase II
CBM	Domaine de fixation à la chromatine
Cdk5	Cyclin-dependent kinase 5
ChIP-on-chip	Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip
CK	Caséine Kinase
CLAP	Clathrine/AP-2
CML	Cellules Musculaires Lisses
C-terminale	Carboxy-terminale
DA	Dépôts Amyloïdes
DFT	Démence Fronto-Temporale
DNF	Dégénérescences NeuroFibrillaires
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders IV
EADI	European Alzheimer's Disease Initiative
G	Guanine
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
HDL	High Density Lipoprotein
HTH	Hélice-Tour-Hélice
HEK293	Cellules épithéliales embryonnaires de rein humaines
HEK293-APP ^{695wt}	Cellules épithéliales embryonnaires de rein humaines sur-exprimant l'APP ^{695wt} de manière stable
HEV	High Endothelial Venules
IDE	Insulin Degrading Enzyme
IL-1	Interleukine 1
IL-33	Interleukine 33
Ins/Del	Insertion/Délétion
IPA	Ingenuity Pathway Analysis

KDa	Kilo Dalton
KLF15	Kruppel Like Factor 15
KPI	Kunitz Protease Inhibitor
KO	Knock Out
Kpb	kilo paires de bases
LCR	Liquide Céphalo-Rachidien
LDL	Low Density Lipoprotein
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	Microtubules-Associated Proteins
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
<i>MAPT</i>	Microtubule-Associated Protein Tau (gène)
MARK	Microtubules-Affinity-Regulating Kinase
MAZ	Myc-Associated Zinc-finger protein
MMSE	Mini-Mental State Examination
NCT	Nicastrine
NEP	Néprilysine
NF-κB	Nuclear Factor κB
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
NO	Oxyde Nitrique
N-terminal	Amino-terminal
NTID	N-terminal insert domain
OR	Odds Ratio
OTC	Ornithine TransCarbamylase
PCR	Polymerase Chain reaction
PDPK	Proline-Directed Protein Kinase
Pen2	Préséniline enhancer 2
PKA	Protéine kinase dépendante de l'AMPc
PKC	Protéine Kinase C
PLD1	PhosphoLipase D1
PP	Protein Phosphatase
PS	Préséniline
<i>PSEN1</i>	Gène codant pour la préséniline 1
<i>PSEN2</i>	Gène codant pour la préséniline 2
RE	Réticulum Endoplasmique
RNAseq	Short-read high-throughput sequencing
SH3	Src Homology 3
SKNSH-SY5Y	Cellules de neuroblastomes humaines
SKNSH-SY5Y-APP ^{695wt}	Cellules de neuroblastomes humaines sur-exprimant l'APP ^{695wt} de manière stable
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Single Nuclotide Polymorphism
SNX4	Sorting Nexin 4
Sos	Son of sevenless
SP1	Specificity Protein 1
SPZ1	Spermatogenic leucine Zipper 1
TACE	Tumor necrosis factor α Converting Enzyme
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein
ZNF	Zinc Finger Protein

INTRODUCTION

1) Généralités sur la maladie d'Alzheimer

1.1 Découverte de la maladie

Le terme de démence regroupe un ensemble de maladies neurodégénératives du système nerveux qui se traduisent par une altération globale, progressive et irréversible des fonctions cognitives supérieures. En 1906, Aloïs Alzheimer décrit les caractéristiques anatomo-cliniques d'une forme de démence qui portera son nom. Il expose le cas d'une femme, Auguste D., présentant une déficience cognitive progressive incluant notamment des troubles de la mémoire. Après la mort de la malade, le docteur Alzheimer procède à une biopsie de son cerveau et décrit la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques amyloïdes, qui deviendront des indicateurs distinctifs de la maladie d'Alzheimer (MA).

Cependant, cet état de démence a longtemps été considéré comme une affection liée au vieillissement normal. Ce n'est qu'au cours des dernières décennies que la communauté scientifique a commencé à s'intéresser à la MA. En effet, la maladie est devenue de plus en plus fréquente en raison de l'augmentation de l'espérance de vie et il s'est avéré qu'elle avait un retentissement très important sur la vie psychique, relationnelle et sociale des malades. De plus, les nouveaux outils techniques et scientifiques ont permis de mettre en évidence les acteurs intervenant dans cette maladie.

1.2 Epidémiologie

En France, plus de 850000 personnes sont atteintes de démence avec 225000 nouveaux cas recensés chaque année. Les démences constituent un problème de santé majeur et l'épidémiologie de ces affections est un des éléments essentiels pour la prise de mesures en santé publique. Plusieurs études ont alors été effectuées afin d'estimer la prévalence, l'incidence et la durée de ces démences et de proposer des projections pour un proche avenir.

1.2.1 Prévalence et incidence de la maladie d'Alzheimer

La prévalence correspond à un nombre de personnes atteintes d'une certaine maladie à un moment donné dans une population donnée. L'incidence, quant à elle, définit le nombre de nouveaux cas apparaissant dans un intervalle de temps donné. Ici, nous indiquerons la prévalence et l'incidence des démences en sachant que la MA représente 70% des démences prévalentes, les autres démences étant vasculaires (10%) et mixtes (20%).

La dernière analyse internationale reposant sur une méthodologie de consensus entre experts (Delphi consensus) nous donne une estimation au niveau mondial du nombre de cas de démence, avec 24,3 millions de cas, et près de 4,6 millions de nouveaux cas chaque année, correspondant à un nouveau cas toutes les 7 secondes [Ferri *et al.* 2005 ; Reitz *et al.* 2011]. La prévalence et l'incidence des individus de 60 ans ou plus varient selon les zones géographiques, ce qui est notamment lié au développement des pays. En effet, environ 60% des cas vivent dans des pays développés. Cependant, le nombre de cas va aussi augmenter très fortement en Chine, en Inde et dans d'autres pays d'Asie et du Pacifique Ouest (Tableau 1). Le nombre de cas attendus va doubler tous les 20 ans, avec plus de 80 millions de cas en 2040. Ces chiffres sont en accord avec ceux proposés à partir de la méta-analyse de Wimo qui, de 25 millions de cas en 2000, en prévoit 63 millions en 2030 et 114 millions en 2050 dont 84 dans les régions les moins développées [Wimo *et al.* 2003].

Tableau 1 : Prévalence et incidence des démences dans les régions développées et les régions en cours de développement. D'après les données de Ferri *et al.*

Région	Prévalence des démences à un âge ≥60 ans (en %)	Incidence annuelle des démences estimée pour 1000 individus	Personnes démentes de 60 ans ou plus en 2001 (en millions)	% d'augmentation du nombre de personnes démentes de 2001 à 2040
Europe de l'Ouest	5.4	8.8	4.9	102
Europe de l'Est (avec faible taux de mortalité)	3.8	7.7	1.0	169
Europe de l'Est (avec fort taux de mortalité)	3.9	8.1	1.8	84
Amérique du Nord	6.4	10.5	3.4	172
Amérique Latine	4.6	9.2	1.8	393
Afrique du Nord et le Centre-Est en développement	3.6	7.6	1.0	385
Pacifique Ouest développé	4.3	7.0	1.5	189
Chine et Pacifique Ouest développé	4.0	8.0	6.0	336
Indonésie, Thaïlande et Sri Lanka	2.7	5.9	0.6	325
Inde et Sud de l'Asie	1.9	4.3	1.8	314
Afrique	1.6	3.5	0.5	235
Valeurs combinées	3.9	7.5	24.3	234

Ainsi, de plus en plus de personnes seront atteintes de la MA dans le monde. Ceci est dû à un vieillissement de la population, avec une augmentation de l'espérance de vie. En effet, de nombreuses études ont montré que la prévalence et l'incidence de la MA augmentaient fortement avec l'âge. Des études dans des populations européennes ont par exemple estimé une prévalence de 6,4% pour les sujets âgés de plus de 65 ans [Lobo *et al.* 2000] alors qu'elle est estimée à 17,8% chez les plus de 75 ans dans une étude française [Ramaroson *et al.* 2003]. Toutes les études effectuées sur l'incidence de la maladie indiquent également une augmentation de celle-ci avec l'âge [Reitz *et al.* 2011].

1.2.2 Durée de la maladie

La majorité des études indiquent que la démence diminue l'espérance de vie des malades [Aguero-Torres *et al.* 1999 ; Wolfson *et al.* 2001 ; Helmer *et al.* 2001]. Cependant, les données de la littérature concernant la durée de survie des sujets déments sont très variables. En effet, ces données, souvent obtenues à partir d'échantillons de déments suivis dans des centres spécialisés, sont fréquemment surestimées, mettant en évidence des durées de survie pouvant aller de 5 à 10 ans.

Les études en population restent la meilleure approche pour évaluer correctement la durée de survie. Dans la *Canadian study of aging*, la médiane de survie a été estimée à 3,3 ans avec un intervalle de confiance entre 2,7 et 4 ans [Aguero-Torres *et al.* 1999 ; Wolfson *et al.* 2001 ; Helmer *et al.* 2001].

Traiter et soigner les personnes atteintes de démence dans le monde coûte actuellement plus de 604 milliards de dollars US chaque année. Cette somme prend en compte la fourniture de soins de santé et d'une assistance sociale, ainsi que la réduction ou la perte de revenus pour les malades et les personnes leur prodiguant les soins. À ce jour, seuls huit pays ont un programme national de lutte contre la démence. Dans un nouveau rapport, *Dementia: a public health priority*, publié par l'Organisation Mondiale de la Santé et Alzheimer's Disease International, il a été estimé que l'absence de diagnostic était un problème majeur. En effet, même dans les pays à revenu élevé, on ne dépiste ordinairement qu'entre un cinquième et la moitié des cas de démence. Quand un diagnostic est posé, il intervient souvent à un stade relativement avancé de la maladie. Il est donc crucial de permettre d'améliorer l'efficacité de ce diagnostic et celui-ci passe par la reconnaissance des signes cliniques de la MA.

2) Aspects cliniques et diagnostic de la maladie d'Alzheimer

2.1 Manifestations cliniques

2.1.1 Une altération progressive de la mémoire

Le premier symptôme que l'on peut identifier dans la maladie est une altération de la mémoire épisodique qui correspond à une remémoration des événements vécus personnellement, replacés dans leur contexte spatial, temporel et émotionnel. Ainsi, le patient pourra se souvenir sans problème d'événements anciens alors qu'il ne se rappellera plus de ce qu'il a fait quelques heures plus tôt. Plus tard dans la maladie, le déficit concerne aussi la mémoire sémantique qui correspond au système mnésique par lequel l'individu stocke ses connaissances générales. Ainsi, les patients dont la mémoire sémantique est affectée ne peuvent plus avoir de conversations sensées. Même si elle est moins importante, une perte de la mémoire procédurale est aussi observée, ce qui entraîne une difficulté pour accomplir des tâches routinières telles que l'habillage ou la toilette.

2.1.2 Les troubles du langage

L'aphasie est un trouble du langage retrouvé dans la MA qui affecte l'expression et la compréhension du langage parlé, écrit ou des signes sans qu'il y ait de déficit sensoriel ou de dysfonctionnement de l'appareil phonatoire. Dans un premier temps, ce trouble se manifestera par une altération de la facilité de parole. A un stade plus avancé de la maladie, le patient aura de plus en plus de mal à trouver ses mots et les remplacera par d'autres mots n'ayant pas de lien conceptuel avec ces premiers (paraphrasie verbale) ou par des mots n'existant pas dans notre langue (néologismes). En fin d'évolution, un appauvrissement du discours est observé aussi bien au niveau qualitatif que quantitatif pour aboutir à une aphasie globale.

2.1.3 Autres troubles cognitifs et neurologiques

Durant la maladie sont également observés des troubles de la reconnaissance (agnosie) et notamment de la reconnaissance des visages (aprosognosie) ainsi que des difficultés à effectuer des mouvements sur consigne (apraxie). Les fonctions exécutives, telles que la planification, l'organisation, le raisonnement et l'anticipation seront elles aussi affectées. Enfin, d'autres troubles neurologiques peuvent

apparaître à un stade tardif de la maladie tels que des troubles de la marche ou encore l'apparition de crises d'épilepsie.

2.2 Diagnostic

Il est difficile de poser un diagnostic certain de la MA. Il faut tout d'abord définir s'il y a un syndrome démentiel. Les critères du DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders IV) permettant de confirmer ce syndrome correspondent à l'installation de troubles affectant de manière partielle ou complète la mémoire accompagnés d'une perturbation des fonctions cognitives supérieures telles que les fonctions exécutives, le langage ou la reconnaissance, ainsi que d'une altération de la personnalité. En plus de cela, le diagnostic de la MA se définit par un début insidieux et une aggravation progressive et par l'exclusion de toutes autres causes de démence. Les critères du NINCDS-ADRA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and stroke and the Alzheimer's Disease and related Disorders Association) [McKhann *et al.* 1984], plus détaillés et sélectifs, peuvent également être utilisés.

2.2.1 Evaluation neuropsychologique

Des tests psychométriques standardisés ont été mis au point pour évaluer les fonctions cognitives. Ces tests permettent de révéler un dysfonctionnement du cerveau. Le plus couramment utilisé est le test de Folstein ou MMSE (Mini-Mental State Examination) [Folstein *et al.* 1975]. Ce test, réalisable en 10 minutes environ, permet d'évaluer en peu de temps différents aspects des fonctions cognitives. Il fournit un score sur 30 et si celui-ci est inférieur à 24, un état de démence est suspecté. Cependant, l'interprétation de ce test doit tenir compte du niveau socio-culturel et de l'âge des patients. De plus, d'autres affections sont susceptibles de provoquer une diminution temporaire des fonctions cognitives mesurées dans ce test. Ainsi, les erreurs de diagnostic sont de l'ordre de 10% et portent essentiellement sur d'autres démences. Cependant, l'examen neuropsychologique repose également sur d'autres tests plus approfondis tels que le test de Grober et Buschke [Grober *et al.* 1988] qui permet d'évaluer la mémoire verbale, le test de Benton [Benton 1972] qui évalue la mémoire visuelle ou encore l'ADAS-COG ((Alzheimer's Disease Assessment Scale - Cognition) [Rosen *et al.* 1984].

Ces tests peuvent être complétés par des examens biologiques tels que la recherche de molécules spécifiques à la maladie d'Alzheimer dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou encore des techniques d'imagerie médicale. Il serait d'ailleurs possible de détecter la MA avant l'apparition de la démence si l'on combinait aux tests de mémoire l'utilisation d'appareils d'imagerie médicale modernes [Dubois *et al.* 2007]. Cependant, seul un examen post mortem permet de confirmer la maladie.

2.2.2 Diagnostic différentiel

De nombreuses affections peuvent entraîner des symptômes proches de ceux observés dans la MA, d'où la nécessité d'effectuer un diagnostic différentiel avant de poser le diagnostic de la maladie. Certains syndromes peuvent être confondus avec une démence, tels que les syndromes dépressifs ou confusionnels, mais ceux-ci sont transitoires et réversibles. Toutes les démences ne sont pas liées à la MA, mais certaines présentent des signes cliniques proches de la maladie. En effet, certaines formes de démences vasculaires, qui correspondent à un syndrome démentiel résultant d'accidents cérébro-vasculaires répétés, présentent des déficits neuropsychologiques évocateurs d'une MA. Cependant, contrairement à la MA, ces démences se caractérisent par une apparition soudaine et des lésions vasculaires cérébrales peuvent être visibles à l'IRM (Imagerie à Résonance Magnétique). Des démences dégénératives peuvent également être confondues avec celles observées dans la MA, telles que les démences fronto-temporales (DFT), les démences à corps de Lewy ou encore les démences observées dans la maladie de Parkinson ou de Creutzfeldt-Jacob. Cependant, il est possible de distinguer ces démences de celles observées dans le cadre de la MA en étudiant l'apparition des symptômes et leur progression.

Le diagnostic de la MA reste donc difficile à poser et ne peut être définitif qu'après la mort du patient. L'étude de la physiopathologie de la MA s'est alors avérée importante afin de pouvoir mieux la diagnostiquer et de trouver des cibles thérapeutiques limitant l'atteinte des fonctions cognitives chez les patients.

3) Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

3.1 Examen neuropathologique

Cet examen post-mortem va permettre de confirmer la maladie. Au niveau macroscopique, une atrophie cérébrale est observée (Figure 1), avec un élargissement des sillons et une diminution du volume des circonvolutions. Dans le cadre de la MA, l'atrophie est plutôt diffuse, bien que plus marquée au niveau de l'hippocampe. Cette atrophie est due à une perte neuronale affectant particulièrement le système cholinergique. Cependant, une atrophie du cerveau est observée au cours du vieillissement normal et un examen microscopique reste nécessaire pour confirmer le diagnostic de MA.

L'examen microscopique permet de mettre en évidence des lésions caractéristiques de la MA. En effet, deux lésions principales sont retrouvées dans cette pathologie. Il s'agit des dépôts amyloïdes (DA) et des dégénérescences neurofibrillaires (DNF). Lors de l'examen, ces lésions sont retrouvées en grande quantité dans les régions hippocampiques et corticales associatives.

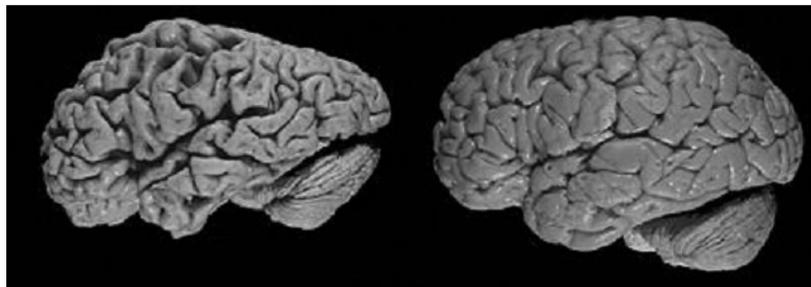


Figure 1 : Vue de cerveaux provenant d'un patient atteint de MA (à gauche) et d'un individu sain (à droite). Une atrophie des circonvolutions cérébrales est observée chez le malade, aboutissant à l'élargissement des sillons corticaux.

3.2 Les dépôts amyloïdes

Les DA sont des masses de forme sphérique, résultant de l'assemblage de protéines dénaturées, qui ont un diamètre de 5 à 100 μm et qui se situent dans le tissu nerveux à l'extérieur des neurones. A l'échelle microscopique, on peut observer que les DA sont formés de faisceaux de filaments compacts d'un diamètre de 6 à 9 nm. Il a été mis en évidence que ces dépôts sont majoritairement constitués de peptide amyloïde β ($A\beta$) [Glennner *et al.* 1984a ; Glennner *et al.* 1984b], le A signifiant amyloïde et le β correspondant à la composition particulière de cette substance en

feuilletés β plissés, lui donnant un caractère insoluble et stable. Ce peptide $A\beta$, d'une masse de 4kDa (Kilo Dalton), possède de 39 à 43 acides aminés. Il existe deux formes principales : la forme $A\beta_{x-40}$ et la forme $A\beta_{x-42}$. L'agrégation de ce peptide $A\beta$, en association avec d'autres facteurs, va entraîner la formation des plaques séniles (Figure 2).

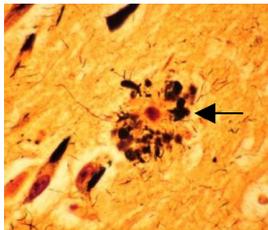


Figure 2 : Visualisation des dépôts amyloïdes dans une coupe de cerveau d'un patient atteint de MA par immunomarquage avec un anticorps reconnaissant l' $A\beta_{x-42}$. La flèche désigne une plaque sénile.

3.2.1 Formation des dépôts amyloïdes

La formation des fibres est un mécanisme complexe. La rapidité de l'agrégation dépend de la concentration et du type des peptides $A\beta$. En effet, le peptide $A\beta_{1-42}$, plus hydrophobe et plus neurotoxique que l' $A\beta_{1-40}$, serait le premier à s'agréger. Au départ, on observe alors des dépôts diffus d' $A\beta_{1-42}$ puis l' $A\beta_{1-40}$ vient s'accumuler au niveau des plaques séniles.

L' $A\beta$ existe sous forme de monomères, de dimères ou d'oligomères [Walsh *et al.* 2000] et leur agrégation produit des protofibrilles puis des fibrilles à part entière qui semblent composer la plus grande partie des plaques amyloïdes dans le tissu nerveux [Walsh *et al.* 1999]. Dans des conditions normales, il existe un équilibre entre les formes monomériques et dimériques d' $A\beta$. Quand l'équilibre est rompu, il se déplace vers la formation de protofibrilles, par association des dimères. Les protofibrilles forment la base des dépôts où viennent se fixer les peptides $A\beta$ et/ou d'autres protofibrilles (Figure 3) [Kirkkitadze *et al.* 2005]. Ce processus pourrait alors entraîner la formation des fibrilles amyloïdogéniques toxiques. Des expérimentations ont montré que l'agrégation en fibrilles est dépendante du temps et de la concentration [Harper *et al.* 1997]. Ces caractéristiques sont en accord avec deux facteurs de risque observés dans la MA : l'âge et une augmentation de la production de fragments fibrillogènes $A\beta_{1-42}$ dans les formes familiales de la MA [Younkin 1995]. La formation des fibrilles est néanmoins un processus très complexe et de nombreuses études cherchent à analyser en détail les mécanismes impliqués dans la fibrillogénèse [Milhiet *et al.* 2010 ; Suzuki *et al.* 2012].

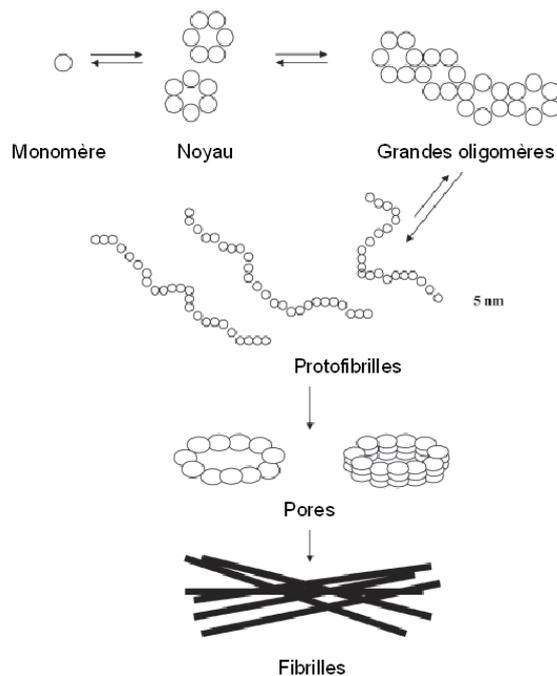


Figure 3 : Mécanisme expliquant la formation des fibrilles selon Kirkitadze et Kowalska.

3.2.2 Effet pathogène du peptide amyloïde

De nombreuses études ont montré la toxicité des dépôts fibrillaires d'A β sur les cellules. En effet, il a été observé que la présence d'agrégats fibrillaires de peptide A β au niveau des neurones entraîne une dystrophie des neurites et une perte neuronale [Pike *et al.* 1991 ; Pike *et al.* 1992 ; Busciglio *et al.* 1992]. Des études ont également montré que les effets du peptide A β étaient dépendants de son état d'agrégation. En effet, le degré de fibrillogénèse et la conformation en feuillet β du peptide A β sont déterminants pour son effet neurotoxique [Simmons *et al.* 1994 ; Howlett *et al.* 1995].

Cependant, de plus en plus de travaux indiquent que l'A β soluble ainsi que les A β sous forme d'oligomères sont également impliqués dans des processus neurotoxiques [Selkoe 2001] et observent même que ces formes oligomériques sont plus toxiques que les formes fibrillaires [Cleary *et al.* 2005 ; Kawarabayashi *et al.* 2004 ; Walsh *et al.* 2004]. Les dimères d'A β pouvant être relâchés d'oligomères de haut poids moléculaire et d'agrégats insolubles sont ainsi les formes les plus capables d'inhiber la transmission synaptique [Shankar *et al.* 2008].

3.2.3 Localisation des dépôts amyloïdes aux différents stades de la maladie

On distingue trois stades appelés stades de Braak A, B et C, selon l'importance des dépôts. Lors du stade A, des dépôts sont retrouvés dans les portions basales des lobes temporaux, frontaux et occipitaux, mais ne sont pas présents dans l'hippocampe. Au stade B, quelques dépôts sont retrouvés au niveau de l'hippocampe dans la couche pyramidale du CA1 (CA pour « Corne d'Ammon ») et au niveau du subiculum. Des DA sont retrouvés à une densité moyenne dans presque l'ensemble de l'isocortex. Seules les aires sensorielles et motrices primaires ne sont pas touchées. Au stade C, l'ensemble de l'isocortex est touché et les dépôts dans l'hippocampe sont similaires à ceux observés au stade B (Figure 4) [Braak *et al.* 1991].

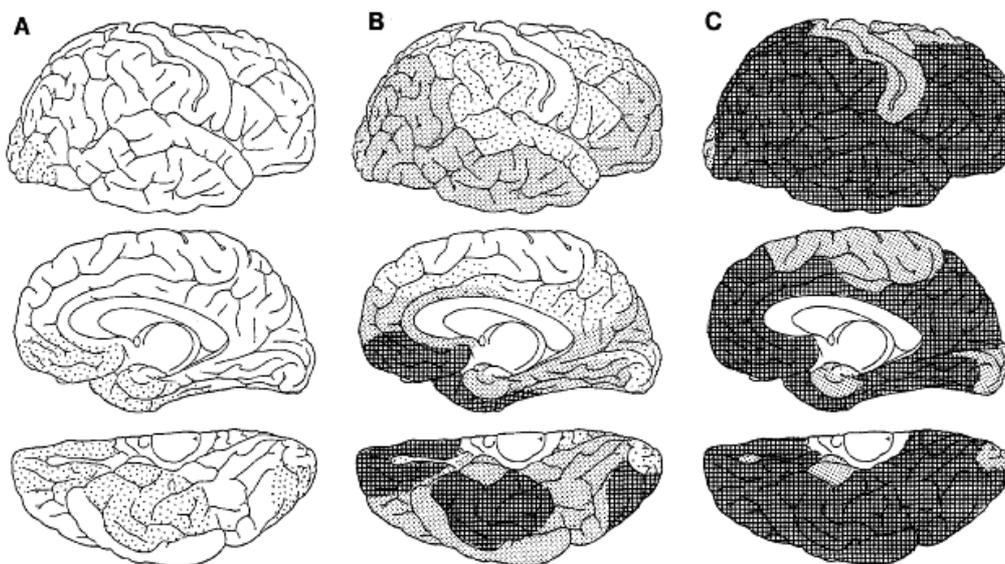


Figure 4 : Distribution topographique des dépôts amyloïdes aux différents stades de la maladie selon Braak et Braak. L'intensité de coloration correspond à la concentration des dépôts.

3.2.4 L'amyloïdogénèse

Le peptide amyloïde prend une part importante dans la physiopathologie de la MA et il a été observé que celui-ci était issu du clivage d'une protéine membranaire que l'on a ainsi nommée Amyloid Precursor Protein (APP). L'étude du métabolisme de cette protéine a donc été d'une importance capitale pour comprendre les mécanismes aboutissant à la formation des DA.

3.2.4.1 L'APP : du gène à la protéine

Le gène codant pour l'APP se situe sur le bras long du chromosome 21 en position q21.3-q22.1. Il mesure 400 kilobases (Kpb) et comporte 18 exons, dont les épissages alternatifs peuvent produire jusqu'à 11 ARN messagers (ARNm) différents. Ce gène code pour une protéine transmembranaire de type I, qui ne possède qu'un seul domaine transmembranaire, un large domaine extra-cellulaire et une courte région cytoplasmique. Bien que l'expression de l'APP soit ubiquitaire, 4 isoformes sont spécifiquement retrouvées dans le système nerveux central (SNC). Ces isoformes résultent de l'épissage alternatif des exons 7 et 8 du gène *APP* et possèdent 695, 714, 751 ou 770 acides aminés. Toutes les isoformes possèdent le peptide A β qui est codé par les exons 16 et 17 [Kitaguchi *et al.* 1988 ; König *et al.* 1992]. Les différentes isoformes de l'APP se distinguent par la présence ou non d'un domaine inhibiteur de protéases de type Kunitz (KPI) et d'un domaine d'homologie avec l'antigène OX2 codé par l'exon 8 dans la partie Amino-terminale de la protéine (N-terminale) [Selkoe *et al.* 1988] (Figure 5). Les neurones expriment principalement l'isoforme 695, qui est la seule à laquelle il manque les domaines KPI et OX2, et à un plus faible niveau l'isoforme 751 [Bahmanyar *et al.* 1987 ; Schmechel *et al.* 1988]. Les isoformes 714 et 770 sont quant à elles majoritairement exprimées par les cellules gliales, les astrocytes et la microglie [Tanaka *et al.* 1988 ; Golde *et al.* 1990].

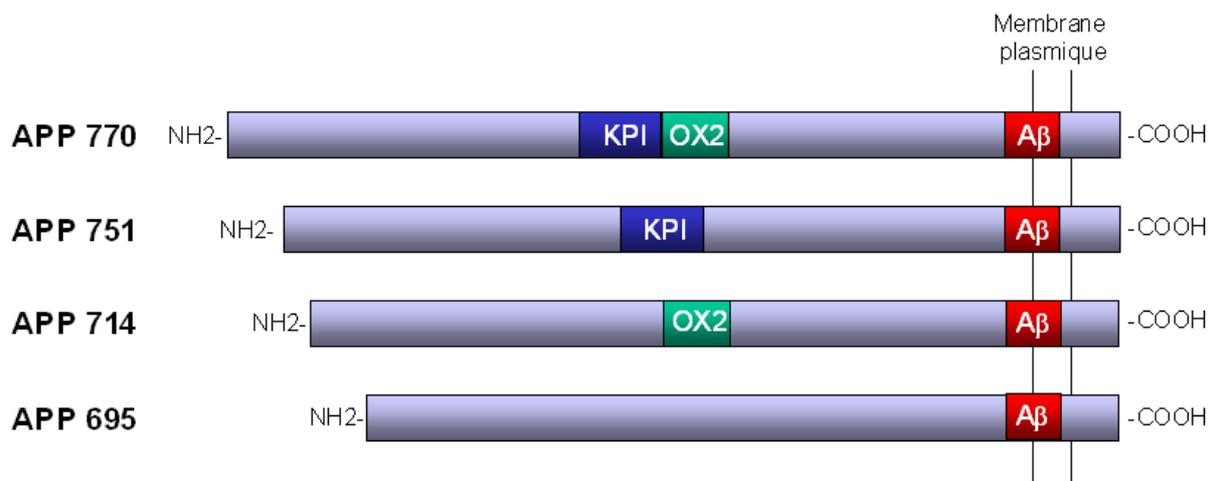


Figure 5 : Représentation schématique des isoformes de l'APP présentes dans le SNC

Une fois produit, l'APP va emprunter la voie de sécrétion classique. Durant son transit, la protéine va être soumise à des modifications post-traductionnelles telles que des O/N-glycosylations [Weidemann *et al.* 1989], des phosphorylations, des tyrosyl-sulfatations [Schubert *et al.* 1989] et des sialylations [Oltersdorf *et al.* 1990].

3.2.4.2 Fonctions cellulaires et physiologiques de l'APP

L'APP est localisé à la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi ainsi qu'à la membrane plasmique [Caporaso *et al.* 1994 ; Tomimoto *et al.* 1995] au niveau des synapses [Kirazov *et al.* 2001] et plus particulièrement au niveau post-synaptique des axones et des dendrites [Shigematsu *et al.* 1992]. L'APP pourrait être un récepteur de surface couplé aux protéines G₀ [Okamoto *et al.* 1995] et ainsi être impliqué dans la transduction du signal. Ce récepteur serait capable de former des homodimères [Scheuermann *et al.* 2001] et des hétérodimères avec le récepteur Notch [Chen *et al.* 2006] et être impliqué de cette manière dans la transduction du signal. Des études ont d'ailleurs montré que la dimérisation de l'APP pouvait influencer la production d'A β [Kienlen-Campard *et al.* 2008]. L'APP pourrait également former des dimères avec des protéines homologues appelées APLP1 et 2 (Amyloid Precursor Like Protein), ce qui jouerait un rôle dans l'adhésion cellulaire [Soba *et al.* 2005]. Son implication dans l'adhésion et la motilité cellulaire passerait également par sa co-localisation avec de nombreuses molécules d'adhésion telles que la β -1-intégrine [Storey *et al.* 1996] et la télencéphaline [Annaert *et al.* 2001] et de par son couplage au cytosquelette [Sabo *et al.* 2001]. Enfin, il a été mis en évidence que l'APP était impliqué dans le transport axonal antérograde des vésicules [Gunawardena *et al.* 2001].

Ces effets cellulaires indiquent un impact de l'APP sur la transmission et la plasticité synaptique. Plusieurs études de souris déficientes (KO pour « Knock Out ») pour le gène *APP* ont en effet mis en évidence son importance dans ces mécanismes [Dawson *et al.* 1999 ; Seabrook *et al.* 1999]. L'APP jouerait également un rôle important dans les processus d'apprentissage et de mémorisation [Huber *et al.* 1997]. Au niveau des tissus périphériques, la protéine aurait un impact dans la régulation de la coagulation et l'agrégation plaquettaire de par son domaine KPI [Godfroid *et al.* 1990].

L'APP possède donc de nombreuses fonctions au niveau cérébral, notamment lorsqu'il est situé à la membrane plasmique. Cependant, seul un faible pourcentage des APP initialement produits atteint la membrane plasmique. Environ 70% d'entre eux sont alors internalisés dans les minutes qui suivent leur arrivée à la membrane plasmique. Une fois endocyté, l'APP est délivré vers les lysosomes ou endosomes tardifs pour y être dégradé. Une fraction des molécules endocytées peut aussi être recyclée à la surface cellulaire [Vetrivel *et al.* 2006].

3.2.4.3 Le métabolisme de l'APP

Lors de son transit dans la voie sécrétoire, l'APP est soumis à de nombreuses coupures enzymatiques, ce qui aboutit à la production de plusieurs métabolites. Le métabolisme de l'APP est caractérisé par deux voies distinctes : une voie non amyloïdogénique qui n'aboutit pas à la formation du peptide A β et une voie amyloïdogénique qui entraîne la formation de peptide A β et qui est ainsi impliquée dans la physiopathologie de la MA. La voie non amyloïdogénique est la plus importante dans la majorité des types cellulaires. Cependant, la voie amyloïdogénique est prédominante dans les neurones.

Ces voies diffèrent par les enzymes impliquées dans le clivage de l'APP. Ainsi, la voie non amyloïdogénique fait intervenir deux sécrétases qui sont l' α -sécrétase et la γ -sécrétase alors que la voie amyloïdogénique fait également intervenir deux sécrétases mais se distingue par l'action de la β -sécrétase à la place de l' α -sécrétase. Ainsi, les produits de ces coupures vont être différents selon la voie métabolique engagée. Dans la voie non amyloïdogénique, les deux clivages engendrent la production de 3 fragments qui sont l'APP soluble α (APPs α), le domaine AICD (APP IntraCellular Domain) et le peptide P3. Dans la voie amyloïdogénique, sur les trois fragments générés, deux diffèrent de ceux produits dans la voie non pathogène : l'APP soluble β (APPs β) et le peptide A β qui est le constituant majeur des DA. Les clivages intervenant dans ces deux voies métaboliques et les produits générés sont représentés sur la Figure 6. Les sécrétases jouent donc un rôle clé dans la physiopathologie de la MA.

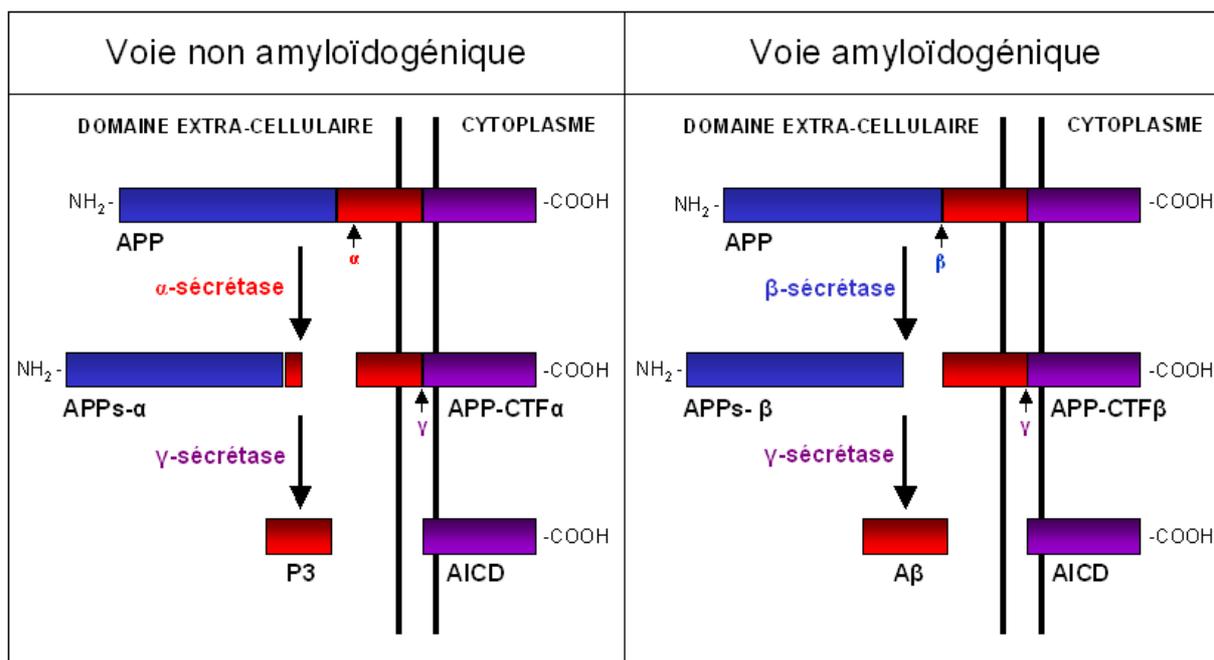


Figure 6 : Schéma représentant les enzymes impliquées et les fragments générés pour la voie non amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique du métabolisme de l'APP.

3.2.4.3.1 Les sécrétases

3.2.4.3.1.1 L'α-sécrétase

L'activité α-sécrétase caractérise la voie non amyloïdogénique car son clivage s'effectue au sein du peptide amyloïde, aboutissant à la génération de l'APPsα et de l'APP-CTFα (APP C-Terminal Fragment α) (Figure 6). En effet, il a été observé que l'APP⁶⁹⁵ était clivé par l'α-sécrétase entre la lysine 613 et la leucine 614, qui correspondent aux acides aminés 16 et 17 du domaine Aβ. Le clivage de l'APP par l'α-sécrétase aurait un rôle protecteur, d'une part grâce au clivage au sein de l'Aβ et d'autre part car l'APPsα libéré suite à ce clivage semble avoir un effet neuroprotecteur et stimuler la croissance [Ring *et al.* 2007]. Deux voies α-sécrétase distinctes sont retrouvées : la voie sécrétoire constitutive et la voie de sécrétion régulée qui est sous le contrôle de la protéine kinase C (PKC) et qui conduit à la fois à la réduction de la production de peptide Aβ et à l'augmentation de la production d'APPsα [Gillespie *et al.* 1992 ; Vingtdeux *et al.* 2012].

Les enzymes responsables de l'activité α-sécrétase sont des métalloprotéases à zinc qui appartiennent à la famille des ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) [Parvathy *et al.* 1997]. Parmi les protéines appartenant à cette famille, 3 ont été proposées comme possédant une activité α-sécrétase : ADAM9, ADAM10 et

ADAM17. La première à avoir été identifiée est ADAM17, qui est également appelée TACE pour « Tumor necrosis factor α Converting Enzyme » [Black *et al.* 1997 ; Moss *et al.* 1997]. Il a été observé, chez des souris KO pour TACE, une diminution de la sécrétion d'APPs α , ce qui conforte l'idée selon laquelle cet enzyme pourrait cliver l'APP [Buxbaum *et al.* 1998]. De plus, son activité serait régulée par la PKC, ceci indiquant qu'elle est impliquée dans la voie de sécrétion régulée [Buxbaum *et al.* 1998]. Néanmoins, des études ont indiqué que TACE pouvait également avoir un faible impact dans le clivage constitutionnel [Slack *et al.* 2001]. ADAM9, quant à elle, agirait également sur la sécrétion d'APPs α [Koike *et al.* 1999] et serait uniquement impliquée dans la voie de sécrétion régulée par la PKC [Kuhn *et al.* 2010]. En revanche, ADAM10 serait impliquée dans la voie sécrétoire constitutive [Kuhn *et al.* 2010 ; Jorissen *et al.* 2010].

En dehors du SNC, l'APP est préférentiellement clivé par l' α -sécrétase [Weidemann *et al.* 1999]. Au niveau du cerveau, plusieurs études ont montré que l'augmentation de l'activité α -sécrétase entraîne une diminution de l'activité β -sécrétase et une diminution de la production d'A β [Skovronsky *et al.* 2000]. Une augmentation de cette activité pourrait donc être une bonne piste afin de réduire la formation des DA. Cependant, l'APP n'est pas le seul substrat des protéines de la famille des ADAM. En effet, il a été observé que d'autres protéines, telles que la N-Cadhérine [Kohutek *et al.* 2009], le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α), le TGF- α (Transforming growth factor α) ou encore le récepteur Notch et l'Ephrine [Edwards *et al.* 2008 ; Le Gall *et al.* 2009], étaient clivées par ces enzymes.

3.2.4.3.1.2 La β -sécrétase

La β -sécrétase clive entre les résidus 596 et 597 de l'APP⁶⁹⁵, générant ainsi l'APP-CTF β (APP C-Terminal Fragment β) et l'APPs β , qui est plus court que l'APPs α de 17 acides aminés. Deux protéines ont été identifiées comme ayant une activité β -sécrétase. Il s'agit des aspartyl protéases BACE1 (β -site APP Cleaving Enzyme) [Vassar *et al.* 1999] et BACE 2 [Farzan *et al.* 2000]. BACE1 est une protéase aspartique transmembranaire de type I et appartient à la famille des pepsines et des protéases aspartiques rétrovirales. Son activité a un pH optimal bas et l'enzyme est préférentiellement localisée dans les compartiments intracellulaires acides (endosomes, réseau transgolgien). BACE2 est également une protéine membranaire

que l'on retrouve exprimée dans le tissu nerveux comme BACE1, mais à un niveau plus faible [Bennett *et al.* 2000] et préférentiellement dans les cellules gliales [Laird *et al.* 2005]. BACE1 est synthétisée sous forme d'une pro-enzyme dans le RE et ne devient active qu'après une homodimérisation et un clivage par les furines du pro-domaine dans le réseau transgolgien puis après une glycosylation [Westmeyer *et al.* 2004 ; Hunt *et al.* 2009].

Il a été observé que l'activité β -sécrétase était augmentée dans la MA [Fukumoto *et al.* 2002]. En effet, des études ont montré qu'une surexpression de BACE1 entraînait une augmentation de la sécrétion d'A $\beta_{1-40/42}$ [Vassar *et al.* 1999]. En revanche, BACE2 ne semble pas être impliquée dans la MA. BACE1 pourrait constituer une cible thérapeutique intéressante. Cependant, il a été observé qu'une ablation génétique de *BACE1* entraînait une réduction de la densité spinale dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe, des altérations des tests comportementaux et une cognition altérée [Savonenko *et al.* 2008]. En effet, BACE1 possède plusieurs substrats autres que l'APP tels que l' α 2,6-sialyltransférase qui est une protéine liée à la membrane présente dans le Golgi [Kitazume *et al.* 2001] ou encore les neurégulines 1 et 3 [Hu *et al.* 2006].

3.2.4.3.1.3 La γ -sécrétase

La γ -sécrétase va cliver les APP-CTF générés par le clivage par l' α -sécrétase et la β -sécrétase. Il a été observé que l'activité γ -sécrétase n'était pas médiée par une seule protéine, mais par un complexe constitué de 4 composants différents : les présénilines 1 ou 2 (PS1 ou PS2), la nicastrine (NCT), Aph1 A ou B (Anterior pharynx defective 1) et Pen2 (Presenilin enhancer 2), qui sont représentés sur la figure 7.

a) Composants de la γ -sécrétase

Les présénilines (PS)

Les présénilines 1 (PS1) et 2 (PS2) ont tout d'abord été identifiées par des études de liaisons génétiques sur des formes familiales de la MA [Cruts *et al.* 1995]; [Hutton *et al.* 1996] (voir paragraphe 4.3.3.1). Le gène de la PS1 se situe sur le chromosome 14 et celui de la PS2 sur le chromosome 1 et ces deux gènes codent pour des protéines transmembranaires ubiquitaires de respectivement 467 et 448 acides aminés. Ces protéines sont situées au niveau de la membrane du RE et au niveau de l'appareil de Golgi et sont composées de 9 fragments transmembranaires [Henricson *et al.* 2005]. Les présénilines sont inactives sous leur forme complète. Il a été observé que celles-ci pouvaient être clivées au niveau des aspartates 257 et 385 (Figure 7) dans la large boucle cytoplasmique située entre les domaines transmembranaires 6 et 7 [Nyabi *et al.* 2003]. Ce clivage, effectué par des présénilases, engendrerait alors deux fragments N- et C-terminaux, permettant la formation d'un hétérodimère stable biologiquement actif [Thinakaran *et al.* 1996].

Il a été observé que les PS étaient requises pour le clivage γ -sécrétase de l'APP [De Strooper *et al.* 1998]. En effet, un motif consensus hautement conservé a été identifié dans le domaine transmembranaire 7 et des mutations au niveau de ce motif suffiraient à rendre la PS inactive. De plus, une des mutations les plus agressives impliquées dans les formes familiales de la MA concerne ce motif, ce qui prouve que celui-ci est essentiel à l'activité de la γ -sécrétase [Steiner *et al.* 2000]. La tyrosine 389 pourrait également contribuer au site catalytique [Tolia *et al.* 2006]. Ainsi, les présénilines seraient responsables de l'activité catalytique de la γ -sécrétase.

La nicastrine (NCT)

Cette glycoprotéine membranaire de type I a été découverte par chromatographie d'affinité [Yu *et al.* 2000 ; Esler *et al.* 2002]. Elle est localisée dans le RE et l'appareil de Golgi et son expression a été retrouvée comme étant plus forte dans le cerveau. Elle possède un domaine transmembranaire et il a été observé dans ce domaine un site d'interaction primaire avec les PS et Aph1, un autre composant de la γ -sécrétase [Capell *et al.* 2003]. Sa partie N-terminale semble quant à elle être impliquée dans la reconnaissance des substrats. En effet, il a été observé

que cette partie interagissait avec l'extrémité carboxy-terminale (C-terminale) de l'APP [Yu *et al.* 2000]. La NCT possède au niveau de son ectodomaine en N-terminal un motif hautement conservé qui pourrait entraîner un changement de conformation permettant la formation du complexe de la γ -sécrétase. [Shirotani *et al.* 2003]. Ainsi la NCT serait essentielle à l'assemblage et la maturation du complexe de la γ -sécrétase [Chavez-Gutierrez *et al.* 2008]. Des sites de glycosylation sont également retrouvés au niveau de son ectodomaine [Turner *et al.* 2003] (Figure 7). La partie cytoplasmique de la protéine semble quant à elle être impliquée dans l'ancrage de la protéine à la membrane [Shirotani *et al.* 2003].

Aph1 A et B (Anterior pharynx defective 1)

Le gène *APH1* a été identifié par un crible génétique de gènes essentiels à l'activité γ -sécrétase et interagissant avec les PS [Goutte 2002 ; Francis *et al.* 2002]. Chez l'homme, le gène *APH1* peut subir un épissage alternatif pour générer les protéines Aph1-A et Aph-1 B, qui sont des protéines transmembranaires possédant respectivement 7 et 6 domaines transmembranaires, avec la partie N-terminale extracellulaire et la partie C-terminale dans le cytosol (Figure 7). Un motif conservé a été identifié dans le domaine transmembranaire 4 de la protéine comme étant nécessaire à l'interaction de la protéine avec les PS et Pen2, le dernier composant du complexe de la γ -sécrétase, mais pas avec la NCT [Niimura *et al.* 2005]. Il a également été observé que Aph1 était le constituant le plus stable du complexe et représentait l'élément initial pour son assemblage [Tolia *et al.* 2009].

Pen2 (Préséniline Enhancer 2)

Tout comme Aph1, Pen2 a été identifié comme interagissant avec les PS [Francis *et al.* 2002]. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de 101 acides aminés qui possède deux domaines transmembranaires (Figure 7). L'interaction avec les PS se ferait par le biais du domaine extra-cellulaire de Pen2 [Crystal *et al.* 2003]. Le domaine C-terminal et domaine transmembranaire 1 sont quant à eux nécessaires à l'endoprotéolyse et donc à l'activation de la préséniline [Prokop *et al.* 2005].

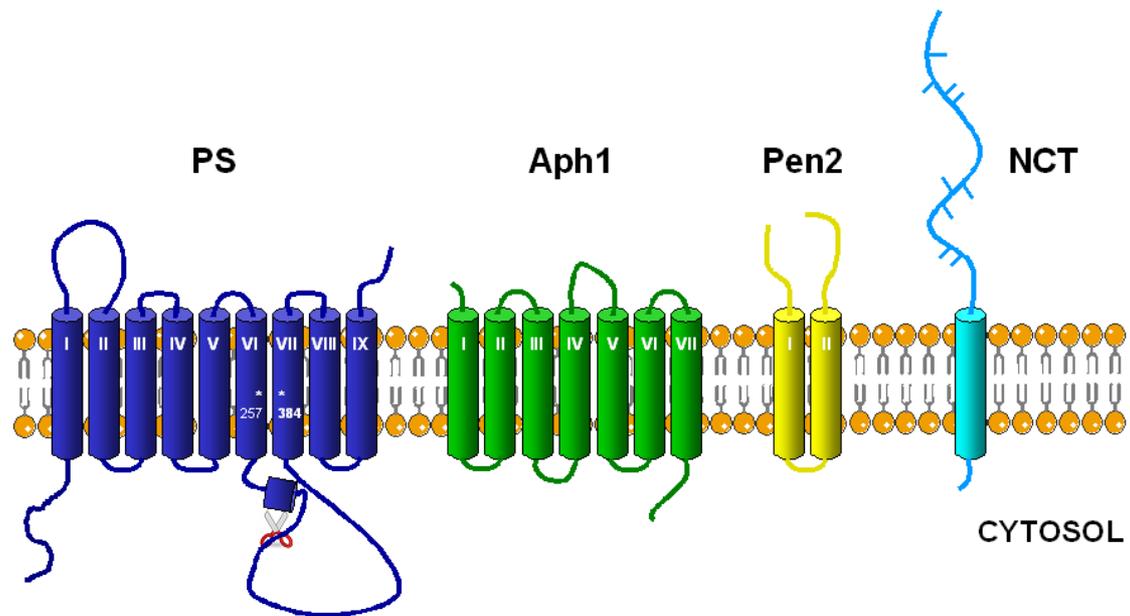


Figure 7 : Composants de la γ -sécrétase. Les étoiles blanches sur la PS représentent les sites catalytiques. Les traits bleus sur la nicastrine représentent les sites de glycosylation.

b) Formation de la γ -sécrétase

Bien que les 4 composants de la γ -sécrétase colocalisent initialement dans le RE, leur assemblage n'est pas un processus aléatoire mais survient séquentiellement. Il va initialement se former un sous complexe NCT-Aph1. Ce complexe est stable même en absence de la PS et de Pen2 [Shirotani *et al.* 2004]. Deux hypothèses sont ensuite possibles quant à la suite de l'assemblage de la γ -sécrétase [Spasic *et al.* 2008] : (A) La PS1 se lierait au complexe et Pen2 se joindrait ensuite à ce complexe trimérique ainsi formé et entraînerait l'endoprotéolyse de la PS [LaVoie *et al.* 2003 ; Niimura *et al.* 2005] (Figure 8 A) (B) Il se formerait deux complexes intermédiaires : NCT-Aph1 et Pen2-PS1 (Figure 8 B). En effet, il a été observé que Pen2 pouvait fixer PS1 indépendamment de la NCT et Aph1 [Fraering *et al.* 2004]. Ce complexe intermédiaire pourrait se former avant ou durant l'endoprotéolyse de la PS.

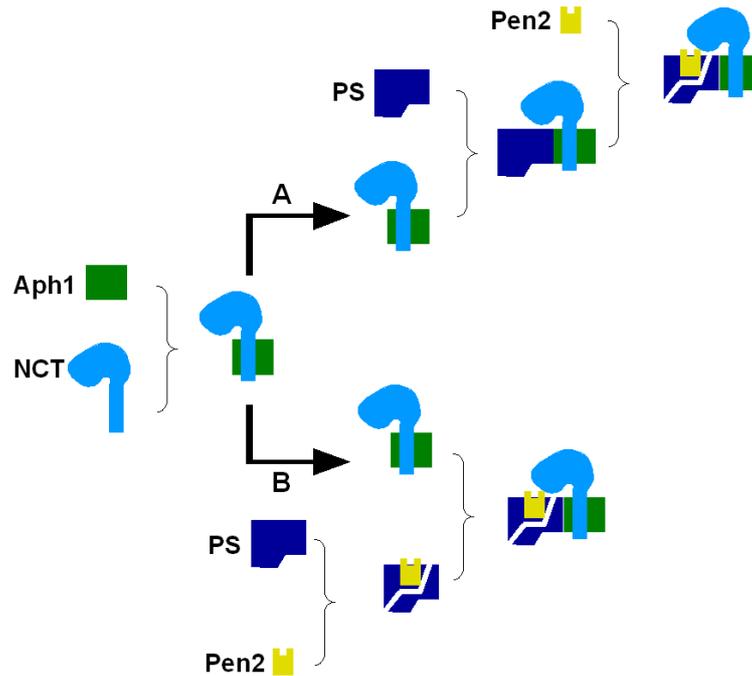


Figure 8 : Représentation spatio-temporelle des deux hypothèses concernant l'assemblage de la γ -sécrétase. (A) Première hypothèse selon laquelle la PS1 se fixe en premier sur le complexe Aph1-NCT et s'ensuit la fixation de Pen2. (B) Deuxième hypothèse suggérant la formation indépendante des complexes Aph1-NCT et Pen2-PS1, se suivant de leur assemblage.

Chez l'homme, à partir des 4 molécules qui forment la γ -sécrétase, 6 complexes différents peuvent être formés selon leur localisation tissulaire car il existe deux PS et deux Aph1 différents (avec une forme longue et une forme courte pour Aph-1A) [Hebert *et al.* 2004]. Les différentes γ -sécrétases ainsi produites semblent avoir des propriétés biochimiques différentes. Ainsi, les complexes contenant la PS1 ou la PS2 montrent des efficacités différentes dans le clivage de l'APP-CTF β et différentes susceptibilités à des inhibiteurs de la γ -sécrétase [Mastrangelo *et al.* 2005 ; Bentahir *et al.* 2006].

c) Substrats et mécanismes de clivage de la γ -sécrétase

Bien que le premier substrat de la γ -sécrétase identifié fut l'APP, il a par la suite été observé que cette protéase pouvait cliver plus de 60 autres protéines transmembranaires de type I [De Strooper *et al.* 2010] comme par exemple le récepteur Notch qui joue un rôle lors du développement et également à l'âge adulte [De Strooper *et al.* 1999]. Ces substrats ne partagent pas les mêmes séquences consensus autour de leur site de clivage mais des résidus hydrophobes ont été

identifiés dans le domaine transmembranaire et la région juxta-membranaire luminale de l'APP et de Notch comme jouant un rôle clé dans l'efficacité et la spécificité du clivage [Tesco *et al.* 2005 ; Ren *et al.* 2007].

La γ -sécrétase peut cliver à de multiples positions dans le domaine transmembranaire de ses différents substrats [Qi-Takahara *et al.* 2005]. Concernant le clivage de l'APP, le modèle le plus répandu suggère que la protéolyse se produit sur le bord intracellulaire du domaine transmembranaire au niveau de sites ϵ , relâchant ainsi les peptides $A\beta_{x-49}$ ou $A\beta_{x-48}$. Les formes ainsi obtenues sont par la suite clivées au niveau d'un site ζ pour générer les peptides $A\beta_{x-46}$ à partir de la forme $A\beta_{x-49}$ et $A\beta_{x-45}$ à partir de la forme $A\beta_{x-48}$. Enfin, la forme $A\beta_{x-46}$ peut être clivée en deux sites γ pour générer l' $A\beta_{x-43}$ ou l' $A\beta_{x-40}$ et la forme $A\beta_{x-45}$ par la même série de clivages, générerait la production d' $A\beta_{x-42}$ et $A\beta_{x-38}$ [Takami *et al.* 2009]. Ainsi, l' $A\beta_{x-49}$ et l' $A\beta_{x-46}$ seraient les précurseurs du peptide $A\beta_{40}$ alors que l' $A\beta_{48}$ et l' $A\beta_{45}$ seraient les précurseurs du peptide $A\beta_{42}$ (Figure 9). L'activité γ -sécrétase déterminerait donc la nature du peptide amyloïde généré ($A\beta_{x-40}$ ou $A\beta_{x-42}$). Ce modèle de clivages séquentiels a également été retrouvé pour Notch [Chandu *et al.* 2006].

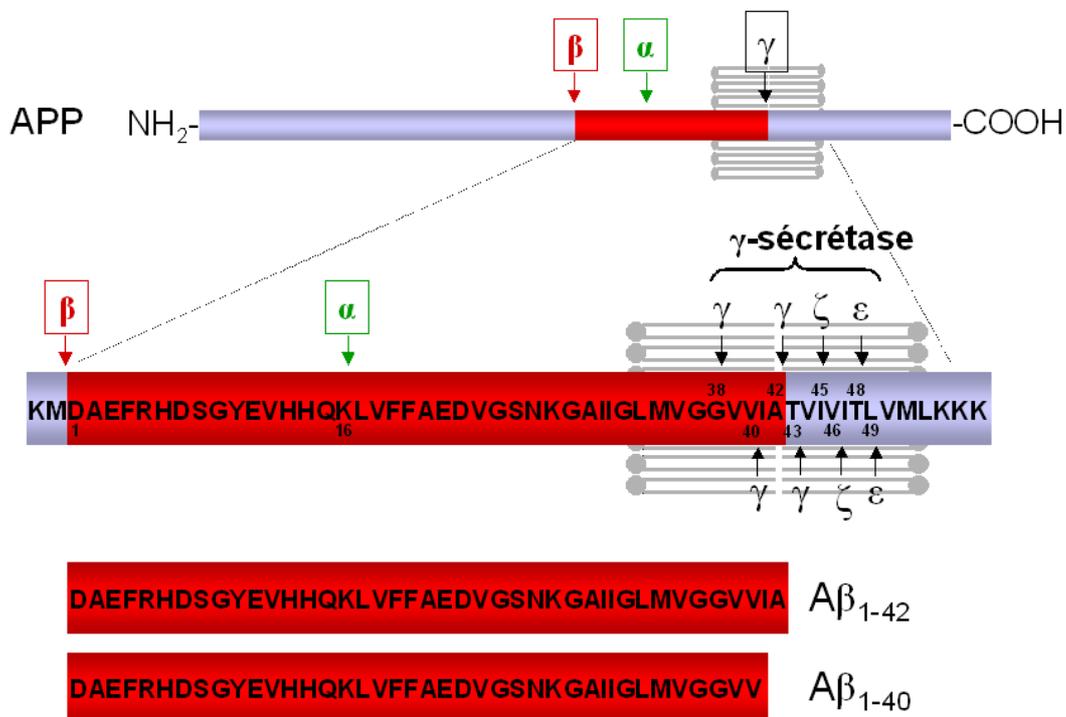


Figure 9 : Description des clivages séquentiels de l'APP-CTF par la γ -sécrétase suite au clivage par l' α -sécrétase ou la β -sécrétase.

d) Régulation de la γ -sécrétase

La régulation de la γ -sécrétase peut subvenir à de nombreux niveaux, que cela soit sur son assemblage, sur sa maturation ou encore sur son activité catalytique. Tout d'abord, comme il a été décrit précédemment, le clivage de la PS par des présénilases semble être nécessaire à son activité catalytique. Il a également été observé que la régulation pouvait avoir lieu au moment de l'assemblage de la γ -sécrétase. En effet, il a été observé que la phospholipase D1 (PLD1) se fixait spécifiquement sur la PS1 en entraînant une diminution de la production d'A β . Des études ont alors montré que la PS1 recrutait PLD1 dans le réseau Golgi/trans-Golgi et que cette interaction pouvait provoquer un désassemblage complet de la γ -sécrétase [Cai *et al.* 2006].

D'autres produits peuvent agir directement sur l'activité catalytique de la γ -sécrétase. Alors que certains composés vont cibler le site catalytique et affecter tous les clivages pour tous les substrats, d'autres, tels que les DAPTs (peptide based inhibitors), les sulfonamides et les benzodiazepines inhibent préférentiellement le clivage au niveau du site γ , diminuant ainsi la production d'A β_{1-40} et d'A β_{1-42} [Yagishita *et al.* 2006]. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens pourraient quant à eux abolir spécifiquement la production d'A β_{1-42} [Weggen *et al.* 2001 ; Weggen *et al.* 2003]. D'autres facteurs ont au contraire un effet activateur sur la γ -sécrétase, tels que l'adénosine tri-phosphate (ATP) qui activerait spécifiquement le clivage de l'APP [Fraering *et al.* 2005]. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase, qui cibleraient les sites de fixation de l'APP, pourrait être alors intéressante dans un but thérapeutique.

De nombreuses protéines peuvent ainsi agir aussi bien sur l'assemblage que sur l'activité catalytique de la γ -sécrétase. L'expression cellulaire et tissulaire spécifique de ces protéines pourrait adapter le niveau de γ -sécrétase nécessaire pour les besoins spécifiques de la cellule ou des tissus en agissant sur différents substrats.

Le métabolisme de l'APP fait donc intervenir de nombreux acteurs et aboutit dans le cas de la voie amyloïdogène à la formation d'A β . De nombreuses voies de régulations seront donc impliquées afin de contrôler la production du peptide amyloïde et sa concentration dans le tissu cérébral.

3.2.4.3.2 Régulation du niveau d'A β dans le cerveau

L'A β sous sa forme soluble n'est pas seulement toxique pour les cellules. Il est produit également durant le métabolisme non pathologique en beaucoup plus faible quantité [Haass *et al.* 1992]. Il serait en effet impliqué dans la régulation de l'excitabilité des cellules nerveuses [Ekinci *et al.* 1999] et la neurotransmission cholinergique des neurones pyramidaux de l'hippocampe [Jhamandas *et al.* 2001 ; Kar *et al.* 1996]. Cependant, cet effet devient toxique si l'A β se trouve en trop grande quantité. La MA résulte donc d'un déséquilibre dans la régulation de la production ou la dégradation du peptide A β .

De nombreux mécanismes sont impliqués dans la régulation du métabolisme de l'APP. Tout d'abord, les clivages de l'APP par les α - et β -sécrétases peuvent être régulés par l'activité neuronale notamment par l'activation des voies glutamatergiques [Nitsch *et al.* 1997], cholinergiques [Nitsch *et al.* 2000 ; Farber *et al.* 1995] ou du NMDA (Acide N-méthyl-D-aspartique) [Mills *et al.* 1999] concernant l' α -sécrétase et par la dépolarisation neuronale en ce qui concerne la β -sécrétase [Kamenetz *et al.* 2003]. La régulation du trafic cellulaire peut également avoir un impact sur le métabolisme de l'APP et la production d'A β , notamment du fait que les différentes sécrétases sont localisées dans des compartiments cellulaires spécifiques. Ainsi, certaines protéines impliquées dans le trafic intracellulaire peuvent affecter le métabolisme de l'APP [Borg *et al.* 1998 ; Zhang *et al.* 2011]. L'endocytose médiée par la clathrine est elle aussi fortement impliquée dans la régulation de ce métabolisme [Chyung *et al.* 2003 ; Carey *et al.* 2005]. Les oestrogènes et la testostérone peuvent quant à eux diminuer la production d'A β en modulant les différentes activités sécrétases impliquées dans le métabolisme de l'APP [Ghosh *et al.* 2008 ; Zhang *et al.* 2011 ; McAllister *et al.* 2010]. Enfin, le cholestérol serait lui aussi impliqué dans l'activité amyloïdogénique. Il a en effet été localisé en forte quantité dans des microdomaines dans lesquels on retrouve l'activité β - et γ -sécrétase [Ehehalt *et al.* 2003 ; Vetrivel *et al.* 2005] et sa déplétion entraînerait une diminution de la production d'A β [Marzolo *et al.* 2009]. De plus, il a été observé que certains récepteurs impliqués dans le métabolisme du cholestérol pourraient eux aussi moduler la production d'A β [Marzolo *et al.* 2009 ; Zhang *et al.* 2006].

La régulation de la quantité d'A β peut être aussi médiée par les mécanismes de clairance et de dégradation. Plusieurs protéases sont impliquées dans la

dégradation de l'A β , telles que la néprilysine (NEP) [Iwata *et al.* 2000 ; Yasojima *et al.* 2001], l'IDE (Insulin Degrading Enzyme) [Carson *et al.* 2002 ; Farris *et al.* 2003 ; Vekrellis *et al.* 2000], l'ACE (Angiotensine Converting Enzyme) [Hu *et al.* 2001] ou encore la cathepsine B [Mueller-Steiner *et al.* 2006]. Certaines de ces enzymes sont sécrétées par les cellules microgliales, qui peuvent également internaliser l'A β et l'apporter rapidement au niveau des lysosomes [Jiang *et al.* 2008]. Enfin, la clairance de l'A β peut être régulée par la barrière hémato-encéphalique (BHE) [Pflanzner *et al.* 2010].

L'amyloïdogénèse est donc un mécanisme très complexe et finement régulé. Une dérégulation de ce processus va aboutir à la formation de DA toxiques dans la matrice extra-cellulaire. Cependant, un autre type de lésion est retrouvé dans le cerveau de patients atteints de MA, jouant également un rôle clé dans la physiopathologie de la maladie.

3.3 Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences fibrillaires (DNF) sont des filaments pathologiques à l'intérieur du corps cellulaire et du dendrite du neurone. Ces filaments se retrouvent également au niveau des neurites en dégénérescence au niveau du neuropile et des plaques séniles [Goedert *et al.* 1998]. Ces lésions sont préférentiellement situées au niveau des neurones pyramidaux du cortex entorhinal, de l'hippocampe et du neocortex (Figure 10).

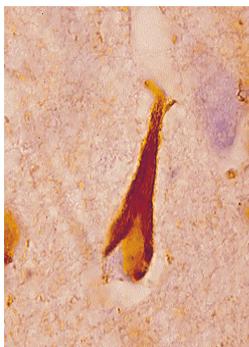


Figure 10 : Dégénérescence neurofibrillaire dans un neurone pyramidal de l'isocortex, après immunomarquage par un anticorps anti-Tau polyclonal [Dessi *et al.* 1997].

3.3.1 Structure et composition des DNF

Les DNF résultent de l'agrégation intra-neuronale de protéines Tau anormalement hyper-phosphorylées, ces protéines s'associant pour former des paires de filaments appariés en hélice (PHFs pour « Paired Helical Filaments ») [Lee *et al.* 1991]. Ces fibrilles ont un diamètre de 10 nm et la périodicité de la forme en hélice est de 80 nm [KIDD 1963 ; Wisniewski *et al.* 1976]. Bien que la protéine soit le constituant majeur des DNF, d'autres protéines les composent telles que l'ubiquitine [Perry *et al.* 1987 ; [Love *et al.* 1988], l'apolipoprotéine E (ApoE) [Namba *et al.* 1991] ou encore les cholinestérases [Hyman *et al.* 1989].

3.3.2 Localisation des DNF aux différents stades de la maladie

Braak et Braak ont montré que les DNF évoluaient selon 6 stades. Il y a tout d'abord les stades I et II durant lesquels les lésions se retrouvent dans la région transenthorinale, puis dans la région enthorinale. Dans les stades III et IV, appelés stades limbiques, les lésions commencent à atteindre l'hippocampe, initialement au niveau du secteur CA1, puis le subiculum. Enfin, dans les stades V et VI, tout l'hippocampe est affecté et l'isocortex commence à être atteint (Figure 11) [Braak *et al.* 1991].

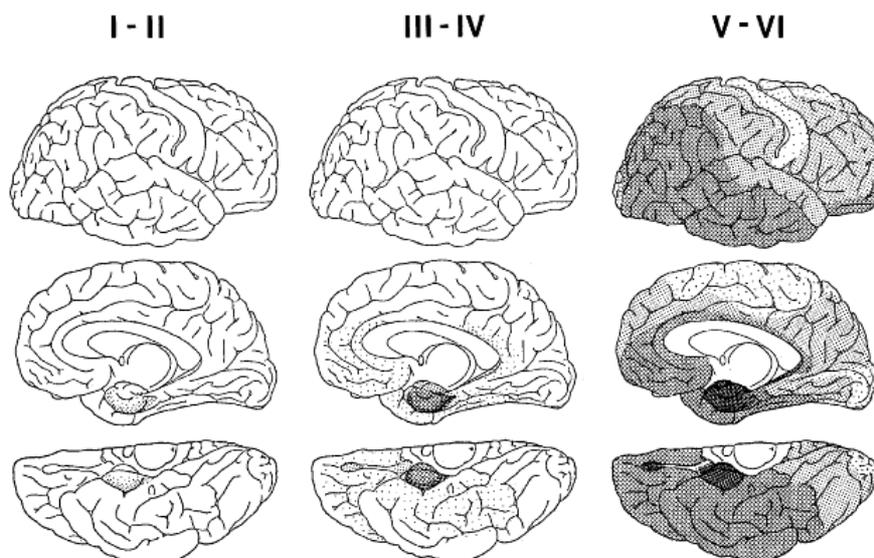


Figure 11 : Distribution topographique des DNF aux différents stades de la maladie selon Braak et Braak. L'intensité de coloration correspond à la concentration des dépôts.

3.3.3 La protéine Tau

Tau a été isolée en 1975 et identifiée comme étant associée aux microtubules [Weingarten *et al.* 1975]. De nombreuses études ont été menées par la suite afin de mieux caractériser cette protéine qui semble jouer un rôle majeur dans la formation des DNF.

Chez l'homme, la protéine Tau est codée par le gène *MAPT* (Microtubule-Associated Protein Tau) qui se situe sur le chromosome 17 en position q21 [Neve *et al.* 1986]. Le gène s'étend sur 100 kpb et comprend 16 exons [Andreadis *et al.* 1992]. Au niveau cérébral, les épissages alternatifs du gène *MAPT* incluant les exons 2, 3 et 10 [Goedert *et al.* 1989] peuvent générer 6 isoformes différentes. L'épissage alternatif de l'exon 10 entraîne la production de deux isoformes possédant soit 3 domaines répétés (3R) soit 4 domaines (4R). L'épissage alternatif de l'exon 2 ou des exons 2 et 3 ensemble génère 3 isoformes avec 0 (0N), 1 (1N) ou 2 (2N) insert(s) de 29 acides aminés dans la partie N-terminale (Figure 12).

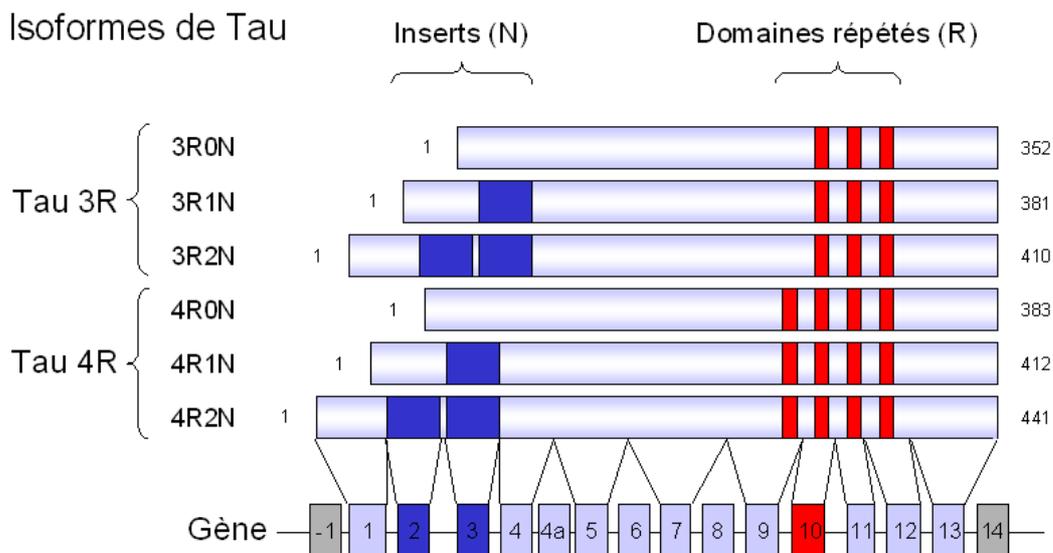


Figure 12 : Epissage alternatif du gène *MAPT* et isoformes neuronales de Tau produites.

3.3.3.1 Structure et fonctions des différentes isoformes neuronales de Tau

Comme décrit précédemment, 6 isoformes de Tau sont exprimées dans le cerveau humain et celles-ci se différencient dans leur partie N-terminale par la présence ou l'absence de 29 ou 58 acides aminés et dans leur partie C-terminale par la présence de 3 ou 4 domaines répétés de 18 acides aminés. Ainsi, ces isoformes possèdent de 352 à 441 acides aminés et leur poids moléculaire varie entre 36,7 et

45,8 kDa (Figure 12). Au niveau du SNC, une seule isoforme est exprimée durant le développement embryonnaire et à la naissance. Cette isoforme ne comporte aucune des insertions décrites précédemment dans les régions N- et C-terminales et est alors appelée isoforme fœtale (Figure 12 : 3R0N) [Goedert *et al.* 1989 ; Kosik *et al.* 1989].

Ces différentes isoformes sont abondamment exprimées dans le SNC et dans le système nerveux périphérique [Binder *et al.* 1985]. Dans le SNC, elles sont surtout retrouvées dans les axones des neurones en croissance ou matures, alors que leur niveau est faible dans les oligodendrocytes et les astrocytes [LoPresti *et al.* 1995]; [Gu *et al.* 1996]. Les protéines Tau appartiennent à la famille des MAP, pour «Microtubules-Associated Proteins », qui sont impliquées dans la stabilisation de ces structures essentielles à la polarisation de la cellule et au transport axonal [Delacourte *et al.* 1997]. Ainsi, Tau, en se fixant sur les microtubules, permettrait leur maintien. En plus de son interaction avec les microtubules, il a été observé que Tau était capable de stimuler l'assemblage de la tubuline en microtubules en diminuant son instabilité [Drechsel *et al.* 1992].

Dans le domaine C-terminal, chacune des séquences répétées semble contribuer, avec une affinité variable, à la liaison des protéines Tau aux microtubules [Gustke *et al.* 1994] (Figure 13). En effet, les séquences répétées de Tau se fixeraient ainsi aux microtubules via leurs charges positives qui interagiraient avec les résidus chargés négativement de la tubuline [Jho *et al.* 2010]. L'addition du 4^{ème} domaine répété permettrait une polymérisation plus rapide des microtubules et leur conférerait une plus grande stabilité [Brandt *et al.* 1993].

La partie N-terminale a une longueur variable selon les isoformes et l'ajout d'acides aminés supplémentaires rend cette partie hautement acide. Elle n'est pas associée aux microtubules mais serait plutôt un domaine de projection qui s'oriente vers l'extérieur du microtubule [Chen *et al.* 1992] (Figure 13). Ainsi, elle permettrait de déterminer et de maintenir l'espacement entre les microtubules [Al Bassam *et al.* 2002], ce qui est crucial pour la circulation des vésicules le long de l'axone. Il a aussi été décrit que cette région permettait l'interaction de Tau avec certains composants de la membrane plasmique du neurone [Brandt *et al.* 1995].

La région centrale riche en proline semble quant à elle influencer sur l'affinité des protéines Tau avec les microtubules en modulant l'activité des domaines répétés [Brandt *et al.* 1993] (Figure 13). En effet, cette région contient de nombreux sites de

phosphorylation par différentes kinases [Augustinack *et al.* 2002]. L'identification de cette région régulatrice laisse supposer que l'activité de Tau peut également être modulée par des modifications post traductionnelles, qui sont principalement des phosphorylations.

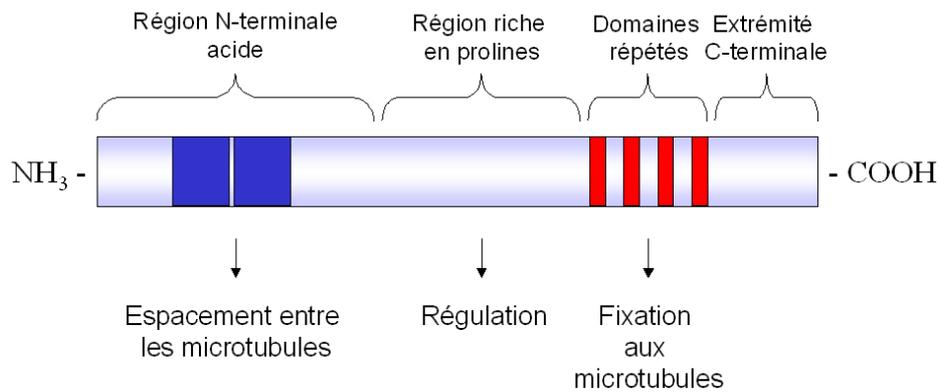


Figure 13 : Fonctions principales des différentes régions de la protéine Tau (isoforme 4R2N).

3.3.3.2 Modifications post-traductionnelles de la protéine Tau

3.3.3.2.1 Phosphorylations

La phosphorylation est la modification post-traductionnelle principale que peut subir la protéine. En effet, il a été observé que 20% de la molécule est susceptible d'être phosphorylée [Avila *et al.* 2012]. Tau serait majoritairement phosphorylée dans sa région régulatrice au niveau de résidus sérine ou thréonine suivis par des prolines, suggérant l'implication de kinases spécifiques des motifs sérine-proline ou thréonine-proline. Les kinases spécifiques de ces résidus sont plus couramment regroupées sous le terme de PDPK (Proline-Directed Protein Kinase). Parmi ces PDPK, la glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) et la kinase dépendante des cyclines Cdk5 (Cyclin-dépendant kinase 5) ont été identifiées comme capables de phosphoryler Tau [Doble *et al.* 2003 ; Hamdane *et al.* 2003]. La phosphorylation des protéines Tau peut également se faire sur des résidus sérine ou thréonine qui ne sont pas suivis par une proline, par des kinases telles que la protéine kinase dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique [Fleming *et al.* 1995], les MARK (Microtubules-Affinity-Regulating Kinase) [Biernat *et al.* 2002], la PKC [Drewes *et al.* 1995] la CamKII (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein Kinases II) [Singh *et al.* 1996b] ou encore les caséines kinases (CK) 1 et 2 [Singh *et al.* 1994 ; Singh *et al.* 1995 ; Greenwood *et al.* 1994].

La phosphorylation de sites spécifiques sur la protéine semble jouer un rôle crucial dans la régulation de l'interaction de Tau avec les microtubules. Par exemple, la phosphorylation de la thréonine 231 par la GSK3 β jouerait également un rôle important dans la régulation de l'interaction de Tau avec les microtubules en diminuant sa capacité de fixation [Cho *et al.* 2003]. Le contrôle de cette fixation serait important dans des mécanismes comme l'axogénèse [Mandell *et al.* 1996] ou le transport axonal [Stamer *et al.* 2002], avec un effet dépendant des kinases impliquées [Biernat *et al.* 2002 ; Sayas *et al.* 2002 ; Tatebayashi *et al.* 2004].

Bien que certains facteurs, tels que des pré-phosphorylations de la protéine [Sengupta *et al.* 1997] ou encore le nombre d'inserts dans la partie N-terminale de la protéine [Singh *et al.* 1996a], peuvent moduler la phosphorylation de Tau, la majorité de cette régulation est assurée par l'activité phosphatasique. En effet, la phosphorylation est un mécanisme réversible et il a d'ailleurs été observé que les protéines Tau phosphorylées pouvaient être rapidement déphosphorylées par des phosphatases endogènes présentes dans le cerveau [Soulie *et al.* 1996]. Les phosphatases (PP pour « Protein Phosphatase ») se divisent en 4 groupes : les PP1, les PP2A, les PP2B et les PP2C [Cohen 1991]. La PP2A est responsable de 70% de l'activité phosphatase sur Tau dans le cerveau [Liu *et al.* 2005].

3.3.3.2.2 Glycosylations

Les protéines Tau peuvent être également O-glycosylées par addition de résidus O-GlcNAc sur des sérines ou des thréonines dans une région riche en prolines, au niveau de motifs susceptibles d'être phosphorylés [Arnold *et al.* 1996]; [Haltiwanger *et al.* 1997]. Cette observation a conduit à l'hypothèse qu'il puisse exister une compétition entre ces deux modifications post-traductionnelles, ce qui pourrait engendrer des changements dans les propriétés biochimiques et les fonctions biologiques de Tau [Robertson *et al.* 2004]. En effet, il a été observé que la phosphorylation de Tau était aussi régulée par le niveau de O-GlcNacylation [Arnold *et al.* 1996 ; Hart *et al.* 1996]. Il a d'ailleurs été montré que la O-GlcNacylation de Tau était sous régulée dans le cerveau de patients atteints de MA [Liu *et al.* 2004].

3.3.3.3 Implication de Tau dans la maladie d'Alzheimer

3.3.3.3.1 Localisation de la protéine Tau dans les DNF

La composition des DNF a été analysée par l'utilisation d'anticorps [Yen *et al.* 1995] et de nombreux composants ont été détectés. Tau reste le constituant majeur mais les protéines Tau contenues dans les DNF diffèrent des protéines Tau retrouvées normalement chez l'adulte. Déjà, une plus grande proportion de protéines provenant de transcrits contenant l'exon 3 et qui possèdent donc des charges isoelectriques plus acides en position N-terminale est retrouvée [Ksiezak-Reding *et al.* 1990]. Cependant, la distinction la plus importante entre les protéines Tau associées aux DNF et les protéines Tau normales est leur niveau de phosphorylation. En effet, la protéine Tau retrouvée dans les DNF est 3 à 4 fois plus phosphorylée que la protéine normale chez l'adulte [Ksiezak-Reding *et al.* 1992] et cette hyperphosphorylation concerne les 6 isoformes neuronales de Tau [Goedert *et al.* 1992]. Ainsi, les protéines Tau présentes dans les DNF seraient anormalement hyperphosphorylées.

3.3.3.3.2 Effets pathogènes des phosphorylations de Tau

La caractérisation des sites de phosphorylation des protéines Tau dans les DNF a été le centre de nombreuses investigations. Ainsi, 20 sites de phosphorylation ont été identifiés [Yen *et al.* 1995]. Parmi ces sites de phosphorylation, deux régions d'intérêt ont été mises en évidence entre les acides aminés 44 à 55 et 226 à 240 de la forme la plus longue de Tau [Liu *et al.* 1993 ; Liu *et al.* 1994]. Comme il a été décrit précédemment, la phosphorylation de Tau au niveau de sites tels que la thréonine 231 ou la sérine 262 entraînerait une diminution de l'affinité de Tau avec les microtubules qui, si elle est trop excessive, peut entraîner un désassemblage des microtubules. Cependant, les phosphorylations de Tau n'agissent pas toutes sur sa fixation aux microtubules. Il a en effet été observé que des phosphorylations en sérine 422 [Haase *et al.* 2004] ou encore au niveau des sérines 396 et 404 [Abraham *et al.* 2000] augmenteraient la capacité de Tau à s'agréger et à former potentiellement des agrégats filamenteux. Des immunomarquages ont alors montré une présence de résidus phosphorylés en sérine 422 au niveau des DNF. Cependant, ceux-ci sont plus rares que les résidus phosphorylés en sérine 262 et en thréonine 231 au niveau des neurones dans lesquels la formation de filaments ne fait

que débiter [Augustinack *et al.* 2002]. Ainsi, comme décrit dans la Figure 14, des phosphorylations, comme celles de la sérine 262 et de la thréonine 231, diminueraient l'affinité de Tau avec les microtubules puis d'autres phosphorylations, comme celles des sérines 396 ou 422, rendraient les protéines plus fibrillogéniques.

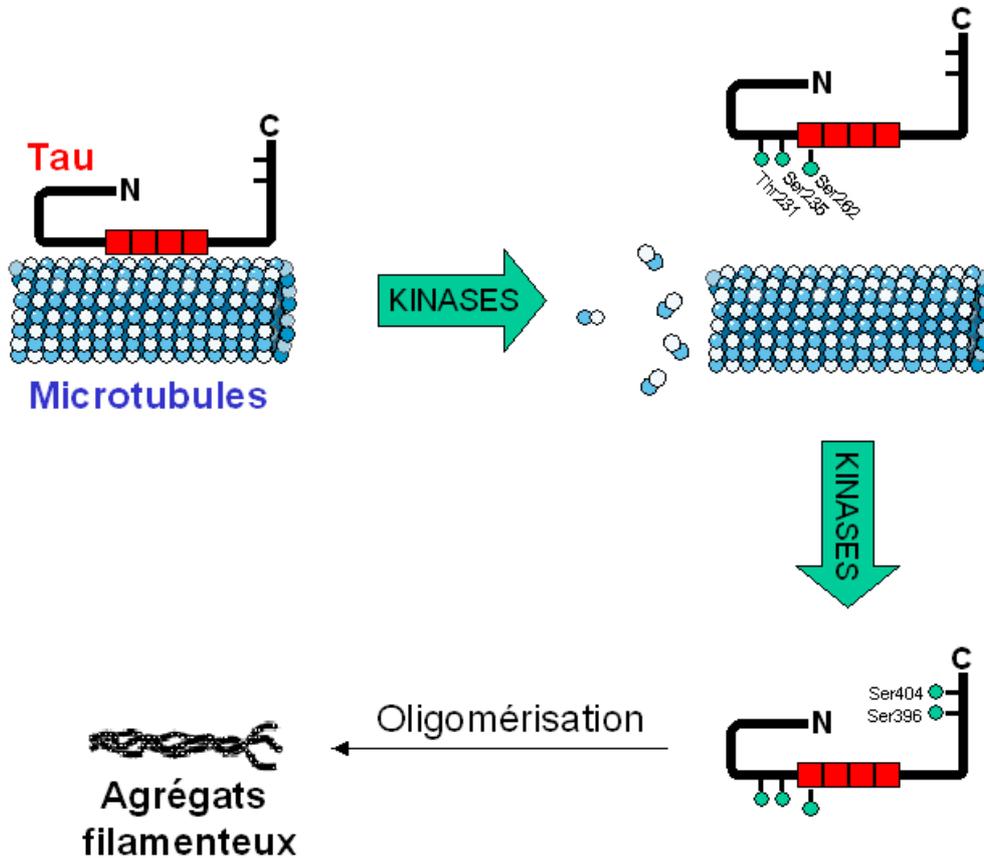


Figure 14 : Effet des phosphorylations de Tau sur le désassemblage des microtubules et la formation d'agrégats filamenteux de Tau.

Environ 40% des protéines Tau anormalement hyperphosphorylées ne sont pas retrouvées dans les DNF mais sont présentes dans le cytosol. Ces protéines ne peuvent pas se fixer à la tubuline et induire l'assemblage des microtubules, mais elles ont au contraire un effet inhibiteur sur leur assemblage et entraînent une dépolymérisation des microtubules [Iqbal *et al.* 2010]. Cet effet inhibiteur implique la séquestration de protéines Tau normales et d'autres protéines se fixant aux microtubules telles que MAP1 ou MAP2 par cette protéine anormalement hyperphosphorylée [Alonso *et al.* 1997] et il a été observé qu'une déphosphorylation de cette protéine par une phosphatase suffit à la transformer en une protéine non pathogène [Li *et al.* 2007].

3.3.3.3.3 Kinases et phosphatases impliquées

La balance entre la phosphorylation et la déphosphorylation de Tau joue un rôle crucial dans la MA. Des études ont montré que la kinase GSK3 β serait impliquée dans la pathologie Tau [Jope *et al.* 2004] ainsi que la PKA (protéine kinase dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique), Cdk5, CamKII, CK1 ou encore MAPK (Microtubule-Associated Protein Kinase) [Pei *et al.* 2008 ; Iqbal *et al.* 2005]. La phosphatase PP2A, qui est fortement impliquée dans la déphosphorylation de Tau en condition non pathologique est affectée dans les cerveaux de patients atteints de MA [Gong *et al.* 1995] et de ce fait serait impliquée dans l'hyperphosphorylation anormale de Tau [Iqbal *et al.* 2009]. En effet, une fois déphosphorylées par cette phosphatase, les protéines Tau pathogènes perdent leur capacité à inhiber l'assemblage des microtubules [Wang *et al.* 2007].

3.3.3.3.4 Autres mécanismes impliqués dans la pathogénicité de Tau

La phosphorylation de n'est pas le seul mécanisme connu comme étant impliqué dans la pathogénicité de Tau. Il a été observé que la protéolyse de la protéine pouvait également la rendre pathogène et donc avoir une implication dans la physiopathologie de la MA [Johnson 2006]. En effet, Tau peut subir des clivages par différentes protéases, notamment par la calpaïne ou la caspase 3, ce qui entraînerait la génération de fragments toxiques et ayant une plus forte capacité à s'agréger [Park *et al.* 2005 ; Gamblin *et al.* 2003].

Ainsi, deux types de lésions principales sont observées dans la MA : (1) la formation de DA, issus d'un dérèglement du métabolisme de l'APP et de l'élimination de l'A β ; (2) la formation des DNF issues d'une accumulation de protéine Tau anormalement phosphorylées. Les dépôts d'A β neurotoxiques et les DNF vont aboutir à la mort neuronale, d'où l'atrophie observée dans certaines régions du cerveau de patients atteints de MA. Les neurones cholinergiques seront les plus affectés durant la pathologie [Braak *et al.* 2000].

3.4 Autres lésions observées dans la maladie d'Alzheimer

Bien que les DA et les DNF soient les lésions principales observées dans la MA, il existe d'autres lésions caractéristiques de la maladie. De nombreuses défaillances vasculaires sont observées dans la MA et sont importantes dans le développement de la maladie [Scheibel *et al.* 1989]. En effet, une hypoperfusion est fréquemment observée chez les patients atteints de MA [Johnson *et al.* 2005]. La lésion vasculaire majeure retrouvée dans le cerveau des patients est l'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC).

3.4.1 L'Angiopathie amyloïde cérébrale

3.4.1.1 Définition

L'AAC est caractérisée par un dépôt de peptide A β dans la média et l'adventice des petites artères et des capillaires au niveau des leptoméninges et du cortex cérébral [Vinters 1987 ; Attems *et al.* 2011]. Les régions occipitales sont préférentiellement affectées. Contrairement aux DA, la forme majoritaire de peptide amyloïde qui se dépose dans l'AAC est l'A β_{1-40} [Herzig *et al.* 2004]. Cette affection prend une part importante dans la MA car elle est retrouvée chez 90% des patients [Jellinger 2002a]. Il existe deux sous-types distincts d'AAC : l'AAC de type 1, la plus fortement associée à la MA, correspondant à un dépôt d'A β dans les capillaires corticaux [Attems *et al.* 2011] et l'AAC de type 2 dans laquelle les dépôts se retrouvent uniquement dans les artères et artérioles leptoméningiales et corticales [Thal *et al.* 2002].

3.4.1.2 Voies physiopathologiques aboutissant à l'angiopathie amyloïde cérébrale

Il a été supposé que l'A β se déposant dans les vaisseaux sanguins durant l'AAC provenait des neurones [Herzig *et al.* 2006]. Or dans la MA, un défaut de la clairance de l'A β est observé. En effet, des études ont montré que le dépôt d'A β le long des vaisseaux cérébraux serait dû à une altération du drainage périvasculaire [Preston *et al.* 2003 ; Weller *et al.* 2005] qui est un mécanisme permettant de drainer les fluides et les solutés hors du cerveau (Figure 15). Ainsi, si ce mécanisme de clairance est affecté en plus d'autres par des pathologies, l'A β peut être retenu et se déposer dans la paroi des petites artères [Weller *et al.* 2009].

Une augmentation du ratio $A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$ peut également entraîner un dépôt de peptide amyloïde dans les vaisseaux sanguins au lieu du parenchyme cérébral [Fryer *et al.* 2005] et peut également réduire l'efficacité de l'efflux d' $A\beta$ le long des canaux périvasculaires, entraînant alors une augmentation du risque de développer une AAC [Jack, Jr. *et al.* 2010].

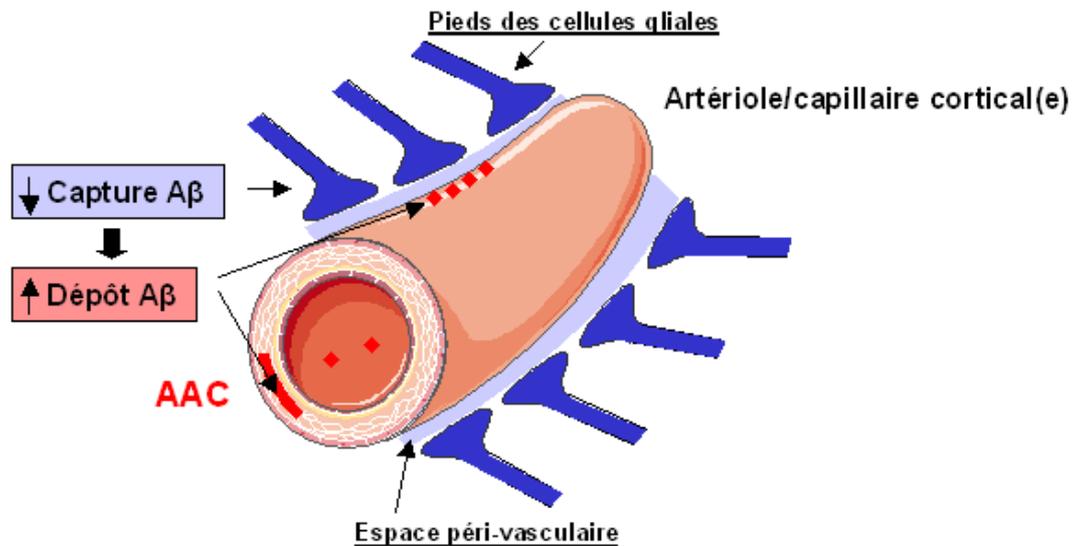


Figure 15 : Altération du drainage périvasculaire. Une diminution de la capture d' $A\beta$ par les cellules gliales entraîne une augmentation des dépôts d' $A\beta$ le long des vaisseaux [Charidimou *et al.* 2012].

3.4.1.3 Conséquences de l'angiopathie amyloïde cérébrale

Le dépôt d' $A\beta$ entraîne des changements morphologiques importants au niveau de la structure des vaisseaux sanguins. En effet, ce dépôt aboutit à une perte des cellules musculaires lisses (CML) [Dotti *et al.* 2009], un épaississement de la paroi vasculaire et un rétrécissement de la lumière des vaisseaux [Biffi *et al.* 2011] ainsi qu'un dysfonctionnement endothélial. Tous ces changements rendent les vaisseaux sanguins fragiles et entraînent la formation de microanévrismes et de fuites [Attems *et al.* 2011]. L'AAC est également associée à des dommages ischémiques [Jellinger 2002b], comprenant des micro-infarctus corticaux, retrouvés chez les patients souffrant d'une AAC sévère [Haglund *et al.* 2006], et une pathologie de la substance blanche, qui consiste en une démyélinisation et une gliose. Le dépôt d' $A\beta$ peut aussi altérer la régulation du flux sanguin [Smith *et al.* 2009], le fonctionnement des unités neurovasculaires [Iadecola 2004] ainsi que les

mécanismes homeostatiques [Gregoire *et al.* 2011]. Enfin, l'A β présent au niveau des vaisseaux sanguins cérébraux peut également détériorer la BHE et entraîner une inflammation [Attems *et al.* 2011 ; Smith *et al.* 2009].

3.4.2 Artériosclérose et athérosclérose

L'artériosclérose, correspondant à une dégénérescence fibreuse des artères, apparaît fréquemment au cours du vieillissement vasculaire. Cette affection serait retrouvée chez de nombreux patients atteints de MA [Tian *et al.* 2004]. Lorsque l'artériosclérose est associée à des dépôts graisseux au niveau de la paroi des vaisseaux, il s'agit alors d'athérosclérose. L'athérosclérose serait plus sévère chez les patients atteints de la MA par rapport aux témoins [Kalback *et al.* 2004].

3.4.3 Inflammation

La composante inflammatoire semblerait prendre une part importante dans la MA. En effet, une activation microgliale et astrocytaire est observée au niveau des DA [Wyss-Coray *et al.* 2002]. La microglie et les astrocytes libèreraient alors des cytokines ayant un effet délétère. L'interleukine 1 (IL-1), par exemple, aurait un rôle dans la neurotoxicité du peptide amyloïde et activerait la synthèse de l'APP.

4) La maladie d'alzheimer : une maladie complexe

La MA peut être divisée en deux catégories selon l'âge de commencement de la maladie : les formes précoces (EOAD pour « Early Onset Alzheimer's Disease ») et les formes tardives (LOAD pour « Late Onset Alzheimer's Disease »). L'âge de commencement des formes précoces varie entre 30 et 60 ans alors que les formes tardives débutent en général après 60 ans. Ces deux formes peuvent apparaître chez des personnes ayant un historique de MA dans leur famille. Lorsqu'il s'agit des formes précoces, 60% des patients présentent des cas multiples de MA dans leur famille et parmi ces cas familiaux, 13% héritent de la maladie d'une manière autosomique dominante [Campion *et al.* 1999 ; Brickell *et al.* 2006].

4.1 Les formes familiales de la maladie d'Alzheimer

Les formes familiales de la MA à transmission autosomique dominante sont des formes précoces qui résultent toutes de la mutation d'un seul gène, suffisante au déclenchement de la maladie.

4.1.1 Mutations sur le gène *APP*

Il a été observé que des personnes atteintes du syndrome de Down (trisomie 21) développaient des DA et présentaient d'autres similitudes neuropathologiques avec les patients atteints de MA [Brugge *et al.* 1994], laissant supposer que des gènes défectueux pouvaient se localiser sur ce chromosome chez ces patients. En effet, une étude de familles dans lesquelles la MA se transmettait de façon autosomique dominante avait mis en évidence une liaison génétique entre les loci 21q21 et 21q22-1, au niveau desquels se situait le gène *APP*, et la pathologie [George-Hyslop *et al.* 1987]. Celui-ci a alors été séquencé, ce qui a permis de mettre en évidence la première mutation impliquée dans une forme autosomique dominante de la MA [Goate *et al.* 1991]. A ce jour, 33 mutations sur le gène *APP* ont été identifiées (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>). Ces mutations représentent 10 à 15% des formes familiales autosomiques dominantes de la MA [Bird 2008].

La majorité des mutations retrouvées dans les formes familiales de la MA à transmission autosomique dominante sont des mutations ponctuelles correspondant à une substitution d'un acide aminé par un autre (mutations faux sens). Elles sont

majoritairement localisées dans les exons 16 et 17 du gène *APP* codant pour sa partie transmembranaire qui peut être clivée par les sécrétases, c'est à dire au niveau de la séquence du peptide A β . Plusieurs de ces mutations affectent ainsi les sites de coupure par les différentes sécrétases, entraînant une modification de la production des peptides amyloïdes et notamment le ratio A β_{1-42} /A β_{1-40} . D'autres mutations vont modifier le processus de fibrillation du peptide A β et entraîner une polymérisation plus rapide du peptide amyloïde en protofibrilles ou vont diminuer sa capacité de dégradation. Toutes ces mutations aboutissent à une augmentation de la formation des DA et sont alors responsables de formes agressives de la MA. Cependant, des études récentes ont identifié une mutation en position 673 de l'APP qui aurait un effet protecteur vis à vis de la MA en affectant le clivage par la β -sécrétase, entraînant ainsi une diminution de la production d'A β [Jonsson *et al.* 2012]. Une autre mutation à cette même position entraînerait une augmentation de la production des peptides A β et de leur agrégation à l'état récessif mais à l'état hétérozygote, le peptide mutant interagirait avec le sauvage et diminuerait sa capacité d'agrégation [Di Fede *et al.* 2009]. Les propriétés anti-amyloïdogéniques de cette nouvelle forme d'A β posent les bases de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur des peptides amyloïdes modifiés [Di Fede *et al.* 2012]. Le Tableau 2 résume la localisation de ces mutations, leur impact sur la production des peptides amyloïdes et les mécanismes impliqués.

Tableau 2 : Récapitulatif des mutations retrouvées sur le gène *APP*

Mutation	Localisation	Effet	Mécanisme impliqué	Données fonctionnelles	Références
Glu 665 Asp	exon 16	N-term	Non pathogène		[Peacock <i>et al.</i> 1994]
Lys670Asn/Met671Leu Swedish	exon 16	N-term	Délétère	Activation clivage β -sécrétase	A β 40 \uparrow A β 42 \uparrow [Mullan <i>et al.</i> 1992]
Ala673Thr	exon 16	N-term	Protecteur	Altération clivage β -sécrétase	A β 40 \downarrow A β 42 \downarrow [Jonsson <i>et al.</i> 2012]
Ala673Val	exon 16	N-term	Délétère/Protecteur	Production/Agrégation A β	A β 40 \uparrow A β 42 \uparrow [Di Fede <i>et al.</i> 2009]
His677Arg	exon 16	N-term	Non pathogène		- [Janssen <i>et al.</i> 2003]
Asp678Asn Tottori	exon 16	N-term	Délétère		- [Wakutani <i>et al.</i> 2004 ; 2005]
Glu682Lys Leuven	exon 16	N-term	Délétère		- [Brouwers <i>et al.</i> 2008]
Ala 692 Gly Flemish	exon 17	N-term	Délétère	Altération clivage α -sécrétase	A β 40 \uparrow A β 42 \uparrow [Kumar-Singh <i>et al.</i> 2002]
Glu 693 Lys Italian	exon 17	N-term	Délétère		A β 40 \downarrow A β 42 \downarrow [Tagliavini <i>et al.</i> 1999]
Glu 693 Gln Dutch	exon 17	N-term	Délétère	\uparrow agrégation A β	A β 40 \downarrow A β 42 \downarrow [Van Broeckhoven <i>et al.</i> 1990]
Glu693Gly Arctic	exon 17	N-term	Délétère		A β 40 \downarrow A β 42 \downarrow [Nilsberth <i>et al.</i> 2001]
Glu693del ; Glu693	exon 17	N-term	Délétère	\downarrow dégradation A β	A β 40 \downarrow A β 42 \downarrow [Tomiya <i>et al.</i> 2008]
Asp694Asn Iowa	exon 17	N-term	Délétère	-	- [Greenberg <i>et al.</i> 2003]
Leu705Val	exon 17	TM	Délétère	-	- [Obici <i>et al.</i> 2005]
Gly708	exon 17	TM	Non pathogène	-	- [Arango <i>et al.</i> 2001]
Ala713Thr	exon 17	TM	-	-	- [Carter <i>et al.</i> 1992]
Ala713Thr	exon 17	TM	Délétère	-	- [Bernardi <i>et al.</i> 2009]
Ala713Val	exon 17	TM	Non pathogène	-	- [Forsell <i>et al.</i> 1995]
Thr714Ala Iranian	exon 17	TM	Délétère	-	- [Lindquist <i>et al.</i> 2009]
Thr714Ile Austrian	exon 17	TM	Délétère		A β 40 \downarrow A β 42 \uparrow [Raux <i>et al.</i> 2005]
Val715Met French	exon 17	TM	Délétère		A β 40 \downarrow [De Jonghe <i>et al.</i> 2001]
Val715Ala German	exon 17	TM	Délétère	Modulation clivage γ -sécrétase	A β 40 \downarrow A β 42 \uparrow [Cruts <i>et al.</i> 2003]
Ile716Val Florida	exon 17	TM	Délétère		A β 40 \uparrow A β 42 \uparrow [De Jonghe <i>et al.</i> 2001]
Ile716Phe	exon 17	TM	Délétère		A β 40 \downarrow A β 42 \uparrow [Guerreiro <i>et al.</i> 2010]
Ile716Thr	exon 17	TM	Délétère		- [Terreni <i>et al.</i> 2002]
Val717Ile London	exon 17	TM	Délétère		A β 40 \downarrow A β 42 \uparrow [Brouwers <i>et al.</i> 2006].
Val717Leu	exon 17	TM	Délétère	Modulation clivage γ -sécrétase	A β 40 \downarrow A β 42 \uparrow [De Jonghe <i>et al.</i> 2001]
Val717Phe	exon 17	TM	Délétère		A β 40 \downarrow A β 42 \uparrow [Finckh <i>et al.</i> 2005]
Val717Gly	exon 17	TM	Délétère		A β 40 \downarrow A β 42 \uparrow [Chartier-Harlin <i>et al.</i> 1991]
Leu723Pro Australian	exon 17	TM	Délétère		A β 42 \uparrow [Kwok <i>et al.</i> 2000]
Lys724Asn Belgian	exon 17	TM	Délétère	Changement conformation APP	A β 42 \uparrow [Theuns <i>et al.</i> 2006b]
His733Pro	exon 17	TM	Non pathogène	-	Non pathogène [Guerreiro <i>et al.</i> 2010]

En plus des mutations ponctuelles sur le gène *APP*, des duplications ont été retrouvées dans les formes familiales à transmission autosomique dominante [Campion *et al.* 2006 ; Cabrejo *et al.* 2006 ; Rovelet-Lecrux *et al.* 2006 ; Thonberg *et al.* 2011]. Une duplication d'une petite partie du chromosome 21 contenant le gène *APP* suffirait alors à déclencher une démence accompagnée d'une AAC. Ces résultats laissent supposer qu'une dérégulation de l'expression du gène *APP* pourrait être impliquée dans la MA en entraînant une accumulation de protéines impliquées dans sa physiopathologie. Des études ont été menées à ce sujet et il a été observé que l'expression de l'APP est augmentée dans le cerveau de patients par rapport aux témoins [Schroeter *et al.* 2003 ; Theuns *et al.* 2000], bien que cela n'ait pas été retrouvé dans une étude récente [Pottier *et al.* 2012]. Des variants génétiques modulant l'activité transcriptionnelle de l'*APP* pourraient donc être impliqués dans la MA. En effet, des études cas-témoins européennes de formes précoces de la MA ont identifié des mutations dans le promoteur du gène *APP* qui augmenteraient son activité transcriptionnelle *in vitro* et que certaines d'entre elles étaient associées à la

MA (-369C/G, -479C/T et -534 G/A) [Theuns *et al.* 2006a ; Brouwers *et al.* 2006]. Ces associations n'ont pas été retrouvées dans une population française [Guyant-Marechal *et al.* 2007] mais un nouveau polymorphisme (-3102G/C) a été retrouvé associé à la MA dans cette population.

4.1.2 Mutations sur le gène *PSEN1*

Des études de liaison génétique ont révélé l'existence d'un locus impliqué dans la MA au niveau du chromosome 14 [Schellenberg *et al.* 1992] et une approche de clonage positionnel a identifié des mutations sur le gène *PSEN1* qui code pour la PS1, une sous-unité de la γ -sécrétase [Sherrington *et al.* 1995]. Les mutations sur le gène *PSEN1* constituent la cause majeure des formes familiales autosomiques dominantes de la MA. En effet, sur ce gène, on dénombre 185 mutations différentes identifiées dans 405 familles (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>). Ces mutations sont responsables de 18 à 50% des formes familiales autosomiques dominantes de la MA [Bekris *et al.* 2010] et certaines d'entre elles provoquent l'apparition de formes particulièrement précoces de MA [Campion *et al.* 1996].

Les mutations retrouvées sur le gène *PSEN1* sont des mutations faux sens. Elles sont réparties le long de la protéine avec une prédominance pour le domaine transmembranaire 2 et la boucle intracellulaire 6, dans laquelle se situe le site d'endoprotéolyse de la PS1 (voir paragraphe 3.2.4.3.1.3). Toutes ces mutations semblent altérer le métabolisme de l'APP, entraînant une augmentation de l'activité γ -sécrétase avec au final une augmentation de la production d'A β ₁₋₄₂. Il a été observé que ces mutations pouvaient affecter la structure ou la fonction de la PS1 [Bentahir *et al.* 2006] ainsi que son interaction avec les autres composants de la γ -sécrétase [Cruts *et al.* 1998]. Tout comme pour le gène *APP*, un polymorphisme situé dans le promoteur du gène *PSEN1* a été retrouvé comme étant associé avec une augmentation du risque de développer la MA et comme pouvant moduler l'expression de la PS1 dans les formes précoces complexes de la maladie [Lambert *et al.* 2001] mais pas dans les formes tardives [Araria-Goumidi *et al.* 2002].

4.1.3 Mutations sur le gène *PSEN2*

Un gène présentant de fortes homologues avec *PSEN1* a été identifié dans un locus situé sur le chromosome 1 et a été nommé *PSEN2* [Sherrington *et al.* 1996] ; [Rogaev *et al.* 1995]. Ce gène code pour la PS2, qui, tout comme la PS1, est un composant de la γ -sécrétase, le complexe ne pouvant contenir que l'une de ces présénilines (voir paragraphe 3.2.4.3.1.3). Contrairement aux mutations sur le gène *PSEN1*, celles localisées sur *PSEN2* sont plus rares et correspondent à un âge de commencement de la maladie plus tardif (45 à 88 ans) et variable [Campion *et al.* 1999]. Enfin, une pénétrance incomplète peut être retrouvée pour des mutations faux sens sur *PSEN2* et l'effet de ces mutations peut être modifié par d'autres gènes ou des facteurs environnementaux [Sherrington *et al.* 1996]. A ce jour, 14 mutations ont été identifiées. Ces mutations ont le même effet que celles observées sur le gène *PSEN1*, c'est à dire une diminution de la production d'A β ₁₋₄₀ et une augmentation de la production d'A β ₁₋₄₂ [Walker *et al.* 2005]. Cependant, certaines de ces mutations ne seraient pas fonctionnelles (<http://www.molgen.ua.ac.be/ADMutations>).

Les mutations situées sur les gènes *APP* et *PSEN 1* et 2 entraînent donc presque toutes une modification du métabolisme de l'APP aboutissant à une augmentation de la formation des DA.

4.2 Hypothèse de la cascade amyloïde

Les formes familiales de la MA ne touchent que des gènes impliqués dans le métabolisme de l'APP. En effet, bien que des mutations sur le gène *MAPT* aient été retrouvées comme étant impliquées dans certaines démences telles que la DFT [Hutton *et al.* 1998], aucune n'a été identifiée comme étant impliquées dans la MA. Ces observations ont alors introduit les bases de l'hypothèse de la cascade amyloïde, qui dans sa formulation initiale, stipulait que l'accumulation de peptide A β fibrillaire serait le premier événement conduisant ensuite à la formation des DNF en entraînant l'hyperphosphorylation de Tau [Hardy *et al.* 1992].

Cette hypothèse a ensuite évolué grâce à l'apport de nouvelles données, notamment grâce à la découverte des oligomères solubles d'A β toxiques [Hardy *et al.* 2002] qui auraient un effet plus toxique que les dépôts fibrillaires d'A β (voir paragraphe 3.2.2) (Figure 16). D'autres observations appuient cette hypothèse, telles

que l'étude de souris transgéniques sur-exprimant les protéines APP et Tau humaines et montrant une augmentation de la production des DNF comparé aux souris sur-exprimant uniquement Tau [Lewis *et al.* 2001]. Ainsi, ces résultats indiquent que l'altération du métabolisme de l'APP intervient avant la pathologie Tau, ces données étant confirmées par l'observation dans des neurones primaires hippocampiques de souris que la toxicité de l'A β était dépendante de Tau [Rapoport *et al.* 2002]. De plus, de nombreuses études ont montré qu'une altération de la dégradation et de la clairance de l'A β était impliquée dans la MA (voir paragraphe 3.2.4.3.2).

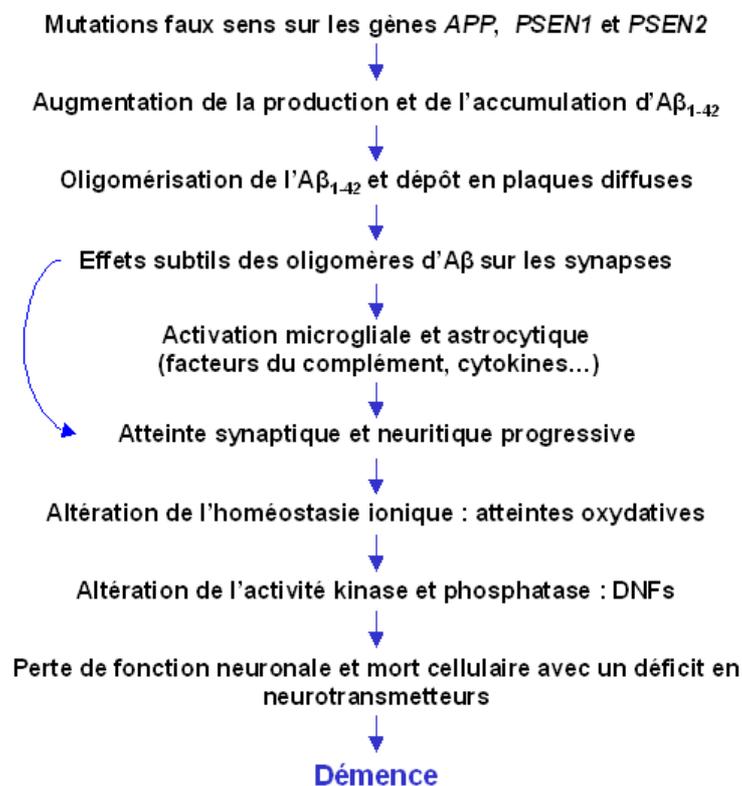


Figure 16 : Séquence d'évènements pathogènes aboutissant à la MA selon l'hypothèse de la cascade amyloïde [Hardy *et al.* 2002].

Un lien direct entre l'A β et la phosphorylation de Tau a également été mis en évidence. Des études ont en effet suggéré que GSK3 β , une kinase impliquée dans la phosphorylation de la protéine Tau retrouvée dans les DNF (voir paragraphe 3.3.3.2.1), pouvait être un lien entre l'accumulation d'A β et l'hyperphosphorylation de Tau [Muyllaert *et al.* 2008]. Ainsi, une augmentation de la production d'A β induirait une activation de Tau par l'activation de la GSK3 β . Cette activation se ferait par une fixation de l'A β sur un récepteur nicotinique à l'acétylcholine α 7, ce qui entraînerait

une cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation de GSK3 β et donc à l'hyperphosphorylation de Tau [Huang *et al.* 2009]. L'A β pourrait également augmenter l'activité de Cdk5, une kinase elle aussi impliquée dans l'hyperphosphorylation de Tau dans la MA. En effet, il a été observé que la production d'A β entraînait une augmentation du niveau de calcium intracellulaire [Mattson *et al.* 1992 ; Lopes *et al.* 2010]. L'A β pourrait enfin entraîner une phosphorylation de Tau de par son effet sur la production d'espèces réactives oxygénées [Melov *et al.* 2007].

Cependant, plusieurs données peuvent contester l'hypothèse de la cascade amyloïde, telles que l'existence de modèles murins sur-exprimant l'APP présentant une augmentation des dépôts d'A β mais ne présentant pas de perte neuronale [Irizarry *et al.* 1997] ou encore l'échec d'approches thérapeutiques visant à réduire le niveau d'A β dans le cerveau [Small *et al.* 2008]. D'autres hypothèses ont alors été mises en place. Une de ces hypothèses stipule que certains facteurs pourraient agir en parallèle sur la pathologie A β et sur la pathologie Tau, tels que la kinase GSK3 ou l'ApoE4 [Small *et al.* 2008].

De plus, bien qu'aucune mutation sur le gène Tau n'ait été identifiée comme étant responsable des formes familiales de la MA, il a été observé que des mutations du gène Tau dans la démence fronto-temporale avec un parkinsonisme liée au chromosome 17 (FTDP-17) suffisaient à elles seules à causer une neurodégénérescence et à entraîner l'apparition d'une démence [Gotz *et al.* 2004]. Il existe d'autres formes de démence dans lesquelles des DNF sont retrouvées sans présence de DA, telles que la dégénérescence corticobasale (DCB), la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la maladie de Pick (PiD) ou encore la maladie des grains agyrophiles (AgD) [Gotz *et al.* 2004]. Ainsi, la pathologie Tau peut suffire à elle seule à entraîner l'apparition de démences. Les DNF ont longtemps été considérées comme un évènement tardif mais plusieurs études ont montré que des agrégats de protéine Tau pouvaient être toxiques pour les synapses à des stades précoces [Crespo-Biel *et al.* 2012].

Ainsi, l'étude des formes familiales de la MA a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la MA notamment par l'élaboration de l'hypothèse de la cascade amyloïde. Cependant, les formes familiales à transmission autosomique dominante représentent moins de 1% des cas de MA. La majorité des cas sont des

formes sporadiques plus complexes qui font intervenir de nombreux facteurs, ce qui explique l'apparition de nouvelles hypothèses en parallèle de celle de la cascade amyloïde.

4.3 Les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer

L'âge de commencement des formes sporadiques est plus tardif que celui des formes familiales et contrairement à ces formes, le déclenchement de la maladie ne dépend pas de mutations sur un seul gène mais d'un ensemble complexe impliquant de nombreux gènes de susceptibilité et des facteurs environnementaux [Bird 2008].

4.3.1 Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer

4.3.1.1 L'âge et le sexe

L'âge est le facteur de risque majeur de la MA, avec une prévalence de la maladie qui double tous les cinq ans après 65 ans. Des études ont été effectuées afin d'étudier le risque de développer la MA en fonction de l'âge et du sexe [Seshadri *et al.* 1997 ; Seshadri *et al.* 2007]. Dans ces études, 2794 participants de plus de 65 ans ont été suivis pendant plus de 29 ans et le risque de développer la MA a été évalué à 65, 75 et 85 ans selon le sexe. Il a été observé que 1 femme sur 5 et 1 homme sur 10 de plus de 65 ans peuvent développer la maladie durant le temps qu'il leur reste à vivre.

4.3.1.2 Facteurs socio-économiques

De nombreux facteurs socio-économiques peuvent avoir un impact sur le risque de développer la MA, tels que le niveau d'éducation, l'activité physique, la consommation de tabac ou d'alcool [Chen *et al.* 2009] ainsi que le régime alimentaire ([Feart *et al.* 2010 ; Joseph *et al.* 2009]. Certains de ces facteurs, tels que la consommation de tabac ou le régime alimentaire, sont également fortement liés à des facteurs cardio-vasculaires, qui ont un impact reconnu sur la MA, d'où la difficulté de déterminer si ces facteurs ont un effet direct ou non sur le risque de développer la MA.

4.3.1.3 Facteurs vasculaires

De nombreuses études ont montré que les facteurs vasculaires étaient impliqués dans les démences et notamment dans la MA. L'impact des facteurs de risque vasculaires principaux sur la MA a donc été étudié. Ainsi, plusieurs études ont identifié une association entre l'hypertension artérielle en milieu de vie et la MA [Duron *et al.* 2008 ; Korf *et al.* 2004 ; Peters *et al.* 2008]. En effet, l'hypertension pourrait, en altérant la micro-circulation cérébrale, altérer le fonctionnement de la BHE, conduisant à une accumulation de peptide A β dans le cerveau [Perlmutter *et al.* 1991]. Une association entre le diabète et la MA a également été retrouvée, avec une incidence de la MA multipliée de 1,5 à deux fois chez les individus diabétiques [Luchsinger *et al.* 2007]. L'effet du diabète sur la MA serait en partie dû au fait que de nombreuses lésions vasculaires cérébrales sont retrouvées chez les diabétiques [Peila *et al.* 2002] mais celui-ci pourrait être plus direct en entraînant une diminution de la dégradation de l'A β [Qiu *et al.* 2006]. Une relation entre l'obésité en milieu de vie et les démences a aussi été retrouvée [Beydoun *et al.* 2008], une hyperinsulinémie étant très fréquemment observée chez les personnes en surpoids. Enfin, des études ont mis en évidence une association de l'hypercholestérolémie avec la MA [Anstey *et al.* 2008 ; Reitz *et al.* 2011]. Ici aussi, l'effet du cholestérol sur la MA passe par le fait qu'il favorise les lésions vasculaires mais également par un effet sur la formation des DA en augmentant l'activité β -sécrétase [Kojro *et al.* 2001 ; Fassbender *et al.* 2001]. Ces différentes affections survenant en milieu de vie auraient donc un impact sur le risque de développer la MA.

4.3.1.4 Expositions environnementales

Certaines études ont montré que l'exposition à des métaux, tels que l'aluminium [Ferreira *et al.* 2008], le zinc [Wang *et al.* 2010], le cuivre [Hou *et al.* 2006] ou encore le plomb [Wu *et al.* 2008] pouvait avoir un impact sur le risque de développer la MA, notamment en agissant sur l'agrégation d'A β [Wang *et al.* 2010].

4.3.2 Déterminants génétiques de la maladie d'Alzheimer

De nombreux facteurs semblent donc avoir un impact sur le risque de développer la MA. Cependant, des études effectuées sur des populations de jumeaux ont révélé que les facteurs génétiques représentaient 60 à 80% du risque

attribuable pour développer la MA [Gatz *et al.* 2006]. Les déterminants génétiques prennent donc une part importante dans la maladie. De nombreuses études ont alors été mises en œuvre afin d'identifier des déterminants génétiques de la maladie. Deux méthodes complémentaires classiques ont été utilisées : les études de liaison génétique dans les formes familiales et l'approche gène-candidat dans les études d'association cas-témoins.

4.3.2.1 Etudes de liaison génétique

Ces études consistent en la localisation de régions chromosomiques d'intérêt dans lesquelles se situent des gènes candidats potentiels. Elles consistent, par un criblage génomique, à étudier la ségrégation de marqueurs génétiques qui sont régulièrement espacés dans le génome dans des familles étendues et sur plusieurs générations. On distingue différents types de marqueurs génétiques tels que les polymorphismes de restriction (RFLP) qui sont caractérisés par la présence ou non d'un site de coupure par une endonucléase, les minisatellites qui correspondent à des séquences répétées ou encore les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) représentant des polymorphismes présentant une variation sur un seul nucléotide. Si dans plus de 50% des méioses, la maladie et un des allèles du marqueur étudié sont hérités simultanément, on dit alors qu'il existe une liaison génétique. Ainsi, le marqueur se situe sur le même chromosome que le gène défectueux et suffisamment proche du gène pour ne pas être séparé par des événements de recombinaisons génétiques au cours des générations.

Ces analyses, d'abord développées pour l'étude des formes monogéniques de la MA, permettant ainsi de mettre en évidence les gènes de l'*APP*, *PSEN1* et *PSEN2*, ont par la suite été utilisées pour rechercher des facteurs de susceptibilité dans les formes familiales sans transmission autosomique. Ces analyses ont en effet permis d'identifier des régions chromosomiques d'intérêt au niveau desquelles des gènes candidats pourront être identifiés par des études d'association.

4.3.2.2 Etudes d'association

Ces analyses sont appropriées pour étudier des effets restreints sur le risque de développer la maladie ou des interactions entre les facteurs étudiés. Elles sont basées sur la comparaison de la fréquence des variations génétiques entre une

population de témoins et une population de patients souffrant de MA. Les variations génétiques les plus fréquentes sont des SNP correspondant à une substitution d'un acide nucléique par un autre. La sur- ou sous-représentation statistiquement significative d'un allèle particulier dans l'un des deux groupes comparés suggère l'association de cet allèle avec la maladie. La force de l'association est alors estimée par le calcul de l'odds-ratio (OR) défini comme le rapport entre la proportion de sujets porteurs de l'allèle à risque chez les cas et la proportion de sujets porteurs de l'allèle à risque chez les témoins. Cet OR illustre l'augmentation ($OR > 1$) ou la diminution ($OR < 1$) du risque de survenue de la maladie chez les sujets porteurs de l'allèle rare par rapport aux sujets non porteurs de cet allèle.

Lors des études d'association, pour chaque polymorphisme testé, il est nécessaire de vérifier que celui-ci respecte l'équilibre d'Hardy-Weinberg dans la population témoin. La loi d'Hardy-Weinberg stipule qu'au sein d'une population dans laquelle les mariages entre individus se font au hasard (panmixie) et qui ne connaît ni migration, ni sélection naturelle, il y a un équilibre des fréquences alléliques et génotypiques d'une génération à l'autre. Cette loi permet donc de calculer les fréquences alléliques à partir de la mesure des fréquences génotypiques et inversement. Pour vérifier qu'un polymorphisme respecte l'équilibre d'Hardy Weinberg dans la population témoin, on utilise un test du χ^2 qui permet de calculer l'écart entre les fréquences observées et les fréquences théoriques respectives des différents génotypes. Si cet écart est significatif, la population n'est pas en équilibre d'Hardy-Weinberg.

4.3.2.3 Résultats des analyses génétiques

Dans les formes tardives de la maladie, une liaison génétique entre la région q13.2-13.3 du chromosome 19 et la MA a été mise en évidence [Pericak-Vance *et al.* 1991]. Parmi les gènes localisés dans cette région chromosomique se situait le gène codant pour l'ApoE, une protéine qui avait été retrouvée comme localisée au niveau des DA et comme pouvant se lier à l'A β *in vitro* [Wisniewski *et al.* 1992]. L'analyse des gènes candidats localisés dans cette région a confirmé que le gène de *APOE* était responsable de la liaison génétique avec la MA [Strittmatter *et al.* 1993].

Au total, les études de liaison génétique ont détecté plus de 20 loci liés à la MA [Pericak-Vance *et al.* 1997 ; Kehoe *et al.* 1999 ; Pericak-Vance *et al.* 2000 ;

Curtis *et al.* 2001 ; Li *et al.* 2002 ; Myers *et al.* 2002 ; Olson *et al.* 2002 ; Blacker *et al.* 2003 ; Farrer *et al.* 2003 ; Scott *et al.* 2003 ; Lee *et al.* 2004 ; Gordon *et al.* 2006 ; Lee *et al.* 2006 ; Sillen *et al.* 2006] et un consensus s'est développé pour 4 de ces régions chromosomiques en 9p21, 9q22, 10q21-25 et 12p11-12 [Kamboh 2004].

4.3.2.4 L'Apolipoprotéine E

4.3.2.4.1 Le gène *APOE* et ses différents allèles

Comme décrit précédemment, le gène codant pour l'ApoE se situe sur le chromosome 19 en position q13.2-13.3. Ce gène de 3,6 kpb se situe au niveau d'un cluster de gènes codant pour différentes apolipoprotéines (*APOE*, *APOC1*, *APOC2* et *APOC4*) [Lusis *et al.* 1987] et comprend 4 exons qui codent pour une glycoprotéine de 299 acides aminés et d'une masse de 37 kDa. Il existe trois allèles principaux du gène *APOE* définis par deux SNP localisés dans l'exon 4 du gène : le rs429358 et le rs7412. Trois isoformes de l'ApoE peuvent ainsi être générées, celles-ci différant les unes des autres par la présence d'une cystéine ou d'une arginine en positions 112 et 158 (ApoE2 : C112 et C158 ; ApoE3 : R112 et C158 ; ApoE4 : R112 et R158) [Strittmatter *et al.* 1995 ; Weisgraber 1994]. La fréquence de ces allèles dans la population est de 5 à 10 % pour l'allèle ϵ 2, de 65 à 70% pour l'allèle ϵ 3 et de 15 à 20% pour l'allèle ϵ 4 [Mahley *et al.* 2009].

Une association de l'allèle ϵ 4 du gène *APOE* avec la MA a été observée pour la première fois en 1993 avec une étude montrant une fréquence de cet allèle supérieure à 40% dans une population présentant des formes familiales tardives de MA [Strittmatter *et al.* 1993]. De nombreuses études ont confirmé par la suite cette association en l'identifiant également dans les formes sporadiques et dans les formes précoces. De plus, un effet dose dépendant du nombre de copies de l'allèle ϵ 4 a été identifié [Farrer *et al.* 1997]. Ainsi, les homozygotes pour l'allèle ϵ 4 voient leur risque de développer la MA de 15 fois et présentent un âge d'apparition de la maladie plus précoce [Corder *et al.* 1993]. L'allèle ϵ 2, quant à lui, aurait au contraire un effet protecteur [Farrer *et al.* 1997 ; Corder *et al.* 1994].

Une étude récente a montré que le risque de développer la MA était plus important chez les femmes porteuses de l'allèle ϵ 4 que chez les hommes porteurs de cet allèle, ce qui indique une héritabilité semi-dominante du gène avec une pénétrance incomplète [Genin *et al.* 2011]. Ces résultats se rapprochent plus de

ceux observés avec les gènes impliqués dans les maladies mendéliennes, tels que le gène *BRCA1* impliqué dans le cancer du sein [Chen *et al.* 2007], ce qui indique que le rôle de l'*APOE* dans la MA serait susceptible d'être réévalué.

4.3.2.4.2 Fonctions principales de l'ApoE

L'effet principal de l'ApoE est la régulation du métabolisme des lipides. En effet, l'ApoE est essentielle au catabolisme des constituants des lipoprotéines riches en triglycérides. L'ApoE est contenue dans les lipoprotéines telles que les VLDL (Very Low-Density Lipoprotein), les LDL (Low-Density Lipoprotein), les HDL (High-Density Lipoprotein) ou les chylomicrons, dont elle contrôle le déplacement et détermine ainsi l'homéostasie du cholestérol et des triglycérides [Siest *et al.* 1995]. L'ApoE peut aussi être impliquée dans d'autres mécanismes telles que l'immunoregulation, la régénération nerveuse, l'homéostasie neuronale et la réparation tissulaire [Cacabelos 2004]. En effet, l'ApoE joue un rôle crucial au niveau du SNC dans la mobilisation et la redistribution du cholestérol ainsi que des phospholipides durant le remodelage de la membrane associé à la plasticité synaptique [Poirier *et al.* 1993 ; Bales 2010]. Les isoformes de l'ApoE présentent des différences dans leur structure tri-dimensionnelle ce qui modulerait leur effet sur la régulation du métabolisme des lipides [Mahley *et al.* 2009]. Ainsi, l'ApoE3 et l'ApoE2 auraient une affinité plus forte pour les HDL alors que l'ApoE4 montre une préférence pour les VLDL, qui transportent les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol jusqu'aux cellules [Weisgraber *et al.* 1996].

4.3.2.4.3 Implication de l'ApoE dans la maladie d'Alzheimer

De nombreuses analyses ont donc révélé une association de l'ApoE4 avec un risque plus élevé de développer la MA alors que l'ApoE2 aurait au contraire un effet protecteur. Or, comme décrit précédemment, des différences structurelles ont été observées entre les isoformes de l'ApoE. Des études ont donc cherché tout d'abord à identifier par quels mécanismes l'ApoE influencerait sur la MA puis ont cherché à déterminer en quoi les différences structurelles des isoformes leur confèrent un impact différent sur le développement de la maladie.

Il a été observé que l'expression de l'ApoE était inversement corrélée à la quantité des DA [Lambert *et al.* 2005]. De plus, la protéine a été détectée au niveau

des plaques séniles [Strittmatter *et al.* 1993], suggérant un impact sur la formation des DA. Cet effet serait principalement expliqué par l'action de l'ApoE sur la clairance et l'agrégation d'A β et serait isoforme dépendant. En effet, plusieurs études ont suggéré que l'isoforme ApoE4 entraînerait une augmentation de l'agrégation d'A β se traduisant par une quantité de DA plus importante [Stratman *et al.* 2005 ; [Strittmatter *et al.* 1993 ; Polvikoski *et al.* 1995], alors que l'ApoE2 entraînerait au contraire une diminution de l'agrégation d'A β [Tiraboschi *et al.* 2004].

Cependant, de nombreuses études ont révélé que l'ApoE avait un rôle majeur dans la clairance de l'A β et que cet effet serait isoforme dépendant, avec un effet plus faible de l'ApoE4 sur son internalisation ou sa dégradation [Kline 2012 ; Jiang *et al.* 2008]. En effet, il a été observé que l'ApoE sous sa forme lipidée était nécessaire à la dégradation de l'A β par la microglie en facilitant son endocytose et sa dégradation dans le lysosome par la NEP (Figure 17) mais que la forme ApoE4 serait la moins efficace dans cette fonction [Jiang *et al.* 2008]. L'IDE, qui est capable de dégrader l'A β , est sécrétée par la microglie [Qiu *et al.* 1998] et il a été observé que l'ApoE pouvait réguler la dégradation de l'A β par cette enzyme (Figure 17) [Jiang *et al.* 2008]. Une étude a montré que l'isoforme ApoE4 diminuait l'expression de l'IDE au niveau des neurones, diminuant ainsi la dégradation de l'A β [Du *et al.* 2009]. L'ApoE pourrait également être une protéine chaperonne de l'A β [Wisniewski *et al.* 1992], permettant son transport à travers la BHE [Bell *et al.* 2007 ; Deane *et al.* 2008]. Or, les complexes formés entre l'A β et les ApoE2 et 3 passeraient plus rapidement la BHE que le complexe ApoE4-A β [Deane *et al.* 2008].

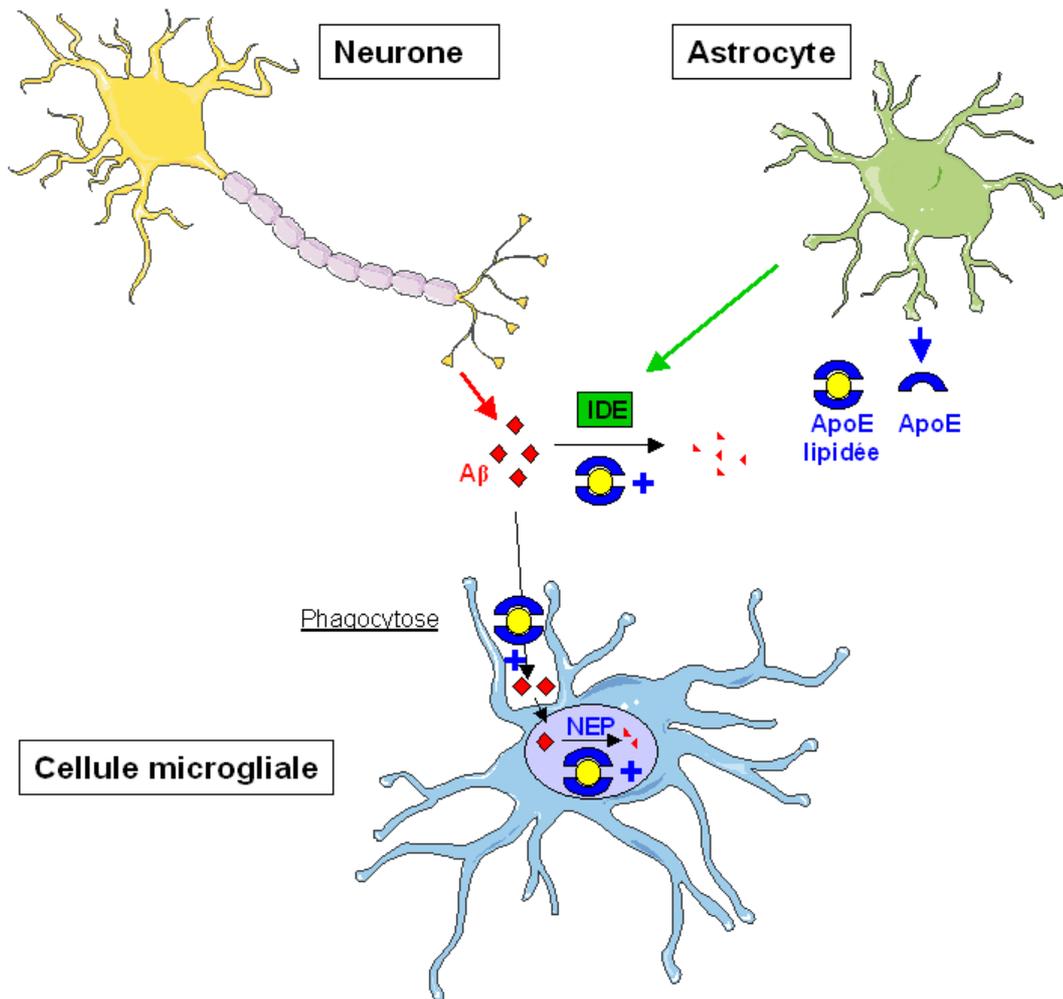


Figure 17 : Implication de l'ApoE dans la dégradation de l'Aβ [Jiang *et al.* 2008].

L'implication de l'ApoE dans la MA peut également passer par d'autres mécanismes, tels qu'une action sur le métabolisme de l'APP [Takeda *et al.* 2010], sur la plasticité synaptique [Nathan *et al.* 1994 ; Reiman *et al.* 2010] ou encore sur l'inflammation [Huebbe *et al.* 2010]. Pour chacun de ces mécanismes, des effets plus délétères sont observés avec l'isoforme ApoE4. Des études récentes ont même montré que l'ApoE4 pouvait être plus facilement clivée que les autres isoformes, ce qui aboutirait à la génération de fragments C-terminaux potentiellement neurotoxiques [Huang 2010]. Enfin, l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE* serait associé avec le risque d'AAC sporadique, qui est fréquemment retrouvée chez les patients atteints de MA, avec une sévérité dose dépendante du nombre d'allèle $\epsilon 4$ [Love *et al.* 2009].

Ainsi, l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE* possède un fort impact sur le développement de la pathologie. Il serait impliqué dans environ 20% des formes de MA sans

transmission mendélienne [Bertram *et al.* 2005]. Il s'est ensuite révélé nécessaire d'identifier les gènes expliquant les 80% restant du déterminisme génétique de la maladie.

4.3.2.5 Recherche d'autres déterminants génétiques par les analyses gène-candidat

Depuis 1993, les analyses gène-candidat ont permis de proposer environ 500 gènes comme déterminants génétiques de la MA mais aucun consensus n'a été mis en place du fait de l'absence de consistance des associations observées dans les populations indépendantes. Des méta-analyses ont été effectuées à partir de tous ces résultats [Bertram *et al.* 2007] et celles-ci ont retrouvé peu de gènes associés à la MA mis à part l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE*.

Plusieurs limites méthodologiques pourraient expliquer ces résultats, telles que la constitution hétérogène des populations, l'influence des facteurs environnementaux, les faibles puissances statistiques de nombreuses petites études ou encore de la génération de faux-positifs dans les publications. Les approches « gène-candidat » n'ont donc pas réussi à identifier d'autres déterminants génétiques de la MA. De ce fait, de nouvelles approches ont été mises en œuvre en complément des analyses génétiques.

5) Identification de gènes impliqués dans la MA par des analyses d'expression

5.1 Apport des analyses d'expression

Certains gènes impliqués dans la MA, tels que l'*APP* et l'*APOE*, ont été retrouvés comme étant différentiellement exprimés dans le cerveau des patients par rapport aux témoins [Brouwers *et al.* 2006 ; Lambert *et al.* 1998 ; Lambert *et al.* 2005 ; Theuns *et al.* 2006 ; Halimi *et al.* 2000]. Ainsi, des analyses du niveau d'expression des gènes dans la MA peuvent permettre d'identifier des déterminants génétiques de la maladie. Des analyses transcriptomiques et protéomiques ont alors été développées. Parmi celles-ci, les analyses transcriptomiques effectuées sur des puces à ADN complémentaire (ADNc), introduites en 1995 [Schena *et al.* 1995], ont permis de comparer l'expression d'un nombre important de gènes entre des patients atteints de MA et des témoins.

Les puces à ADNc sont des lames en verre, en silicium ou en plastique sur lesquelles va être fixé un nombre important de petites séquences d'ADNc simple brin, chacune des séquences correspondant à un gène. Il existe aussi des puces à ARN avec des sondes pouvant reconnaître les fragments d'ARN. Ensuite, les ARNs d'un échantillon biologique vont être extraits et retro-transcrits en ADNc et ces ADNc ainsi produits pourront alors s'hybrider avec les ADNc présents sur la puce (ou de nouveau transcrits *in vitro* en ARN avant d'être hybridés pour les puces à ARN). De cette manière, suite à un marquage des ADNc ou des ARNs obtenus, il sera possible de comparer l'expression d'un nombre important de gènes entre l'échantillon à étudier et un échantillon de référence.

Depuis 2005, 16 analyses du transcriptome de cellules issues de tissus post-mortem de patients atteints de MA et de contrôles ont été effectuées [Cooper-Knock *et al.* 2012]. De nombreux gènes ont été retrouvés comme étant modulés dans la MA et il a été observé que la modulation de leur expression était plus importante au niveau du lobe temporal, de l'hippocampe, du cortex frontal et du cortex pré-frontal [Katsel *et al.* 2007 ; Katsel *et al.* 2009]. De plus, il a été observé que les gènes connaissant les plus grandes variations d'expression étaient impliqués dans une démence modérée, suggérant que des stratégies thérapeutiques peuvent être élaborées à des stades précoces de la maladie [Haroutunian *et al.* 2009a ; Haroutunian *et al.* 2009b]. Des études effectuées sur des modèles de primates ont également révélé que beaucoup de gènes impliqués dans des voies métaboliques,

en particulier celles régulant la synthèse protéique, étaient sous-exprimés dans le cas d'une MA [Abdel *et al.* 2010].

5.2 Description des analyses transcriptomiques effectuées au laboratoire

Au laboratoire, une approche combinant des études de liaison génétiques et des analyses transcriptomiques a été élaborée afin d'identifier de nouveaux gènes candidats. Pour cela, un criblage d'ORF (Open Reading Frame), qui sont des séquences situées dans les gènes et codant pour des protéines, a été effectué dans des loci d'intérêts identifiés par les études génomiques (Tableau 3) [Kehoe *et al.* 1999 ; Myers *et al.* 2002 ; Pericak-Vance *et al.* 2000 ; Olson *et al.* 2002], en utilisant la base de donnée NCBI (National Center for Biotechnology Information). Ainsi, 2741 oligonucléotides spécifiques ont été sélectionnés. Ces nucléotides ont été synthétisés et purifiés de sorte à ce qu'ils aient tous une taille de 60 mers [Lambert *et al.* 2003].

Tableau 3 : Localisation chromosomique des loci d'intérêts identifiés par les études génomiques.

Chromosome d'intérêt	Taille du locus (cM)	Position
Chr 1	50	1p13.2-21.2
Chr 5	50	5p15.2-q11.2
Chr 6	40	6p21.33-q12
Chr 9	55	9p24.3-9p11.2
Chr 10	95	10q11.1-q24.3
Chr 12	40	12p13.33-q12.1
Chr 20	50	20p13-p11
Chr 21	58	Tout
Chr X	25	Xp22.13-p11.23

Pour effectuer les analyses transcriptomiques, des ARNs ont été extraits de cerveaux de patients atteints de MA et de contrôles. Les cerveaux des patients ont été récupérés après l'autopsie de 114 personnes d'origine caucasienne atteintes de formes sporadiques de MA précoces ou tardives provenant de la région de Manchester en Angleterre entre 1986 et 2001. Tous les patients étaient au stade de Braak 4 ou 5 au moment de leur mort et le diagnostic de la MA a été effectué en accord avec les critères du CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease) [Mirra *et al.* 1991]. Les 167 cerveaux des témoins eux aussi d'origine caucasienne ont été recrutés lors d'autopsies de routine dans les Hospices

Civils de Strasbourg. Lors de ce recrutement, tous les cas de démence et tous les cerveaux présentant des lésions caractéristiques de la MA ont été exclus. Les ARNs ont donc été extraits du cortex frontal de ces cerveaux et parmi eux, les ARNs de 12 cas et de 12 témoins ont été sélectionnés selon leur qualité. Les ARNs ont ensuite été amplifiés et marqués avec deux fluorophores différents : un fluorophore pour les ARNs provenant des patients et un fluorophore pour les ARNs provenant des contrôles. Enfin, ceux-ci ont été hybridés sur la puce et un scan a été effectué. En comparant les intensités de fluorescence des deux fluorophores pour chacun des transcrits étudiés sur la puce, les gènes différentiellement exprimés dans la MA ont ainsi pu être détectés.

Parmi les 2741 gènes étudiés en analyse transcriptomique, 106 gènes ont été retrouvés comme différentiellement exprimés chez les patients atteints de MA [Bensemain *et al.* 2009]. La localisation chromosomique de ces gènes est représentée dans le Tableau 4.

Tableau 4: Gènes différentiellement exprimés pour chacun des loci d'intérêt.

Locus	cM	Nombre d'ORFs sélectionnés	Nombre d'ORFs modulés	%
Chr. 1	50	393	12	3,0
Chr. 5	50	174	6	3,4
Chr. 6	40	535	24	4,5
Chr. 9	55	230	12	5,2
Chr. 10	95	415	15	3,6
Chr. 12	40	306	11	3,6
Chr. 20	50	239	9	3,8
Chr. 21	58	267	6	2,2
Chr. X	25	182	11	6,0
Total		2741	106	35,3

Les analyses se sont alors concentrées sur les gènes présentant la plus grande différence d'expression entre les malades et les témoins. Ainsi, le gène de l'Ornithine TransCarbamylyase (OTC) possédait la plus forte sur-expression dans le tissu cérébral des malades par rapport aux témoins, avec une expression retrouvée

presque uniquement chez les malades. Cette sur-expression a été confirmée par RT-PCR (Polymerase Chain reaction) et immunohistochimie et une augmentation de 880% de son activité enzymatique a également été observée dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients. En revanche, aucun polymorphisme n'a été retrouvé au niveau de ce gène comme étant associés à la MA [Bensemain *et al.* 2009]. Cependant, la découverte de ce gène différentiellement exprimé a permis d'apporter des informations importantes et suite aux résultats obtenus, un test diagnostique est en cours de développement.

Le gène *IL-33* (Interleukine 33) a quant à lui été retrouvé comme étant le plus sous-exprimé (66%) chez les malades par rapport aux témoins. Cette sous-expression a par la suite été validée dans une cohorte d'échantillons provenant de cerveaux de 43 patients atteints de MA et de 45 contrôles (Figure 18) [Chapuis *et al.* 2009]. En effet, une sous-expression d'*IL-33* de 40% a été retrouvée dans le cerveau des patients.

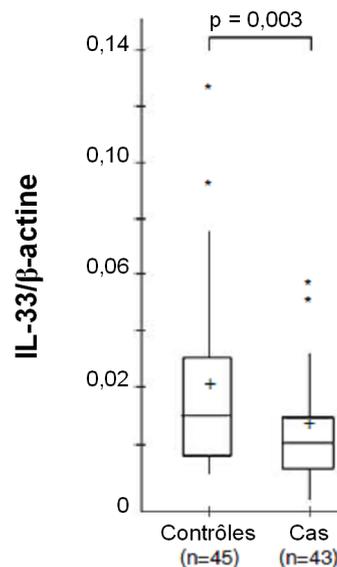


Figure 18 : Niveau d'expression d'*IL-33* dans les cerveaux des contrôles et des patients atteints de MA (cas). Cette expression est représentée en valeur arbitraire et correspond à une normalisation après quantification du niveau d'ARNm de l'actine. La croix représente la moyenne de l'expression d'*IL-33* et la ligne représente la médiane. La ligne horizontale la plus haute correspond à l'inclusion de 75% des individus et la ligne la plus basse à l'inclusion de 25% des individus. Les étoiles représentent les valeurs extrêmes en dehors de la distribution globale.

Des études d'association effectuées au laboratoire ont identifié 3 polymorphismes localisés dans les séquences introniques du gène *IL-33* associés à

la MA avec un effet protecteur chez les individus non porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE* [Chapuis *et al.* 2009]. Ainsi, *IL-33* s'est révélé être un déterminant génétique potentiel de la MA. Du fait de la diminution de son expression chez les malades par rapport aux témoins, nous nous sommes intéressés aux effets physiologiques de la protéine et nous avons cherché à déterminer son implication dans la MA.

5.3 L'Interleukine 33

5.3.1 Découverte d'IL-33

Le gène *IL-33* a été identifié pour la première fois sous le nom de *DVS27* par l'étude des ARNm différenciellement exprimés dans les artères vasospastiques de deux modèles d'hémorragie chez le chien [Onda *et al.* 1999]. *IL-33* a ensuite été cloné en 2003 suite à la recherche de gènes préférentiellement exprimés dans les HEV (High Endothelial Venules) [Baekkevold *et al.* 2003]. Son expression a ainsi été identifiée dans le noyau des cellules endothéliales des HEV, d'où son nom de NF-HEV (Nuclear Factor of High Endothelial Venules). Il a par la suite été observé que la protéine présentait des homologies de séquences avec les membres de la famille des IL-1 [Schmitz *et al.* 2005], d'où le nom d'IL-33.

Chez l'homme, le gène codant pour IL-33 est situé sur le bras court du chromosome 9 en position p24.1. Le gène *IL-33* mesure 60 kpb et est composé de 8 exons (Figure 19).

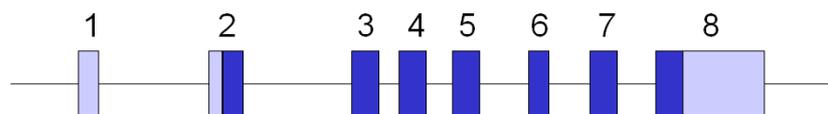


Figure 19: Structure du gène *IL-33*. Les zones en bleu clair représentent les séquences non traduites alors que les zones en bleu foncé correspondent aux séquences codantes.

5.3.2 Une protéine qui possède deux fonctions

IL-33 est une protéine de 270 acides aminés (30 kDa) qui possède deux parties distinctes, avec en N-terminal une structure de type hélice-tour-hélice (HTH) pouvant se fixer à l'ADN et en C-terminal une région présentant une homologie de séquence avec l'IL-1, d'où son nom d'interleukine 33. Cela laisse supposer que la protéine possède à la fois une fonction de régulation transcriptionnelle et une fonction d'interleukine (Figure 20).

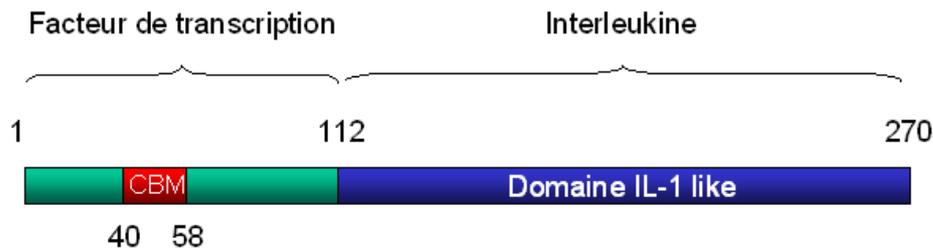


Figure 20 : Les deux fonctions de la protéine IL-33.

a) Un facteur de régulation transcriptionnelle

La structure de type HTH d'IL-33 dans sa partie N-terminale, correspondant à un homéodomaine de type POU (Pit1, Oct 1 et 2, Unc-86), peut se fixer à l'ADN, ce qui suggère la fonction de facteur de régulation transcriptionnelle d'IL-33 [Baekkevold *et al.* 2003]. Ce domaine HTH, comprenant un noyau hydrophobe et de deux hélices alpha, (hélices 2 et 3) complété par une autre hélice alpha (hélice 1), est situé dans les 65 premiers acides aminés d'IL-33 [Carriere *et al.* 2007].

La protéine IL-33 pourrait également se fixer à l'hétérochromatine et aux chromosomes mitotiques en se fixant sur la poche acide formée par les dimères d'histones H2A-H2B à la surface du nucléosome [Carriere *et al.* 2007]. Les résidus essentiels pour la fixation d'IL-33 aux chromosomes se situeraient entre les acides aminés 40 et 58, dans une région appelée motif de fixation à la chromatine (CBM) [Roussel *et al.* 2008] (Figure 20). Des études ont montré que la poche acide des dimères d'histones H2A-H2B pourrait jouer un rôle crucial dans la compaction de la chromatine [Chodaparambil *et al.* 2007 ; Zhou *et al.* 2007], suggérant que le CBM d'IL-33 pourrait avoir une influence sur la structure de la chromatine. En effet, il a été observé qu'IL-33 pouvait réguler sa compaction en augmentant l'association et l'oligomérisation du nucléosome pour aboutir à des niveaux d'organisation supérieurs de la chromatine [Roussel *et al.* 2008]. De plus, des études ont montré que la poche acide du nucléosome couplait la compaction de la chromatine avec une répression transcriptionnelle [Zhou *et al.* 2007]. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle IL-33, en se fixant sur la poche acide du nucléosome via son domaine CBM, pourrait, en entraînant une compaction de la chromatine, avoir un effet répresseur sur la transcription des gènes.

Des études récentes ont montré qu'IL-33 pourrait interagir avec le facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor κ B). Cette interaction se ferait entre les acides

aminés 66 et 109 dans la partie N-terminale d'IL-33. Cette interaction entraînerait alors un blocage de l'activité de NF- κ B [Ali *et al.* 2011].

b) La fonction interleukine d'IL-33

IL-33 appartient à la famille des interleukines IL-1 dont les principaux membres sont IL-1 α/β , IL-1R α et IL-18. La protéine IL-33 est produite sous forme d'une protéine précurseur de 30 kDa comme IL-1 β et IL-18 et serait clivée *in vitro* par la caspase 1 afin de produire une forme sécrétoire mature de 18 kDa. Cependant, le site de clivage par la caspase 1 n'a pas été retrouvé dans la protéine IL-33 et celui-ci serait alors très faible comparé à celui d'IL-1 β [Cayrol *et al.* 2009 ; Talabot-Ayer *et al.* 2009]. La caspase 1 pourrait en revanche activer d'autres protéases qui pourraient entraîner le clivage d'IL-33 [Lamkanfi *et al.* 2008]. En effet, IL-33 pourrait être clivé par la caspase 7 et de manière moins importante par la caspase 3 [Luthi *et al.* 2009], ainsi que par la calpaïne [Hayakawa *et al.* 2009]. En revanche, le produit de ces clivages serait biologiquement inactif, suggérant que ceux-ci auraient un effet régulateur sur l'activité d'IL-33 [Cayrol *et al.* 2009 ; Luthi *et al.* 2009].

La stimulation de cellules avec IL-33 entraîne une production d'IL-5 et d'IL-13 ainsi qu'une augmentation d'immunoglobulines (Ig) dans le sérum, ce qui est typique d'une réponse immunitaire de type TH2 [Schmitz *et al.* 2005], qui correspond à une réponse humorale. Il a également été observé qu'IL-33 avait un effet chémoattractant sur les lymphocytes T de type TH2, indiquant son rôle important dans la mobilisation des cellules T [Komai-Koma *et al.* 2007]. IL-33 est également un inducteur potentiel de sécrétion de cytokines et chemokines pro-inflammatoires par les mastocytes (IL-1, IL-6, IL-13, TNF , CCL2 et CCL3).

5.3.3 Localisation tissulaire et cellulaire d'IL-33

L'ARNm d'IL-33 a été retrouvé comme exprimé dans de nombreux organes et de nombreux types cellulaires chez l'homme [Schmitz *et al.* 2005], bien que son expression soit majoritaire dans les cellules endothéliales vasculaires des amygdales, des ganglions lymphatiques et des plaques de Peyer [Baekkevold *et al.* 2003]. En effet, IL-33 est exprimée abondamment dans les HEV, des vaisseaux sanguins spécialisés qui médient le recrutement des lymphocytes dans les organes lymphoïdes [Baekkevold *et al.* 2003 ; Carriere *et al.* 2007]. La protéine est également

exprimée dans les fibroblastes [Sanada *et al.* 2007], dans les cellules épithéliales [Moussion *et al.* 2008], dans les kératinocytes, dans les CML artérielles et dans les macrophages [Schmitz *et al.* 2005].

En plus des organes lymphoïdes, l'expression d'IL-33 a été localisée au niveau micro-vasculaire de nombreux tissus tels que le foie, les muscles squelettiques, les reins, la prostate et la peau [Moussion *et al.* 2008]. Son expression dans les cellules épithéliales est majoritairement retrouvée au niveau des bronches [Schmitz *et al.* 2005], de la peau et du tube digestif, c'est à dire des surfaces pouvant être en contact avec des pathogènes [Moussion *et al.* 2008], ce qui confirme l'implication d'IL-33 dans la réponse immunitaire. IL-33 est également exprimée dans les fibroblastes cardiaques [Sanada *et al.* 2007] et ceux situés dans les ganglions lymphatiques [Moussion *et al.* 2008]. Enfin, il a été observé au laboratoire pour des analyses d'immunohistochimie qu'au niveau cérébral, l'expression d'IL-33 était restreinte à l'endothélium et aux CML des petites artères localisées dans l'arachnoïde, la pie mère et le cortex superficiel des cerveaux de patients atteints de MA et de contrôles [Chapuis *et al.* 2009]. Des études récentes ont également montré que la protéine était exprimée au niveau du SNC dans les cellules endothéliales ainsi que dans les astrocytes [Yasuoka *et al.* 2011].

La localisation cellulaire d'IL-33 a été majoritairement retrouvée dans le noyau, notamment en ce qui concerne les cellules endothéliales [Carriere *et al.* 2007 ; Moussion *et al.* 2008]. Cependant, IL-33 peut être par la suite sécrétée pour agir en tant qu'interleukine. La protéine ne possède pas de peptide signal et n'est donc pas sécrétée par le système RE-Golgi. Tout comme la protéine HMGB1 (High Mobility Group Box 1) avec laquelle elle partage de nombreuses similitudes structurelles, IL-33 serait amenée à la membrane plasmique par des lysosomes sécrétoires [Moussion *et al.* 2008 ; Klune *et al.* 2008 ; Bonaldi *et al.* 2003] et pourrait également être relarguée de manière passive par les cellules nécrotiques lors de dommages cellulaires ou de lésions tissulaires, agissant ainsi comme une alarmine [Haraldsen *et al.* 2009].

5.3.4 Signalisation et cibles d'IL-33

5.3.4.1 Identification d'un récepteur à IL-33

En 2005, des études ont montré qu'IL-33 pouvait se fixer sur le récepteur ST2 [Schmitz *et al.* 2005]. Le gène de ce récepteur avait été identifié pour la première fois en 1989 [Tominaga *et al.* 1989] mais il est resté orphelin jusqu'à l'identification d'IL-33. Il existe 4 isoformes du récepteur ST2 : les isoformes ST2L, ST2V et ST2LV [Tago *et al.* 2001] qui sont des protéines localisées à la membrane et ne possédant qu'un seul domaine transmembranaire et l'isoforme sST2 qui correspond à une forme soluble qui ne possède pas les domaines intracellulaires et membranaires. Les voies de signalisation du récepteur ST2L [Chackerian *et al.* 2007 ; Ali *et al.* 2007 ; Schmitz *et al.* 2005] aboutissent à la production de cytokines de type Th2. En revanche, cette signalisation peut être neutralisée par la fixation d'IL-33 sur la forme soluble du récepteur sST2 [Miller *et al.* 2011].

5.3.4.2 Cibles cellulaires d'IL-33

Suite à la découverte du récepteur ST2, les cibles cellulaires d'IL-33 ont alors pu être identifiées. Ainsi, il a été observé que de nombreuses cellules exprimaient ST2L à leur surface et pouvaient donc répondre à une activation par IL-33.

a) Cellules du système immunitaire

Il a été observé que le récepteur ST2 était localisé sur les cellules de type Th2 mais pas sur celles de type Th1 [Lohning *et al.* 1998], la stimulation des cellules Th2 par IL-33 entraînant alors une production des cytokines IL-5 et IL-13 [Kurowska-Stolarska *et al.* 2008]. IL-33 pourrait également activer les cellules dendritiques, entraînant une polarisation de cellules T naïves en cellules de phénotype Th2 [Rank *et al.* 2009]. Le récepteur a aussi été retrouvé dans les macrophages. IL-33 induirait ainsi une augmentation de la production du TNF α par les macrophages, jouant alors un rôle important durant l'infection bactérienne [Espinassous *et al.* 2009] et pourrait également agir sur leur polarisation [Kurowska-Stolarska *et al.* 2009]. IL-33 aurait également une action activatrice sur les basophiles [Smithgall *et al.* 2008], les neutrophiles [Alves-Filho *et al.* 2010] et les éosinophiles [Cherry *et al.* 2008]. Enfin, les mastocytes expriment également ST2L et l'activation par IL-33 induirait une

dégranulation de ces mastocytes, leur maturation et une production de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1, IL-6, IL-13 ou TNF α [Iikura *et al.* 2007].

b) Autres cellules

De nombreuses études ont révélé qu'IL-33 était exprimée au niveau des cellules endothéliales. Or, il a été observé que ces cellules endothéliales possédaient le récepteur ST2L et pouvaient également exprimer le récepteur sST2 [Aoki *et al.* 2010]. Ainsi, les cellules endothéliales peuvent être elles même activées par l'interleukine. Il a en effet été observé qu'IL-33 induirait leur prolifération, leur perméabilité, leur production d'oxyde nitrique (NO) [Choi *et al.* 2009] ainsi que la sécrétion des cytokines IL-6 et d'IL-8 [Aoki *et al.* 2010]. En plus des cellules endothéliales, d'autres cellules peuvent être activées par IL-33, telles que les cellules épithéliales, les adipocytes, les ostéoblastes, les myocytes cardiaques ou encore les cellules gliales [Miller *et al.* 2011]. Au niveau du SNC, il a en effet été observé qu'IL-33 pouvait entraîner une prolifération de la microglie ainsi qu'une production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , IL-1 β ou de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et une sécrétion de NO par ces cellules microgliales [Yasuoka *et al.* 2011].

5.3.5 IL-33 : effet protecteur ou délétère ?

IL-33 possède donc de nombreuses cibles cellulaires, ce qui suggère de nombreuses implications dans divers processus physiologiques ou physiopathologiques.

5.3.5.1 Infection et inflammation

Nous avons vu précédemment qu'IL-33 était impliquée dans une réponse immunitaire de type Th2. Cette réponse correspond à une activation de lymphocytes de type Th2 qui vont fabriquer des facteurs solubles, en particulier l'IL-4, et activer la production d'immunoglobulines (Ig) par les lymphocytes B. Cette réponse est généralement activée dans les processus allergiques et en présence de parasite. Ainsi, un rôle d'IL-33 dans la lutte contre l'infection parasitaire a tout d'abord été suggéré [Humphreys *et al.* 2008]. Cependant, il a également été observé qu'IL-33 pouvait agir sur l'infection virale [Walzl *et al.* 2001]. IL-33 aurait donc un rôle

protecteur au niveau de l'infection, ce qui explique d'ailleurs pourquoi l'interleukine est produite par des cellules constituant les tissus en contact avec l'environnement.

Cependant, IL-33 peut également avoir un effet délétère de par son implication dans l'inflammation. En effet, il a été observé qu'IL-33 était fortement exprimée dans les maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux [Kuroiwa *et al.* 2001] ou encore la maladie de Crohn [Abraham *et al.* 2009 ; Sponheim *et al.* 2010], qui se caractérise par une inflammation intestinale. Un effet pro-inflammatoire serait également observé dans l'arthrite [Xu *et al.* 2008 ; Palmer *et al.* 2009]. L'interleukine est aussi impliquée dans des processus allergiques tels que l'asthme en participant à l'activation des mastocytes pendant la réponse à un allergène, provoquant alors leur dégranulation [Hayakawa *et al.* 2007 ; Pushparaj *et al.* 2009]. En effet, il a été observé que le niveau d'IL-33 était plus élevé chez les asthmatiques [Prefontaine *et al.* 2009]. L'étude de souris KO pour le gène *IL-33* a d'ailleurs confirmé son effet sur l'inflammation et la réponse allergique [Oboki *et al.* 2010].

5.3.5.2 IL-33 et maladies cardio-vasculaires

La réponse immunitaire de type Th1 est impliquée dans le processus physiopathologique de l'athérosclérose. Or, IL-33, en induisant une réponse de type Th2, aurait un effet protecteur vis à vis de cette affection [Miller *et al.* 2008]. Il a également été observé que la production d'IL-33 par les fibroblastes cardiaques pouvait être induite biomécaniquement suite à un infarctus du myocarde et qu'IL-33, par une action antagoniste à l'angiotensine II, diminuerait l'hypertrophie cardiaque consécutive à l'infarctus, améliorant ainsi la survie [Kakkar *et al.* 2008]. IL-33 aurait donc un effet protecteur vis à vis de certaines affections cardio-vasculaires.

5.3.5.3 IL-33 et maladies fibroprolifératives

Une implication d'IL-33 dans la fibrose a été observée. En effet, il a été observé que le récepteur ST2 et IL-33 étaient sur-exprimés dans le foie subissant la fibrose chez l'homme et chez la souris [Marvie *et al.* 2010]. Il a également été observé qu'IL-33 était impliquée dans la fibrose au niveau pulmonaire [Tajima *et al.* 2003]. En effet, une augmentation de l'expression du gène codant pour le récepteur ST2 a été observée lors de la fibrose pulmonaire.

5.3.5.4 Effets d'IL-33 dans le système nerveux

IL-33 pourrait être impliqué dans la production de cytokines pro-inflammatoires par la microglie que l'on peut observer au cours de la MA. Cependant, aucun effet délétère d'IL-33 n'a été observé au niveau de l'inflammation que l'on retrouve dans le cerveau des patients atteints de MA. Néanmoins, des études ont identifié un rôle pathogène d'IL-33 dans l'hypoxie du SNC et les dommages vasculaires. En effet, IL-33 a été identifié pour la première fois lors de l'étude de gènes exprimés suite à une hémorragie arachnoïdienne [Onda *et al.* 1999].

En revanche, IL-33 aurait un effet sur la défense immunitaire du SNC [Hudson *et al.* 2008]. Au niveau du système nerveux périphérique, IL-33 pourrait avoir un rôle dans la nociception. En effet, IL-33 agirait en amont du TNF, IL-1 β , IFN γ , de l'endothéline et de la prostaglandine E2 pour médier la douleur [Verri, Jr. *et al.* 2008].

Ainsi, IL-33 semble être impliqué dans de nombreux mécanismes pathologiques ou non. Etant donné qu'IL-33 a été retrouvé comme étant sous-exprimé chez les patients atteints de MA, nous pouvons supposer que la protéine aurait un effet protecteur sur le risque de développer la MA. Nous avons donc cherché à identifier par quels mécanismes IL-33 pouvait influencer sur la physiopathologie de la MA.

5.4 Implication d'IL-33 dans la MA

5.4.1 Association d'IL-33 avec l'AAC

Comme décrit dans le paragraphe 5.3.3, IL-33 a été détectée dans le cerveau au niveau de l'endothélium vasculaire dans des cerveaux de patients atteints de MA et de contrôle, ce qui laisse suggérer que la protéine pourrait être associée à des phénomènes vasculaires dans le cerveau que l'on peut observer au cours de la MA.

Lors des études d'association effectuées au laboratoire, les trois polymorphismes sur le gène *IL-33* retrouvés comme étant associés à la MA ont également été retrouvés comme étant associés avec l'AAC chez les individus non porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE*. En effet, les individus portant au moins un allèle mineur de ces trois polymorphismes présentent un taux d'AAC plus faible [Chapuis *et al.* 2009]. Etant donné que l'AAC résulte d'une accumulation d'A β_{1-40}

dans les vaisseaux sanguins cérébraux, il a été supposé qu'IL-33 pouvait avoir un impact sur le métabolisme de l'APP.

5.4.2 Etude de l'effet d'IL-33 sur le métabolisme de l'APP

L'impact d'IL-33 sur le métabolisme de l'APP a été étudié sur des cellules de neuroblastome sur-exprimant l'isoforme neuronale 695 de l'APP de manière stable (SKNSH-SY5Y-APP^{695wt}). Pour cela, IL-33 a été sur-exprimé dans ce modèle cellulaire et il a été observé une diminution de la sécrétion d'A β ₄₀ de 30% dans les cellules sur-exprimant IL-33. En revanche, aucune variation de la sécrétion d'A β ₄₂ ou d'autres fragments issus du métabolisme de l'APP n'a été observée [Chapuis *et al.* 2009] (Figure 21). IL-33 entraîne donc une diminution de la sécrétion d'A β ₁₋₄₀, ce qui est en accord avec son effet protecteur sur l'AAC.

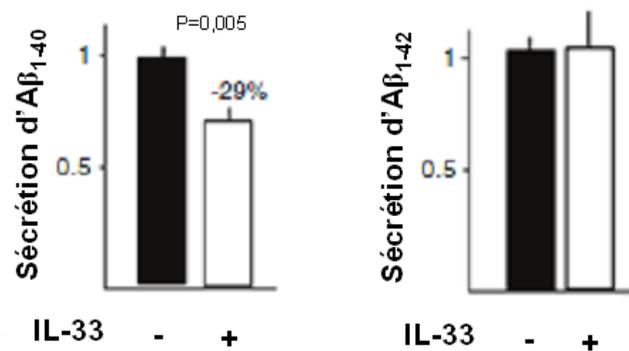


Figure 21 : Mesure de la variation du niveau d'A β dans les cellules de neuroblastome sur-exprimant ou non IL-33. La condition dans laquelle les cellules ne sur-expriment pas IL-33 a été rapportée à 1. Les graphes représentent 3 expérimentations indépendantes réalisées en duplicat [Chapuis *et al.* 2009].

Comme décrit dans le paragraphe 5.3.2, IL-33 est une protéine possédant deux fonctions : une fonction de facteur de régulation transcriptionnelle et une fonction d'interleukine. Des analyses ont donc été effectuées afin d'identifier par quelle action IL-33 avait un impact sur le métabolisme de l'APP. Pour cela, les cellules SKNSH-SY5Y-APP^{695wt}, dont on sait qu'elles expriment le récepteur ST2, ont été mises en présence d'une protéine IL-33 recombinante correspondant à la partie interleukine dans leur milieu de culture. Or, ces analyses ont révélé que contrairement à ce qui a été observé après transfection de la forme complète d'IL-33, l'exposition des cellules à cette protéine recombinante ne semble pas avoir d'impact sur la sécrétion d'A β ₄₀ [Chapuis *et al.* 2009]. De plus, des analyses

d'immunofluorescence ont indiqué une localisation nucléaire d'IL-33 dans les cellules transfectées [Chapuis *et al.* 2009]. L'impact d'IL-33 sur le métabolisme de l'APP semblerait être médié par son activité de régulation transcriptionnelle.

Ainsi, de par une approche fonctionnelle, nous avons pu identifier un gène différentiellement exprimé dans la MA qui semble avoir un impact dans la physiopathologie de la MA. Les analyses d'expression peuvent donc permettre l'identification de biomarqueurs, comme l'OTC ou de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la maladie dans le cas d'IL-33. Elles permettent alors d'apporter des informations complémentaires à celles obtenues lors des analyses gène-candidat. Néanmoins, entre temps, de grandes avancées ont été effectuées quant à l'identification de déterminants génétiques de la MA.

6) Identification de déterminants génétiques de la MA grâce aux analyses sur génome entier

6.1 Les Tag-SNP et le développement des analyses à haut débit

L'identification des Tag-SNP dans le génome humain et le développement d'analyses à haut débit ont permis de mieux comprendre les maladies complexes en effectuant des études d'association sans *a priori* sur le génome entier. Afin de comprendre le principe des Tag-SNP, il est nécessaire de maîtriser la notion de déséquilibre de liaison.

6.1.1 Le déséquilibre de liaison

On dit qu'il y a déséquilibre de liaison si la fréquence des gamètes porteurs des allèles de deux loci différents est différente du produit des fréquences des allèles, c'est-à-dire s'il y a association préférentielle entre deux allèles. Le déséquilibre de liaison est alors défini par la valeur D . Si cette valeur est nulle, cela signifie que les deux loci comparés sont indépendants et sont alors à l'équilibre. En revanche, si la valeur n'est pas nulle, il y a un déséquilibre de liaison entre les deux loci. Si cette valeur est supérieure à 0, les allèles rares ou les allèles fréquents des deux loci sont associés ensemble alors que si la valeur est inférieure à 0, l'allèle rare d'un locus est associé avec l'allèle fréquent de l'autre locus. Une valeur D_{max} , correspondant à la valeur maximale de D , pourra alors être calculée. Cette valeur est calculée à partir des fréquences alléliques des deux loci. Par exemple, dans le cas où la fréquence allélique de l'allèle rare du locus A (pA) est plus faible que celle du locus B (pB) et en considérant que l'allèle fréquent correspond à 1(A1, B1) et le rare à 2 (A2, B2), on obtient les calculs suivants :

- Si $D > 0$, $D_{max} = pA2 (1 - pB2) = pA2 pB1$
- Si $D < 0$, $D_{max} = pA2 (1 - pB1) = pA2 pB2$

Le déséquilibre de liaison est exprimé plus fréquemment sous la forme de deux coefficients :

- Le coefficient D' qui est égal au rapport D/D_{max} et qui est compris entre -1 et $+1$. Plus la valeur absolue du D' est proche de 1, plus le déséquilibre de liaison est fort.

- Le coefficient de corrélation entre les allèles r^2 ou D^2 qui se situe entre 0 et 1. La valeur 1 correspond à un déséquilibre parfait, avec un D' égal à 1 et avec des fréquences alléliques égales dans les deux loci.

6.1.2 Haplotypes et Tag-SNP

Lorsqu'un déséquilibre de liaison significatif est observé pour au moins deux polymorphismes localisés sur le même chromosome, il est possible de définir des haplotypes, c'est à dire des combinaisons particulières de SNP. Ces haplotypes sont séparés par des régions en faible déséquilibre de liaison qui représentent des points de recombinaison méiotique. Ainsi, la transmission des séquences nucléotidiques d'un chromosome se fait par bloc haplotypique. Au sein de ces blocs, il y a une faible probabilité de recombinaison. Les fréquences haplotypiques sont sensées n'être calculables que dans les études familiales. Cependant, des modèles statistiques permettent d'estimer les fréquences haplotypiques à partir des fréquences génotypiques mesurées dans des échantillons de population composés d'individus non apparentés [Tregouet *et al.* 2004 ; Furihata *et al.* 2006].

Les blocs haplotypiques peuvent donc contenir un nombre variable de polymorphismes ou même de gènes. Ils présentent un fort intérêt pour les études d'association car compte tenu de la corrélation partielle qui existe entre les polymorphismes d'un bloc haplotypique, il est possible d'identifier le ou les SNP(s) les plus informatifs de cet haplotype, qui sont appelés Tag-SNP. Les Tag-SNP permettent donc de réduire le nombre de polymorphismes à tester sans pour autant perdre d'information génétique.

Des consortiums internationaux se sont alors mis en place afin de répertorier le plus de SNP possibles. Ainsi, le consortium HapMap, débuté en octobre 2002, a permis de générer une base de données comprenant les variations génétiques les plus communes (correspondant à une fréquence de l'allèle mineur supérieure à 0,05) et définissant les blocs de déséquilibre de liaison et les haplotypes communs dans le génome [International Hapmap Consortium, 2005 ; Frazer *et al.* 2007]. Ces bases de données ont été la base de la mise en place d'études d'association sur le génome entier (GWAS pour « Genome wide Associations Studies »).

6.1.3 Les études d'association sur génome entier (GWAS)

Les GWAS sont des études d'association utilisant des plateformes de génotypage à haut débit composées de Tag-SNP représentant chacun un sous ensemble des SNP communs connus dans le génome, permettant alors d'étudier le génome entier. Il existe différentes plateformes, comme la plateforme Affymetrix GeneChip 500k ou encore la plateforme Illumina Hap300 [Frazer *et al.* 2007]. Ainsi, près de 1 million de marqueurs génétiques ont pu être testés pour des associations génétiques avec le risque de développer la MA et des endophénotypes tels que l'âge d'apparition de la maladie, des biomarqueurs, des résultats d'imagerie ou encore des effets neuropathologiques [Bertram *et al.* 2009; Bertram *et al.* 2010]. A ce jour, une vingtaine de GWAS ont été effectuées afin d'identifier les déterminants génétiques de la MA (www.alzgene.org/largescale.asp). La première association trouvée a été celle du gène *GAB2* (growth factor receptor bound protein 2 – associated binding protein 2) en 2007 [Reiman *et al.* 2007] mais celle-ci a nécessité une stratification du statut *APOE*. De plus, son association avec la maladie n'a pas pu être confirmée. Les premiers gènes associés à la MA sans cette stratification sont *ATXN1* (ataxin 1) et *CD33* (siglec 3) [Bertram *et al.* 2008]. En 2009, 2 GWAS utilisant de très grandes populations cas-témoins ont identifié 3 nouveaux gènes : *CLU* (clusterin; apolipoprotein J), *CR1* (complement component (3b/4b) receptor 1), et *PICALM* (phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein) [Harold *et al.* 2009 ; Lambert *et al.* 2009]. En 2010, de nouveaux gènes ont été identifiés dont le gène *BIN1* (bridging integrator 1) [Seshadri *et al.* 2010] qui avait déjà été identifié précédemment mais pas de manière significative [Lambert *et al.* 2009]. Enfin, en 2011, 2 analyses ont identifié 4 gènes supplémentaires : *CD2AP*, *MS4A6A/MS4A4E*, *EPHA1* et *ABCA7* [Hollingworth *et al.* 2011 ; Naj *et al.* 2011]. De nombreuses répliques ont été effectuées et à partir de toutes les données réunies, un tableau des gènes les plus associés à la MA a été établi (Tableau 5). L'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE* a bien évidemment été retrouvé dans ces analyses [Carrasquillo *et al.* 2009 ; Reiman *et al.* 2007 ; Harold *et al.* 2009 ; Lambert *et al.* 2009].

Tableau 5 : Classement des gènes contenant les polymorphismes les plus fortement associés à la MA (AlzGene).

	Gène	Protéine	Valeur p
1	<i>APOE ε2/3/4</i>	Apolipoprotéine E	<1 x10 ⁻⁵⁰
2	<i>BIN1</i>	Bridging integrator 1	1,58 x10 ⁻²⁶
3	<i>CLU</i>	Clusterine	3,37 x10 ⁻²³
4	<i>ABCA7</i>	ATP-Binding Cassette, sub-family A, member 7	8,17 x10 ⁻²²
5	<i>CR1</i>	Complement component (3b/4b) Receptor 1	4,72 x10 ⁻²¹
6	<i>PICALM</i>	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	2,85 x10 ⁻²⁰
7	<i>MS4A6A</i>	Membrane-Spanning 4 domain, subfamily A, member 6A	1,81 x10 ⁻¹¹
8	<i>CD33</i>	Cluster of Differentiation 33	2,04 x10 ⁻¹⁰
9	<i>MS4A4E</i>	Membrane-Spanning 4-domain, subfamily A, member 4E	9,51 x10 ⁻¹⁰
10	<i>CD2AP</i>	CD2-Associated Protein	2,75 x10 ⁻⁰⁹

Nous nous sommes alors intéressés au gène dont le polymorphisme était le plus fortement associé avec la MA après l'allèle ε4 du gène *APOE* : *BIN1* (Bridging Integrator 1). En effet, un polymorphisme situé en amont du gène *BIN1* a été retrouvé comme étant associé avec la MA avec un OR de 1,166 [Harold *et al.* 2009 ; Lambert *et al.* 2009 ; Seshadri *et al.* 2010].

6.2 BIN1

6.2.1 BIN1, une protéine proche de l'amphiphysine I

La protéine BIN1 est un membre de la famille des adaptateurs BAR, (Bin Amphiphysin Rys) proche de l'amphiphysine I. Les protéines appartenant à cette famille sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que l'organisation du cytosquelette, l'endocytose, le trafic vésiculaire, la polarité ou encore la régulation transcriptionnelle. Le domaine BAR correspond à une structure en hélice α de 250 à 280 acides aminés [Sivadon *et al.* 1995] et est capable de se dimériser pour former une structure arquée qui peut se fixer aux membranes courbées (Figure 22) ([Peter *et al.* 2004 ; Casal *et al.* 2006], d'où son implication dans l'endocytose. En plus d'un domaine BAR en N-terminal, BIN1 possède dans sa partie C-terminale un domaine SH3 (Src Homology 3), également retrouvé dans l'amphiphysine 1, qui est impliqué dans l'interaction entre les protéines [Ren *et al.* 2006]. BIN1 a donc une structure très proche de l'amphiphysine 1, ce qui suggère

des effets communs. Cependant, il existe plusieurs isoformes de BIN1 qui possèdent des effets différents.

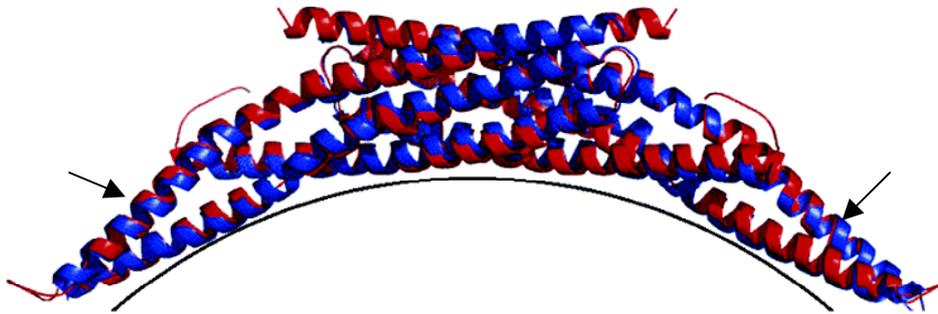


Figure 22 : Assemblage de deux domaines BAR de BIN1 (désignés par les flèches) aboutissant à la formation d'une structure arquée [Casal *et al.* 2006].

6.2.2 Le gène *BIN1* et ses nombreuses isoformes

Le gène *BIN1* est localisé sur le chromosome 2 en position q14 et mesure 54kb chez l'homme. Il contient 20 exons et son épissage peut générer de nombreux variants. En effet, rien que dans le cerveau, 10 variants ont pu être détecté par PCR [Tsutsui *et al.* 1997]. Cependant, les formes majeures résultent de l'épissage des exons 7, 11, 13, 14, 15, 16 et 17. L'exon 7 code pour un insert de 31 résidus spécifique au cerveau appelé NTID (N-terminal insert domain) qui est situé dans le domaine BAR [Ramjaun *et al.* 1999]. L'exon 11 est spécifique au muscle et code pour 15 résidus comprenant une séquence de localisation nucléaire et une séquence de fixation aux lipides [Lee *et al.* 2002 ; Sakamuro *et al.* 1996]. Les exons 13, 14, 15 et 16 codent de nombreux domaines spécifiques au cerveau, ce qui inclut un insert appelé domaine central qui interagit avec la clathrine et/ou l'AP-2/ α -adaptine, d'où son nom de domaine CLAP et/ou l'endophiline A1 [Ren *et al.* 2006]. Ce domaine central de BIN1 possède également des motifs riches en proline qui peuvent fixer des domaines SH3 [Leprince *et al.* 1997]. L'exon 17 code quant à lui pour un domaine pouvant se fixer à Myc (MBD pour « Myc Binding Domain »). Ces différents épissages sont représentés dans la Figure 23.

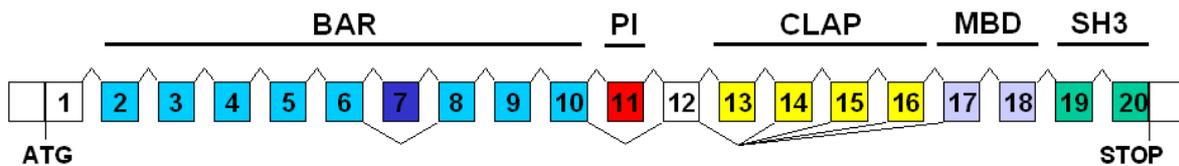


Figure 23 : Représentation des exons composant le gène *BIN1* et des épissages principaux que le gène peut subir. PI : phosphoinositide-binding domain.

La distribution tissulaire de BIN1 est différente selon les isoformes. Comme décrit précédemment, l'exon 7 et les exons composant le domaine CLAP ne sont présents que dans les transcrits retrouvés dans le cerveau alors que l'exon 11 correspond à l'isoforme retrouvée dans le muscle squelettique [Butler *et al.* 1997]. Chez l'homme, les transcrits ne contenant pas le domaine CLAP sont présents dans le cerveau, le cœur, le placenta, les poumons, le foie, les reins, le pancréas, la rate, les ovaires, les testicules et le muscle squelettique [Butler *et al.* 1997 ; Kadlec *et al.* 1997]. La forme la plus ubiquitaire de BIN1 ne contenant pas les exons 7, 11, 13, 14, 15, 16 et 17 est appelée ALP1. Parmi ces nombreuses isoformes, nous allons nous intéresser aux formes neuronales.

6.2.3 Les isoformes neuronales de BIN1

Il existe différentes isoformes neuronales de BIN1. Elles contiennent donc le domaine BAR, le domaine SH3 et le domaine CLAP et diffèrent les unes des autres par la présence ou non de l'exon 7 et par le nombre d'exons codant pour le domaine CLAP (Figure 24). Ces isoformes sont également appelées amphiphysine 2 et sont retrouvées comme fortement concentrées au niveau des terminaisons nerveuses [Chen *et al.* 2003].



Figure 24 : Les différentes isoformes neuronales de BIN1.

6.2.3.1 Localisation cellulaire des isoformes neuronales de BIN1

Des études ont montré que les isoformes neuronales de BIN1 ne possédant pas l'exon 7 étaient localisées au niveau des terminaisons nerveuses à la surface des vésicules synaptiques et à la membrane plasmique de neurones localisés dans le cervelet et l'hippocampe [Wigge *et al.* 1997]. D'autres analyses ont mis en évidence que ces isoformes étaient localisées au niveau des segments initiaux des axones et des nœuds de Ranvier, qui sont des zones de l'axone non myélinisées [Butler *et al.* 1997]. Les isoformes neuronales possédant l'insert NTID codé par l'exon 7 ont quant à elles été retrouvées comme localisées à la membrane plasmique de manière ponctuelle. Il a en effet été observé que ces isoformes co-localisaient avec les puits de clathrine, suggérant un rôle de BIN1 dans l'endocytose [Ramjaun *et al.* 1999].

6.2.3.2 Implication des amphiphysines 1 et 2 dans l'endocytose

Il a été observé que l'amphiphysine 1 interagissait avec la clathrine et l'AP-2/ α -adaptine, d'où son rôle dans l'endocytose, or certaines isoformes de BIN1 possèdent un domaine central très proche de celui de l'amphiphysine 1 et pourraient donc également être impliqués dans ce mécanisme. Des études ont montré que l'amphiphysine 1 et 2 pouvaient former des hétérodimères. De plus, l'amphiphysine 2 possède un domaine SH3 très proche de celui de l'amphiphysine 1 qui peut donc lui aussi interagir avec la dynamine I. Ainsi, il a été suggéré que les hétérodimères pourraient entraîner un recrutement de nombreuses molécules de dynamine dans les sites d'endocytose rapide au niveau des terminaisons nerveuses. Comme décrit précédemment, des études ont d'ailleurs montré que l'amphiphysine 2 co-localisait avec les puits recouverts de clathrine [Ramjaun *et al.* 1999]. Ce recrutement de la dynamine favoriserait la préparation de l'étape de bourgeonnement, qui est une étape importante de l'endocytose [Wigge *et al.* 1998] (Figure 25). D'autres études ont montré que le domaine SH3 de l'amphiphysine 1 et 2 pourrait favoriser le désassemblage de l'anneau de dynamine [Chesneau *et al.* 2004].

Les amphiphysines 1 et 2 peuvent également interagir avec d'autres protéines impliquées dans l'endocytose médiée par la clathrine, tels que le complexe adaptateur de la membrane plasmique AP-2, qui va servir au recrutement de la clathrine et des autres molécules impliquées dans l'endocytose [Chu *et al.* 1996] et la

synaptojanine, une protéine impliquée elle aussi dans l'endocytose et située au niveau des synapses [Slepnev *et al.* 1998 ; Wigge *et al.* 1997]. Enfin, le domaine CLAP de l'amphiphysine 2 peut également se fixer sur l'endophiline A1, une protéine possédant également un domaine BAR, située au niveau des synapses et impliquée elle aussi dans l'endocytose médiée par la clathrine [Micheva *et al.* 1997].

La clathrine pourrait également interagir directement avec l'amphiphysine 2 [Colwill *et al.* 1999] et cette interaction serait médiée par deux séquences conservées dans la région centrale de l'amphiphysine 2, au niveau du domaine CLAP [Corral-Debrinski *et al.* 1999]. Bien que l'interaction de l'amphiphysine avec la dynamine et la clathrine fait intervenir des régions différentes de la protéine, ces interactions seraient exclusives l'une de l'autre [Colwill *et al.* 1999]. BIN1 serait donc, tout comme l'amphiphysine 1, au centre des interactions entre protéines impliquées dans le bourgeonnement des vésicules recouvertes de clathrine et aurait un rôle essentiel dans l'endocytose au niveau des terminaisons nerveuses.

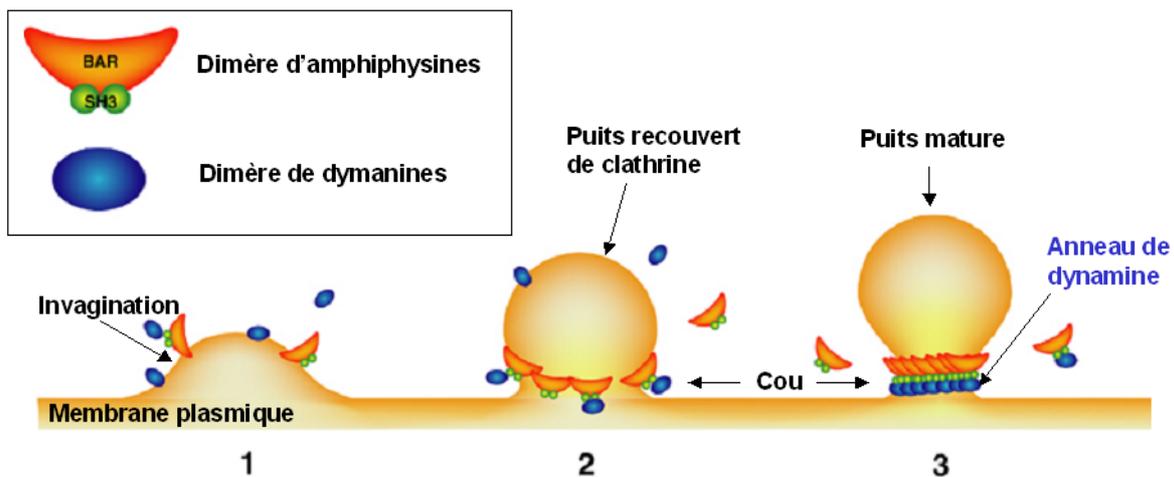


Figure 25 : Fonction possible des amphiphysines dans le bourgeonnement des vésicules recouvertes de clathrine [Yoshida *et al.* 2004]. (1) Les amphiphysines sont recrutées au niveau de la membrane invaginée de par leur interaction avec la clathrine ou AP-2. (2) Le domaine BAR des amphiphysines aiderait à la formation d'un « cou » aux bonnes dimensions entre le puits et la membrane. (3) D'autres dimères d'amphiphysines sont recrutées dans le puits mature et l'anneau de dynamine se forme grâce à son interaction avec les amphiphysines. La clathrine et AP-2 ne sont pas représentés sur ce schéma.

6.2.3.3 Fonction de BIN1 dans le transport des endosomes

Des études ont montré que l'isoforme neuronale de BIN1 à laquelle il manque l'exon 7 dans le domaine BAR pouvait également se fixer à SNX4 (Sorting Nexin 4), une protéine localisée dans les compartiments intracellulaires [Leprince *et al.* 2003]. Il a été observé que l'isoforme neuronale de BIN1 co-localisait avec des compartiments contenant SNX4 correspondant à des endosomes précoces. BIN1, en plus de son rôle dans l'internalisation, pourrait donc également être impliqué dans le trafic cellulaire via les endosomes.

6.2.3.4 Fonction de BIN1 dans l'organisation du cytosquelette

Les isoformes neuronales de BIN1 ne possédant pas l'exon 7 dans le domaine BAR auraient également un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine. En effet, BIN1 a été localisée au niveau membranaire des segments initiaux des axones et des nœuds de Ranvier, or ces zones présentent une matrice sous membranaire très dense, contenant majoritairement de l'actine et de l'ankyrine [Butler *et al.* 1997]. BIN1 pourrait donc avoir un rôle dans la formation ou le maintien de ces structures particulières. En accord avec cette hypothèse, il a été observé que l'amphiphysine de *drosophilae melanogaster* était localisée au niveau de la membrane dans des domaines riches en actine dans de nombreux types cellulaires polarisés, tels que les neurones photorécepteurs [Zelhof *et al.* 2001]. De plus le domaine SH3 de la protéine pourrait interagir avec l'actine [Fernando *et al.* 2009].

6.2.3.5 Fonction de BIN1 dans la transduction du signal

De par son domaine SH3, BIN1 pourrait interagir avec les oncoprotéines c-Myc [Sakamuro *et al.* 1996] et c-Abl [Kadlec *et al.* 1997], qui sont impliquées dans la transduction du signal. Il a également été observé que BIN1 pouvait se fixer sur les facteurs Sos 1 (Son of sevenless) et Sos 2 qui peuvent activer les protéines Ras, suggérant également une implication de BIN1 dans la transduction du signal [Leprince *et al.* 1997]. En effet, il a été observé que le domaine SH3 de l'amphiphysine 2 pouvait se fixer sur un motif riche en proline de Sos 1.

Des études ont également montré que l'isoforme musculaire de BIN1 pouvait interagir avec la kinase Cdk5 de par son domaine SH3 et aurait ainsi un rôle dans l'assemblage des sarcomères [Fernando *et al.* 2009]. Etant donné que l'isoforme

neuronale de BIN1 possède également le domaine SH3, celle-ci pourrait également se fixer sur Cdk5. Or, comme il a été décrit dans le paragraphe 3.3.3.3, Cdk5 est une kinase impliquée dans l'hyperphosphorylation de Tau.

BIN1 possède donc de nombreuses fonctions du fait de son interaction avec un nombre important de protéines (Figure 26). Les isoformes neuronales présentent majoritairement une implication dans l'endocytose au niveau des synapses. Étant donné que l'endocytose est un mécanisme impliqué dans la physiopathologie de la MA, notamment au niveau de métabolisme de l'APP, nous avons supposé que BIN1 pouvait être impliquée dans ce processus. Cependant, les isoformes neuronales possèdent également d'autres fonctions, notamment au niveau de la transduction du signal ou dans l'organisation du cytosquelette des neurones, qui pourraient expliquer son impact dans la physiopathologie de la MA.

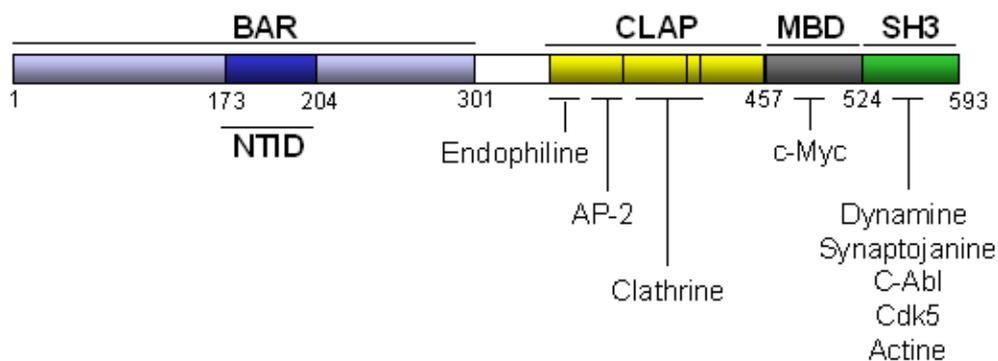


Figure 26 : Récapitulatif des protéines interagissant avec les différentes régions de l'isoforme neuronale de BIN1.

7) Objectifs de travail

7.1 Etude de l'impact d'IL-33 dans la physiopathologie de la MA

La première étape a été de répliquer l'association de polymorphismes situés sur le gène *IL-33* avec la MA, afin de vérifier s'il s'agit bien d'un déterminant génétique de la maladie. Ensuite, du fait que celui-ci soit différentiellement exprimé dans la maladie et qu'il semble moduler le métabolisme de l'APP par son activité de facteur de régulation transcriptionnelle, nous avons cherché à étudier les gènes régulés par IL-33 afin de comprendre son implication dans la physiopathologie de la MA.

Aucune donnée n'étant disponible quant aux gènes dont l'expression pourrait être modulée par ce facteur de régulation transcriptionnelle. Nous avons alors mis en place à nouveau des analyses à haut débit afin de pouvoir caractériser les gènes modulés par IL-33 et de mieux comprendre son implication dans la physiopathologie de la MA. Nous avons tout d'abord effectué des analyses transcriptomiques sur puces à ARN à partir de cellules sur-exprimant ou non IL-33, ainsi que des analyses de RNAseq (short-read high-throughput sequencing) [Sultan *et al.* 2008]. Enfin, afin d'identifier des zones potentielles de fixation d'IL-33 sur l'ADN, nous avons effectué des expérimentations de CHIP-on-chip (Chromatin ImmunoPrecipitation on Chip).

7.2 Etude de l'implication de BIN1 dans la physiopathologie de la MA

Nous avons tout d'abord cherché à déterminer si tout comme *IL-33*, *BIN1* était différentiellement exprimé dans le cerveau des patients atteints de la MA. Après cela, nous avons cherché à caractériser des variants génétiques pouvant expliquer la variation de son expression. L'objectif a donc été d'identifier des polymorphismes associés à la MA et influant sur l'expression de *BIN1*. Les GWAS ont identifié un tag-SNP associé à la MA au niveau du gène *BIN1* mais pour identifier des polymorphismes fonctionnels, nous avons densifié le nombre de polymorphismes à étudier par des techniques d'imputation et de séquençage. La fonctionnalité de ces polymorphismes a ensuite été étudiée *in vitro* par l'utilisation de vecteurs rapporteurs exprimant la luciférase. Enfin, nous avons cherché à identifier des facteurs pouvant se fixer au niveau de ces polymorphismes, influençant ainsi l'expression de *BIN1*.

Pour connaître l'impact de BIN1 sur la physiopathologie de la MA, nous avons cherché à étudier son implication dans métabolisme de l'APP mais également dans de la pathologie Tau. Pour cela, des analyses ont été effectuées dans des modèles

de drosophiles et différentes techniques de biologie moléculaire ont été mises en œuvre, telles que des Western Blot, des Elisa, des expérimentations d'immunofluorescence ou encore de co-immunoprécipitation.

RÉSULTATS

1) Etude de l'impact d'IL-33 dans la physiopathologie de la MA

1.1 Recherche de polymorphismes associés à la MA dans le gène *IL-33*

Etant donné que des polymorphismes ont été retrouvés comme étant associés à la MA dans le gène *IL-33* [Chapuis *et al.* 2009], nous avons cherché à répliquer ces résultats et à identifier d'autres polymorphismes associés à la MA au niveau de ce gène. Ainsi, l'association de 52 polymorphismes situés dans le gène *IL-33* avec la MA a été étudiée dans une méta-analyse composée de 4 consortiums : le consortium ADGC (Alzheimer Disease Genetics Consortium) qui comporte 15 populations de cas-témoins (<http://alois.med.upenn.edu/adgc/about/overview.html>), le consortium CHARGE (Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology) qui regroupe 7 populations [Psaty *et al.* 2009] (<http://web.chargeconsortium.com>), le consortium GERAD (Genetic and Environmental Risk in Alzheimer's Disease) [Harold *et al.* 2009] et le consortium EADI (European Alzheimer's Disease Initiative) [Lambert *et al.* 2009], ce qui représente au total 17008 cas et 37646 témoins. Ces 4 consortiums constituent le projet IGAP (International Genomics of Alzheimer's Project) qui est une collaboration ayant pour but de découvrir le plus grand nombre possible de gènes associés à la MA.

Les résultats concernant l'association des polymorphismes localisés dans la région du gène *IL-33* ont été visualisés à l'aide du logiciel Locuszoom (Figure 27). Aucun polymorphisme parmi ceux testés n'a été identifié comme étant associé à la MA (seuil de significativité : 10^{-8}). Ainsi, nous n'avons pas pu identifier de nouveaux polymorphismes associés à la MA et de plus, nous n'avons pu répliquer l'association de ceux initialement trouvés lors des études d'association effectuées précédemment au laboratoire [Chapuis *et al.* 2009]. Cependant, nous n'avons pas encore pu réaliser d'étude après stratification sur le génotype *APOE*. Or, l'association d'*IL-33* avec la MA n'était retrouvée que chez les individus non porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE* [Chapuis *et al.* 2009].

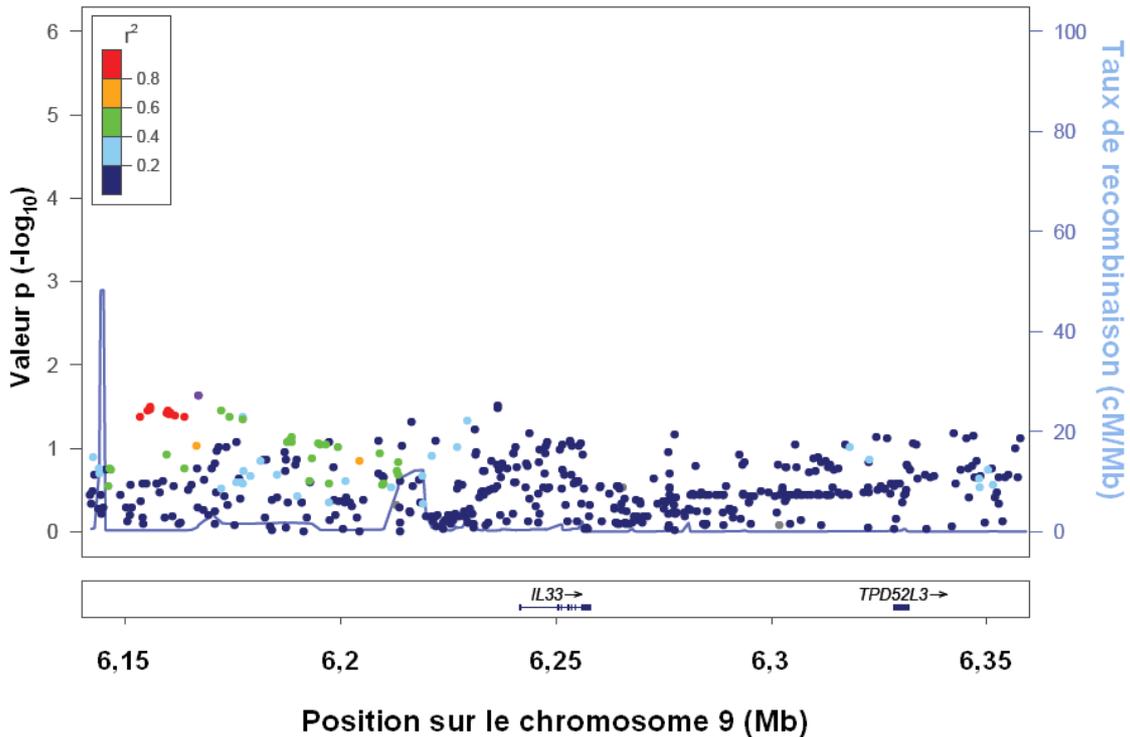


Figure 27 : Visualisation grâce au logiciel Locuszoom des polymorphismes testés dans la méta-analyse IGAP dans la région du gène *IL-33*.

1.2 Etude des gènes régulés par IL-33

Se référer à l'article : “Assessment of Interleukin 33 as an intracellular nuclear factor with potential transcriptional regulation properties”

1.2.1 Présentation du travail

Les analyses transcriptomiques effectuées au laboratoire ont identifié *IL-33* comme étant le gène le plus sous-exprimé chez les patients atteints de MA. De plus, une implication d'IL-33 dans le métabolisme de l'APP a été retrouvée, avec une diminution de la sécrétion d'A β ₁₋₄₀ suite à une sur-expression d'IL-33 dans des cellules de neuroblastomes sur-exprimant l'APP de manière stable (SKNSH-SY5Y-APP^{695wt}). Il a été observé qu'IL-33 agissait sur le métabolisme de l'APP de par son activité de facteur de régulation transcriptionnelle.

Etant donné que nous ne disposons d'aucune donnée quant aux gènes régulés par IL-33, nous avons cherché à identifier ces gènes par des approches à

haut débit. Ainsi, des analyses transcriptomiques sur puces à ARN ont été effectuées. Ce genre d'analyse pouvant générer des faux positifs, il nous a été nécessaire de valider ces résultats, ainsi nous avons effectué en parallèle une analyse de RNAseq, qui est également une analyse à haut débit qui consiste en un séquençage des ARNs. En recoupant les résultats de ces deux analyses, nous avons pu déterminer un pool de gènes modulés par IL-33. Cependant, les analyses transcriptomiques ne nous indiquent pas si IL-33 agit directement sur la régulation de ces gènes. Afin de vérifier si IL-33 pouvait se fixer directement sur les gènes d'intérêt, nous avons effectué des analyses de ChIP-on-chip qui ont consisté en une immunoprécipitation de l'ADN couplé aux protéines avec un anticorps reconnaissant spécifiquement IL-33 et à l'utilisation de puces à ADN contenant l'ensemble des séquences promotrices humaines.

En ce qui concerne les analyses transcriptomiques, nous avons comparé les ARNs de cellules sur-exprimant ou non IL-33. Nous n'avons pas utilisé les cellules SKNSH-SY5Y-APP^{695wt} qui sont difficilement transfectables mais des cellules épithéliales embryonnaires de rein humaines qui comme les cellules de neuroblastomes utilisées, sur-expriment l'APP⁶⁹⁵ sauvage de manière stable (HEK293-APP^{695wt}). Le même phénotype a été retrouvé dans ces cellules suite à une sur-expression d'IL-33, c'est à dire une diminution de la sécrétion d'A β ₁₋₄₀ et une expression de la protéine IL-33 dans le noyau. Ces cellules ont également été utilisées pour les analyses de ChIP-on-chip.

1.2.2 Résumé des résultats

a) Analyses transcriptomiques

Les analyses transcriptomiques sur puces à ARN ont révélé que 3034 gènes voyaient leur expression varier significativement ($p < 0,05$) 24 heures après la sur-expression d'IL-33. Parmi ces gènes, 1997 sont régulés positivement et 1037 sont régulés négativement. Concernant les analyses de RNAseq, 2538 gènes ont été retrouvés comme étant modulés 24 heures après la sur-expression d'IL-33, dont 1652 positivement et 886 négativement.

En recoupant les résultats des deux analyses, 598 gènes montrent une modulation de leur expression dans le même sens (Figure 28), dont 462, soit 77%, sur-exprimés et 136, soit 23%, sous-exprimés.

Ces gènes ont par la suite été analysés sur le logiciel IPA (Ingenuity Pathway Analysis), qui permet de faire ressortir les fonctions biologiques les plus représentées dans nos résultats. Les fonctions les plus modulées sont la transcription et l'expression de l'ARN (Figure 28). En effet, parmi ces gènes, 16% sont impliqués dans la transcription et l'expression de l'ARN et 11% dans la transcription et l'expression de l'ADN en sachant que les mêmes gènes peuvent être retrouvés dans chacune de ces fonctions. Nous retrouvons également un effet sur le cycle cellulaire. La majorité des gènes impliqués dans ces fonctions sont sur-exprimés. En ne regardant que les gènes sous-exprimés, nous retrouvons quelques gènes impliqués dans la réplication, la recombinaison et la réparation de l'ADN.

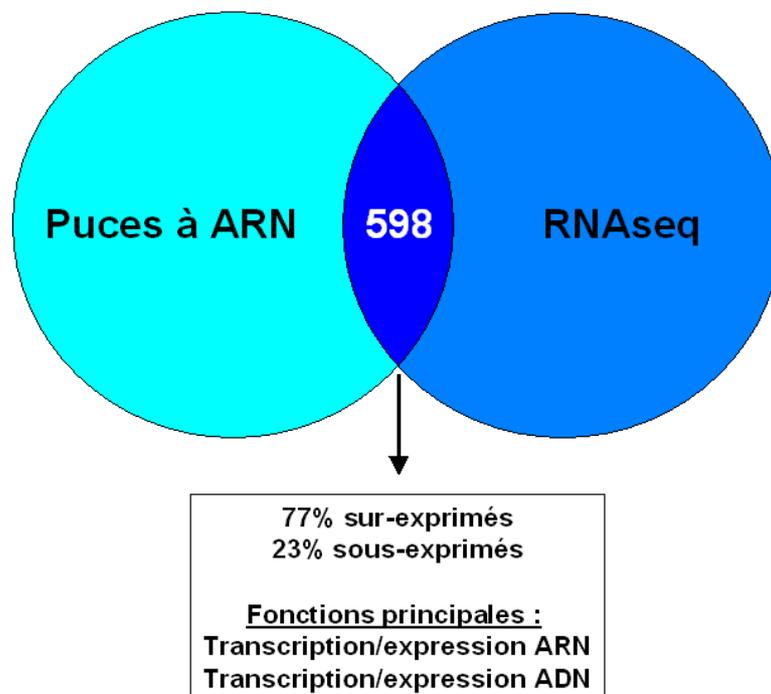


Figure 28 : Recoupement des résultats des analyses sur puces à ARN et de RNAseq et fonctions principales des gènes retrouvés dans les deux analyses.

b) Analyses de ChIP-on-chip

Les analyses de ChIP-on-chip ont révélé un nombre important de gènes possédant des séquences enrichies après une immunoprécipitation avec IL-33. Les 2031 gènes dans lesquels sont situées les séquences présentant un enrichissement supérieur ou égal à 4 ont également été analysés sur le logiciel IPA. Ici aussi, un effet sur la régulation de la transcription a été retrouvé mais également des effets sur la morphologie et le développement du cerveau, sur la cardiogénèse et la

différentiation cellulaire. En regardant les 10 fonctions de gènes retrouvées avec la meilleure significativité, seulement trois catégories de fonctions ont été retrouvées en commun avec celles retrouvées dans l'analyse IPA des résultats de transcriptomique : la transcription de l'ARN, de l'ADN et l'expression de l'ADN. Cependant, nous retrouvons également la fonction « expression de l'ARN » avec une significativité plus faible ($1,32 \times 10^{-4}$).

En recoupant les résultats avec ceux déjà recoupés lors des analyses transcriptomiques, 70 gènes en commun ont été retrouvés, ce chiffre étant plus important que le nombre de gènes en commun pouvant être retrouvés au hasard. Ainsi, IL-33 ne semble se fixer directement que sur 12% des gènes retrouvés comme étant modulés par IL-33 lors des analyses transcriptomiques. Parmi ces gènes, 17, soit 24%, sont impliqués dans la transcription de l'ARN, 18, soit 26%, dans l'expression de l'ARN et 14, soit 20% dans la transcription de l'ADN en sachant que les mêmes gènes peuvent être retrouvés dans chacune de ces fonctions. La majorité de ces gènes sont retrouvés comme étant sur-exprimés lors des analyses transcriptomiques (75%). Parmi ces gènes sur-exprimés, nous avons retrouvé 4 gènes codant pour des histones appartenant au cluster 1 : *HIST1H1C*, *HIST1H2BJ*, *HIST1H3D*, *HIST1H4H* (Figure 29).

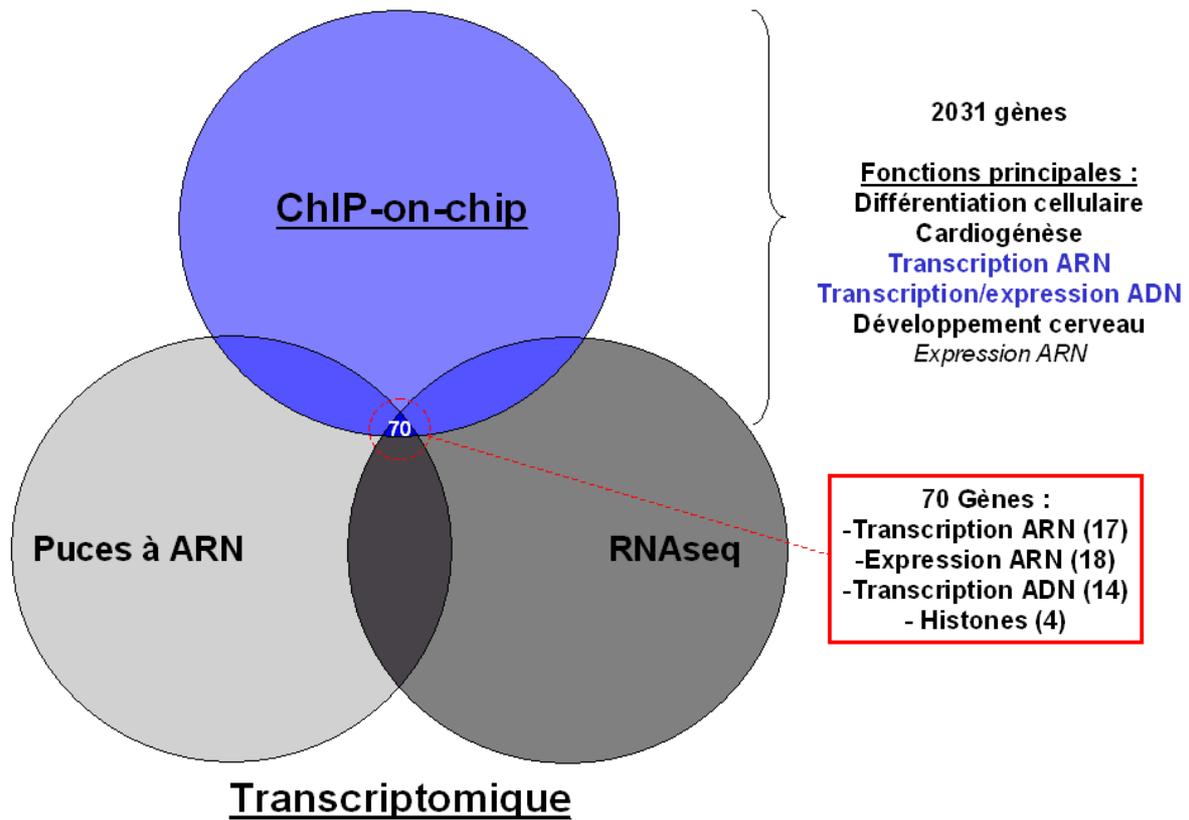


Figure 29 : Nombre de gènes et fonctions principales retrouvées lors des analyses de CHIP-on-chip ainsi qu’après le recoupement avec les analyses transcriptomiques.

c) Recherche de gènes impliqués dans le métabolisme de l’APP

Nous avons par la suite essayé d’identifier des gènes impliqués dans la physiopathologie de la MA et plus particulièrement dans le métabolisme de l’APP. Ainsi, les analyses sur puces à ARN et de RNAseq ont révélé que le gène *PSEN2*, codant pour la PS2 qui est un composant de la γ -sécrétase, était sur-exprimé de 40% suite à la sur-expression d’IL-33. Cet effet a été validé par des analyses de PCR quantitative. Ce gène n’a cependant pas été retrouvé lors des analyses de CHIP-on-chip, ce qui suggère que l’effet d’IL-33 sur l’expression du gène *PSEN2* serait indirect.

1.3 Discussion

La meta-analyse n’a pas permis de confirmer l’association de polymorphismes situés dans le gène *IL-33* avec la MA. Cependant, il reste encore à effectuer une stratification du statut *APOE*. En effet, l’impact majeur de l’allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE* sur la MA pourrait masquer les effets d’*IL-33*.

Toutefois, même s'il s'avère qu'IL-33 n'est pas un déterminant génétique de la maladie, son étude reste importante car il a été identifié comme étant différentiellement exprimé dans la MA. Le gène codant pour l'OTC, dont l'expression a également été identifiée comme étant modulée dans la MA lors des analyses transcriptomiques, n'a lui aussi pas été retrouvé comme étant un déterminant génétique de la maladie mais le fait que la protéine soit exprimée presque uniquement chez les malades a permis la mise en route de l'élaboration d'un test diagnostique. Concernant IL-33, son étude se révèle importante pour une meilleure caractérisation de la physiopathologie de la MA, notamment du fait de son impact sur le métabolisme de l'APP. La fonction d'interleukine d'IL-33 a bien été caractérisée mais peu de données étaient disponibles quant à sa fonction de facteur de régulation transcriptionnelle. Les analyses à haut débit se sont donc révélées être une stratégie appropriée afin de capturer le maximum d'informations concernant les gènes régulés par IL-33.

a) Apports et limites des analyses à haut débit

Les analyses transcriptomiques ont révélé un nombre très important de gènes modulés par IL-33. Cependant, seulement 20% des gènes retrouvés par les analyses sur puces à ARN sont retrouvés par les analyses de RNAseq et inversement, environ 24% des gènes retrouvés lors des analyses de RNAseq sont retrouvés par les analyses sur puces à ARN. Ces deux techniques semblent donc générer un nombre important de faux positifs. Les faux positifs observés dans les analyses sur puces à ARN peuvent être dus à des défauts durant l'amplification des ARNs ou durant leur marquage, malgré l'utilisation d'une technique de dye-swap, consistant à inverser les marquages pour un même échantillon afin d'éviter des biais techniques dus à des différences d'émission ou d'incorporation des deux fluorophores utilisés. Les faux positifs générés lors des analyses de RNAseq peuvent quant à eux être dus à un défaut d'amplification des ARNs ou à des erreurs de séquençage. Il est donc important de recouper les résultats issus des deux techniques utilisées pour la suite des analyses.

Nous pouvons également supposer la présence de faux négatifs dans chacune des expérimentations, ce qui expliquerait le fait que certains gènes soient retrouvés comme étant modulés dans certaines analyses et pas dans d'autres. En

effet, nous avons observé une variabilité de l'impact d'IL-33 sur l'expression des gènes d'une expérimentation à une autre. Cette variabilité peut en partie être expliquée par le fait que les cellules HEK293-APP^{695wt}, qui n'expriment pas IL-33 en condition normale, ont tendance à exprimer la protéine lorsqu'elles arrivent à confluence. Or, nous avons observé que s'il y avait une expression, même faible, d'IL-33 dans la condition Mock (cellules transfectées avec le vecteur d'expression vide), nous ne détectons parfois plus de variation de l'expression des gènes suite à la sur-expression d'IL-33. Une faible quantité d'IL-33 peut donc moduler l'expression des gènes. Malgré une vérification de la confluence des cellules au moment de l'extraction des ARNs et une mesure par PCR quantitative de l'expression d'IL-33 dans les deux conditions avant d'effectuer les analyses transcriptomiques, cette expression d'IL-33 par les cellules reste difficile à contrôler et peut donc expliquer la variabilité observée ainsi que la présence de faux-négatifs.

Parmi les gènes modulés par IL-33, nous retrouvons une plus grande proportion de gènes sur-exprimés que de gènes sous-exprimés, ce qui n'est pas en accord avec les observations selon lesquelles IL-33 agirait comme un répresseur de la transcription [Zhou *et al.* 2007].

Les analyses transcriptomiques ne nous ont pas révélé si IL-33 agissait directement sur la modulation de l'expression des gènes. Pour vérifier cela, nous avons réalisé des expérimentations de ChIP-on-chip qui ont permis d'identifier des sites de fixation potentiels d'IL-33 sur l'ADN. Ici aussi, nous avons retrouvé un nombre très important de gènes dont les séquences présentaient un enrichissement, ce qui laisse supposer la présence de faux positifs. Pour cette raison, nous avons sélectionné uniquement les gènes contenant des séquences avec un fort enrichissement pour la suite de nos analyses. Nous avons tout d'abord remarqué que les analyses sur IPA ne révélaient que 3 catégories de fonctions de gènes en commun avec les analyses sur IPA des résultats de transcriptomique. Nous retrouvons en effet seulement 70 gènes en commun avec ceux retrouvés lors des analyses transcriptomiques mais le nombre de gènes retrouvés n'est pas dû au hasard et nous retrouvons également une implication d'IL-33 dans la régulation de la transcription. IL-33 n'aurait donc pas une action directe sur la plupart des gènes dont il module l'expression. Parmi les gènes retrouvés dans les trois analyses, 4 codent pour des histones du cluster 1. Les histones ont un impact sur la compaction de

l'ADN et peuvent de cette manière moduler l'expression des gènes dans des régions chromosomiques précises [Williamson *et al.* 2012].

Les analyses à haut débit nous ont donc apporté plusieurs informations : (1) IL-33 régulerait un ensemble de gènes impliqués dans la transcription et il s'agirait majoritairement d'une régulation positive ; (2) l'effet d'IL-33 sur la régulation de ces gènes serait indirect pour la majorité d'entre eux ; (3) IL-33 pourrait moduler l'expression de certains gènes en ayant un impact sur la compaction de l'ADN. Cependant, nous avons également vu les limites de ces techniques de par la génération potentielle d'un nombre important de faux positifs, d'où l'importance d'avoir effectué différentes analyses.

b) Recherche de gènes impliqués dans le métabolisme de l'APP

La modulation de l'expression d'un nombre important de gènes par IL-33 peut entraîner des modifications cellulaires. A partir des résultats de transcriptomique, nous avons alors recherché des gènes impliqués dans le métabolisme de l'APP afin de mieux comprendre comment IL-33 pourrait entraîner une diminution de la sécrétion d'A β ₁₋₄₀. Nous avons alors identifié le gène *PSEN2*, qui code pour la PS2, un composant de la γ -sécrétase. Nous n'avons pas retrouvé d'autres gènes impliqués dans le métabolisme de l'APP modulés par IL-33 mais le fait que le gène *PSEN2* soit sur-exprimé peut suffire à expliquer la variation de la sécrétion d'A β ₁₋₄₀ observée suite à la sur-expression d'IL-33. La modulation de l'expression de *PSEN2* est faible par rapport à d'autres gènes trouvés dans nos analyses mais celle ci reste la même dans les deux analyses transcriptomiques effectuées et également lors de la validation par PCR quantitative (+40%), ce qui indique qu'il ne s'agit pas d'un faux positif. De plus, la variation de la sécrétion d'A β ₁₋₄₀ observée suite à la sur-expression d'IL-33 est également faible dans notre modèle cellulaire, ce qui est cohérent avec les résultats observés. Ces variations pourraient être plus fortes dans d'autres modèles cellulaires. Cependant, lors de nos analyses, nous avons utilisé les cellules HEK293-APP^{695wt} en premier lieu du fait que ce modèle cellulaire avait été bien caractérisé pour l'étude du métabolisme de l'APP et de plus, ces cellules sont facilement transfectables ce qui est important lors de l'élaboration d'analyses transcriptomiques. En effet, si un trop faible pourcentage de cellules est transfecté, cela risque de générer un nombre important de faux négatifs.

ARTICLE : “Assessment of Interleukin 33 as an intracellular nuclear factor with potential transcriptional regulation properties” En soumission

Assessment of interleukin-33 as an intracellular nuclear factor with potential transcriptional regulation properties

Anais Mounier^{1,2,3}, Benjamin Grenier-Boley^{1,2,3}, Renaud Blervaque^{2,3,4,5}, Ludovic Huot^{2,3,4,5},
Stéphanie Slupeck^{2,3,4,5}, Florie Demiautte^{1,2,3}, Yoann Sottejeau^{1,2,3}, Anne-Marie Ayrat^{1,2,3},
Yves Lemoine^{2,3,4,5}, Julien Chapuis^{1,2,3}, Philippe Amouyel^{1,2,3,6}, David Hot^{2,3,4,5}, Jean-Charles
Lambert^{1,2,3,*}

- 1 INSERM U744, Lille, France
- 2 Institut Pasteur de Lille, Lille, France
- 3 Université Lille-Nord de France, Lille, France
- 4 Lille Centre for Infection and Immunity, Lille, France.
- 5 Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 8204, Lille, France
- 6 Centre Hospitalier Régional Universitaire, Lille, France.

*** Address correspondence to:**

Jean-Charles Lambert
Unité INSERM 744, Institut Pasteur de Lille
BP 245, 1 rue du professeur Calmette
F-59019 Lille cedex
France
tel.: +33 (0)320 877391
fax: +33 (0)320 877894
e-mail: jean-charles.lambert@pasteur-lille.fr

ABSTRACT

Background :

Interleukin-33 (IL-33) is a dual-function protein that may act as both a pro-inflammatory cytokine and an intracellular nuclear factor with transcriptional regulation properties. It is thought to have a key role in several human diseases, including Alzheimer's disease. In the latter context, IL-33 appears to modulate A β peptide production via transcriptional regulation. However, little is known about the genes and pathways through which IL-33 regulates protein expression.

Methodology/Principal Findings:

We applied several systematic, high-throughput approaches (including microarray, RNA-seq and chromatin-immunoprecipitation-on-chip experiments) to a cell-based model (HEK293-APP^{695wt}) in which IL-33 was transitory overexpressed.

By cross-relating microarray and RNA-seq data, we identified a pool of 598 genes showing significant, differential expression in the same direction. Interleukin-33 over-expression appeared to modify a broad spectrum of biological processes. Chromatin-immunoprecipitation-on-chip experiments revealed that 70 differentially expressed genes exhibited potential IL-33 binding in their proximal promoters (significantly more than would be expected by chance; $p < 2.5 \times 10^{-3}$). Ingenuity Pathway Analyses indicated that IL-33 may regulate transcription by modulating levels of the transcriptional machinery in general.

With respect to Alzheimer's disease, we found that the expression of presenilin 2 (PSEN2, one of the main components of the γ -secretase complex responsible for A β production) varied as a function of IL-33 expression.

Conclusion:

By systematically applying several different high-throughput genomic methodologies, we characterized IL-33's potential role as a transcriptional regulation factor. We found that IL-33 over-expression was associated with a general modulation of expression of the transcriptional machinery in HEK293 cells. We suggest that IL-33's involvement in Alzheimer's disease may be due to the modulation of PSEN2 expression.

INTRODUCTION

Interleukin-33 (IL-33) is a dual-function protein that may act as both a pro-inflammatory cytokine and an intracellular nuclear factor with transcriptional regulation properties.

The protein's role as an extracellular cytokine is increasingly well characterised; IL-33 is thought to function as an alarmin [1] (in a similar way to high-mobility group protein 1) in many cell types, including T cells, mast cells and tissue-specific resident macrophages [2], [3], [4], [5]. In this context, IL-33 may be involved in the disease mechanism of many disorders, including asthma, obesity and atherosclerosis [6], [7], [8].

With regard to IL-33 role as a nuclear factor, it was observed that IL-33 hold a helix-turn-helix domain, able to binding DNA [9]. The cellular location of IL-33 was anyway predominantly found in the nucleus, especially in the endothelial cells [10]; [1]. *In vivo*, the full-length IL-33 protein is initially located in the nucleus and can bind dimeric histone (H2A-H2B) [11]. Finally, it was observed that IL-33 could interact with the transcription factor NF- κ B (Nuclear factor κ B) [12].

Its putative activity as a nuclear regulator is of particular interest in the context of Alzheimer's disease (AD). In cell-based models of AD, IL-33 over-expression leads to a specific decrease in secretion of A β_{1-40} peptides - major components of AD's hallmark amyloid plaques and cerebral amyloid angiopathy [13]. Since IL-33 expression is low in the AD brain (relative to healthy controls), this interleukin may protect against this degenerative condition. Importantly, the decrease in A β_{1-40} secretion appears to be a consequence of IL-33's transcriptional regulation properties rather than its inflammatory properties [13].

As a consequence, it appears of interest to define IL-33's respective contributions as a nuclear regulator and as a cytokine in a general context and in AD in particular. Hence, we developed high-throughput approaches for characterizing genes that are potentially up- or downregulated by IL-33. After IL-33 over-expression in HEK293-APP^{695wt} cells, we combined both microarray and RNA-seq techniques to define a pool of differentially expressed genes and then used chromatin immunoprecipitation and microarray (ChIP-on-chip) experiments to crosscheck this pool against a list of expressed genes showing IL-33 potential binding in their proximal promoters.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies

Nessy-I mouse antibody [1] was used to detect IL-33 expression and perform ChIP-on-chip experiments. The primary antibody used to assay holo-APP and APP-CTF was APPCter-C17, a well-characterized rabbit antibody raised against the last 17 amino acids of the human APP sequence [14], [15], [16], [17]. A monoclonal mouse antibody (Sigma-Aldrich) was used to detect β -actin.

Anti-rabbit (Biorad) and anti-mouse (GE Healthcare) secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase were respectively used to detect APPCter-C17 and β -actin. A biotinylated secondary antibody (Sigma-Aldrich) was used to detect nessy-I antibody. The biotin was recognized by streptavidin (Promega) coupled to alkaline phosphatase.

Plasmid constructions

Interleukin-33 cDNA was amplified by PCR using the human IL-33 cDNA as a template and the following oligonucleotides: a sense primer containing a *Nhe* I site (5'-gctagccaagatcacaagaataactga-3') and an antisense primer containing a *Bam*H I site (5'-ggatccagatgcagttatacagaggg-3'). The PCR fragment was then cloned into a pcDNA3.1(-) mammalian expression vector (Invitrogen) [13].

Cell culture and transfection

HEK293 cells stably expressing APP695wt (HEK293-APP^{695wt}) were obtained in collaboration with Dr Frédéric Checler (Nice, France). The cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12 (Invitrogen - Gibco - ref#21331) with 10% foetal calf serum, 2 mM L-glutamine and 50 U/ml penicillin/streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Transient transfection of a IL-33-pcDNA3.1 vector was performed using FugeneHD (Roche Diagnostics), according to the manufacturer's recommendations.

RNA extraction and analysis

Twenty-four hours after transfection of HEK293-APP^{695wt} cells with the pcDNA3.1 expression vector containing IL-33 cDNA (or not), RNA was extracted using the RNeasy Mini Plus Kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was then quantified by spectrophotometry at 260 nm. The DO₂₆₀/DO₂₈₀ ratio was calculated and only samples with a ratio between 1.8 and 2 were selected for further analysis. Lastly, RNA quality was assessed on a Bioanalyzer 2100 system with the RNA 6000 LabChip[®] kit (Agilent). A RNA integrity number (RIN) was also calculated; only samples with a RIN between 9 and 10 were selected for high-throughput analysis.

High-throughput expression analyses

For microarray experiments, RNAs extracted from cells were labelled with Cy-3 and Cy-5 dyes and amplified with the Quick Amp labelling kit (Agilent) according to the manufacturer's recommendations. After purification with an RNeasy Mini Kit (Qiagen), the cRNA yield and incorporation efficiency (specific activity) were determined using a NanoDrop® 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). For each sample, a total of 1 µg of cRNA was fragmented and hybridized to whole human genome oligo 4 x 44,000 microarrays (SurePrint® technology, Agilent Technologies; ref#G4426B) overnight at 65 °C. The slides were washed and treated with stabilizing and drying solution according to the manufacturer's instructions. The array was scanned on a InnoScan® 700 scanner (Innopsys) and further processed using Mapix 2.6.1 software.

For RNA-seq experiments, RNAs extracted from cells were prepared according to the TruSeq™ RNA Guide (Illumina). The first step was mRNA recovery with poly-T oligo-attached magnetic beads. Next, mRNAs were fragmented and copied into cDNA by reverse transcription and converted into double-strand DNA with DNA polymerase I and Rnase H. After adaptor ligation, the products were purified and amplified by PCR, in order to create a cDNA library. Sequencing was performed on a Hiseq2000 system (Illumina).

ChIP-on-chip analyses

Twenty-four hours after IL-33-pcDNA 3.1 transfection, HEK293-APP^{695wt} cells were cross-linked for 20 minutes at room temperature by the addition of 1% formaldehyde to the medium. After washing with cold phosphate-buffered saline (PBS), the cells were lysed in buffer containing 1% SDS, and 2% 0.5 M EDTA in 5% Tris-HCl (pH 8). The lysates were then sonicated in 1.5 ml microtubes in a Bioruptor® (Diagenode) set to 30s On (320W)/30s Off for 35 minutes, in order to obtain 500 bp DNA fragments. After a 10-minute centrifugation at 13,000 rpm, the sonication product supernatant was diluted in ChIP dilution buffer (0.01% SDS, 1% Triton X-100, 0.24% 0.5M EDTA, 1.67% 1M Tris-HCl, 3.34% 5M NaCl). After DNA blocking with agarose beads coupled to salmon sperm DNA (Millipore) and centrifugation, the supernatant was incubated overnight at 4°C with Nesy-I antibody (4 µg per sample) and immunoprecipitated. In parallel, a control experiment in the absence of anti-IL-33 antibody was performed. After incubation, the beads were added again of DNA for 1h and the supernatant was eliminated after centrifugation at 1000 rpm (4°C). After the beads had been washed in buffers with increasing salt concentrations, the DNA was released with elution buffer (1% SDS, 0.1M NaHCO₃). The crosslinks were broken by incubation with 6% 5 M NaCl and 10 µg of Rnase A (Interchim) for 4h at 65°C and then with 2% 0.5M EDTA, 4% 1M Tris-HCl, pH 8, and 16 µg of proteinase K (Qiagen) for 1h at 45°C. Lastly, DNA was

extracted with phenol/chloroform/isoamyl 25/24/1 (Fluka Biochemika) and precipitated with ethanol overnight. Immunoprecipitated and control DNAs were then amplified and labelled with Cy-3 and Cy-5 dyes, according to the instructions for the Mammalian ChIP-on-chip kit (Agilent). Lastly, labelled DNAs were hybridised on a 244K DNA promoter microarray (Agilent). The microarrays were digitized with an Agilent G2565CA Scanner and the scans were analysed with Agilent Scan control 6.2 software.

Western blotting

Interleukin-33, holo-APP, APP-CTF and actin were measured by protein blotting. Samples containing 20 µg of cellular proteins were diluted in NuPAGE® LDS (lithium dodecyl sulphate) denaturing buffer (Invitrogen®) with reducing agent (Invitrogen ref#NP0009). After a 10-minute incubation at 95°C, proteins were loaded on a Novex® 4-12% bis-tris gel (Invitrogen). Electrophoresis was performed in 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid sodium dodecyl sulphate running buffer (Invitrogen NuPAGE® ref#NP0002) for 45 minutes at 200 V. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare Amersham) in transfer buffer (Invitrogen NuPAGE®) containing 20% methanol for 50 min at 30 V, using the XCell II™ Blot Module (Invitrogen Novex® ref#E10002) according to the manufacturer's instructions. In order to check the transfer quality, proteins were reversibly stained with Ponceau red. The membranes were blocked for 30 minutes in TNT 1X solution (0.05% Tween 20 in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.8) containing 5% skimmed milk, incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibody (described below), washed and then incubated for 1h at room temperature with secondary antibody. Immunoreactive complexes were revealed using the ECL™ Western Blotting kit (GE Healthcare Amersham). Membranes were digitized using the Ettan Difference Gel Electrophoresis Imager (GE Healthcare).

Enzyme-linked immunosorbent assays

Aβ₁₋₄₀ and Aβ₁₋₄₂ peptide concentrations were measured in a sandwich ELISA with the Human Amyloid β (1–40) Assay Kit (IBL-Hamburg, Germany, ref#27713) and INNOTEST β-Amyloid (1–42) (Innogenetics, Belgium, ref#25685), according to the manufacturer's recommendations. The results were quantified at 450 nm on a Multiskan® MS spectrophotometer (Labsystems).

Immunofluorescence

The HEK293-APP^{695wt} cell line was cultured on poly-L-Lys-coated glass coverslips (Chamber Slide System 2 wells from Lab-Tek Nunc) for 24 h. Forty-eight hours after transfection with IL-33 cDNA, cells were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde and permeabilized with PBS containing 0.25% (v/v) Triton X-100. After washing, the cells were blocked for 2h at

room temperature in PBS with 5% bovine serum albumin (BSA). Next, the cells were incubated overnight at 4°C with nesy-I primary antibody in PBS containing 5% BSA and 0.25% Triton X-100. After washing, an orange-fluorescent secondary antibody diluted to 1/400 was used (Life Technologies™). Coverslips were mounted with Vectashield® with DAPI (Vector Laboratories, ref#H-1200). The slides were read with an Axio Imager Z1 (Zeiss) at the Pasteur Institute of Lille's microscopy core facility.

RT-qPCR

cDNA was prepared from 0.5 µg of total RNA (extracted 24h after transfection of HEK293-APP^{695wt} cells with IL-33-pcDNA3.1 vector) using the SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit (Life Technologies). These experiments were performed independently of the high-throughput analyses. Polymerase chain reactions were carried out in triplicate in 96-well plates using the Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent, ref#600548) and the Mx3000P QPCR System (Agilent), according to the manufacturer's instructions. The primers' specificity and efficiency were validated before use. Quantifications were performed with *YWHAQ* as a house-keeping gene. The following forward and reverse primer sequences were used: 5'-AGACCTCTCTGCGGCCCAA-3' and 5'-GTGGGGCTCTCAGCCGACATT-3' for human *PSEN2* and 5'-TGCACGCTGGCTAAAACGGC-3' and 5'-CTTCTCCTGCACTGTCTGATGTCC-3' for human *YWHAQ*, respectively.

Statistical analyses

For ELISA analyses, values obtained with cells over-expressing IL-33 were normalized against the values obtained with cells transfected with an empty pcDNA3.1 vector. Results were compared by applying a non-parametric Wilcoxon test. Statistical analyses were performed using SAS software (SAS Institute Inc.).

For microarray analyses, the resulting text files were converted into R language files for analysis with the Linear Model for Microarray Data (LIMMA) software package [18]. Within-array normalization was performed by using locally weighted scatterplot smoothing to correct for dye and spatial effects [19]. A moderated *t*-statistic with empirical Bayes shrinkage of the standard errors [20] was then used to determine significantly upregulated or downregulated genes. A false-discovery rate approach was used to correct for multiple testing.

For RNA-seq analyses, the first step consisted of pre-processing and read quality assessment. The raw reads from each experiment (two conditions with two replicates) were first quality-assessed with the FASTX toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html, version 0.0.13.2) coupled to the Fast QC tool (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, version 0.10.1). Bad-quality reads were removed (with the FASTX toolkit's FASTQ Quality filter tool) by using a Phred

score cut-off of 20 on at least 75% of the read bases. On average, about 2% of an experiment's reads were removed prior to further analyses. In general, we followed the protocol described here [21]. This protocol uses TopHat [22] (<http://tophat.cbcb.umd.edu/>, version 2.0.4) to perform read alignments on the genome and Cufflinks [23] (<http://cufflinks.cbcb.umd.edu/>, version 2.0.1) to assemble transcripts, estimate their abundance and test for differential expression.

For transcript alignment, a Bowtie2 index of the *H. sapiens* hg19 assembly was downloaded from the Bowtie2 website (ftp://ftp.cbcb.umd.edu/pub/data/bowtie2_indexes/incl/hg19.zip) and used as the reference genome. Furthermore, a set of gene model annotations (containing exon positions of known genes) was downloaded as a GTF file from the UCSC Table Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables>, ref. Flat table, hg19 assembly).

Reads from each experiment were then mapped to the reference genome (without searching for novel junctions) using TopHat's very sensitive preset options.

We used Cufflinks to identify gene expression differences between IL-33 and mock conditions. Mapped reads from the two replicates of each condition were provided as input, together with the gene model annotations used in the previous step. This software estimates gene expression levels in fragments per kilobase of transcript per million mapped reads (FPKM) for each condition and then tests for inter-condition differences in the summed FPKM of transcripts for each gene. A fold-change between IL-33 and mock conditions was then reported along with the Q-value (an FDR-adjusted p-value of the test statistic after Benjamini Hochberg correction for multiple testing). We considered a gene to be differentially expressed if the Q-value was below 0.05. Cufflinks results were also visualized and plots were generated using the R package cummeRbund (<http://compbio.mit.edu/cummeRbund/>, version 1.2.0).

For ChIP-on-chip analyses, data were analysed with Genomics Workbench software (Agilent ref#G3797AA). Blank subtraction normalization was performed with this software; this corresponded to subtraction of the median signal for negative control spots from all signals on the array and dye-bias (intra-array) median normalization for equalizing central tendencies of IP and input channels. Events were detected with a Whitehead per-array neighbourhood model and a maximum distance of 500 bp.

RESULTS

Gene expression levels were assessed in total RNA from HEK cells over-expressing IL-33 (or not) in four independent experiments. After correction for multiple testing, analysis of the four experiments as a whole indicated that 3,034 genes were differentially expressed (1,997 up-regulated and 1,037 downregulated genes).

Despite the use of correction for multiple testing, we expected a large proportion of these genes to be false positives. In order to take account of this potential bias, we applied a second high-throughput approach: RNA-seq technology. In an experiment performed independently of the microarray analyses, mRNA extracted from either HEK293-APP^{695wt} cells over-expressing IL-33 (or not) was analysed on a HiSeq2000 system. Each extract was sequenced twice and the TopHat package was used to analyse the RNA-seq results. We identified 2,538 differentially expressed genes (1,652 upregulated and 886 downregulated).

RNA-seq data were then compared with microarrays data and a pool of 598 genes showed significant differential expression in the same direction in both experiments (with 462 upregulated and 136 downregulated genes). Ingenuity Pathway Analysis (IPA) was then used to investigate functional networks. This analysis revealed a broad spectrum of biological processes for IL-33 over-expression. Altered functions were predominantly transcription and expression of RNA (Table 1).

However, raw expression analyses is not capable of determining whether differential expression is directly due to IL-33's transcriptional regulation properties or indirectly due to IL-33's cytokine properties or upstream changes in expression. In order to evaluate the first possibility, we devised a ChIP-on-chip experiment for comparing promoter sequence enrichments after specific IL-33 immunoprecipitation in HEK293-APP^{695wt} cells. We found that 2,031 genes with proximal promoters likely to bind IL-33 showed significant sequence enrichment ($\log(\text{ratio}) > 2$). We again used IPA to investigate the functional networks. This analysis revealed the involvement of a broad spectrum of biological processes, including not only cardiogenesis and cell differentiation but also three of the categories highlighted in the IPA of the transcriptomic data (Table 1).

Lastly, we crosschecked the results generated in the transcriptomic and ChIP-on-chip experiments and found 70 differentially expressed genes exhibiting potential IL-33 binding in their proximal promoters (Table 2). This number was larger than expected by chance ($p < 2.5 \times 10^{-3}$; Figure 1). Remarkably, the number of genes in the three IPA pathways identified in both transcriptomic and ChIP-on chip experiments (transcription of RNA, transcription of DNA, expression of DNA) was also significantly higher than expected by chance ($p < 1.10^{-6}$; Figure 1). Among these 70 genes, IPA analyses also found the gene functions “transcription of RNA” and “transcription of DNA” but not “expression of DNA”. There is also the function

“expression of RNA”, which is found in the IPA analyses of transcriptomic results in the 10 more significant functions but not in the 10 more significant functions of ChIP-on-chip results IPA analyses. Overall, these observations suggest that IL-33 exerts transcriptional regulation properties by modulating the transcriptional machinery in general. It is noteworthy that four histone genes (HIST1H1C, HIST1H2BJ, HIST1H3D and HIST1H4H) were differentially expressed after IL-33 over-expression and exhibited a potential IL-33 binding site in their proximal promoter (Table 2).

With respect to the specific question of Alzheimer’s disease, we first checked that over-expression of IL-33 in HEK293-APP^{695wt} cells was also associated with the specific decrease in A β 40 secretion reported for other cell-based models [13] (Figure 2). This finding prompted us to search for genes potentially involved in APP metabolism from among the set of 598 identified in both the microarray and RNA-seq experiments. We notably found the gene for presenilin 2 (PS2), the over-expression of which was also confirmed in RT-qPCR experiments (Figure 2).

DISCUSSION

Little is known about the potential functions of IL-33 (which presents a homeodomain-like helix-turn-helix motif) as a transcriptional regulation factor. On one hand, IL-33 uses a short motif for docking into the acidic pocket formed by the H2A–H2B dimer at the nucleosome surface [11]. This suggests that docking of IL-33 into the acidic pocket of H2A–H2B might modulate chromatin structure [24]. On the other hand, IL-33 binds to the p65 promoter region and enhances NF- κ B promoter activity *in vitro*, which suggests that IL-33 can also act as a transcription factor [12]. In conclusion, IL-33 may be involved in complex gene regulation pathways via both nuclear targeting and chromatin binding.

Given this background, we used several high-throughput genomics technologies (microarrays, RNA-seq and ChIP-on-chip) to develop a systematic approach for characterizing IL-33's potential role as transcriptional regulation factor. It is important to note that our experiments were specifically designed to reduce the number of false positives and so it is possible that we missed some pathways of interest. However, combining these complementary techniques enabled us to select a pool of 70 differentially expressed genes exhibiting potential IL-33 binding in their proximal promoters. Furthermore, IPA analyses indicated that IL-33 over-expression led to the differential expression of genes that were predominantly involved in RNA transcription and expression. It is noteworthy that four histone genes (HIST1H1C, HIST1H2BJ, HIST1H3D and HIST1H4H) were differentially expressed and exhibited a potential IL-33 binding site in their proximal promoter. A validation of the IL-33 effect on the expression of these genes and of the binding of IL-33 in their proximal promoters is in progress for some of the 70 genes by EMSA and luciferase assays experiments.

Taken as a whole, these data suggest that IL-33's transcriptional regulation factor modulates gene expression in a complex way and probably induces major changes in the cell. This is in line with the hypothesis whereby IL-33 is one of the key nuclear factors that controls (for example) the specialized high endothelial venule phenotype.

Furthermore, we sought to understand how IL-33 might specifically control A β 40 secretion as observed in three different cell-based models (this study and [13]). Since this effect was shown to be independent of IL-33's cytokine properties, we postulated that the decrease in A β 40 secretion was related to IL-33's ability to regulate transcription. This is an important question, since IL-33 might modify the AD process by modulating vascular lesion formation. Indeed, one can hypothesize that low IL-33 expression favours A β 40 secretion and thus the accumulation of A β 40 in cerebral amyloid angiopathy [25]. Even though our IPA did not detect any specific pathways associated with processes already characterised in AD, the microarray and RNA-seq data showed that the presenilin 2 gene (PS2) was differentially

expressed. It is important to note that differential PS2 expression after IL-33 over-expression was confirmed in independent RT-qPCR experiments. Presenilin 2 is one of the components of the γ -secretase complex, which has a major role in A β peptide production [26]. Non-synonymous mutations in this gene are responsible for monogenic forms of AD; changes in γ -secretase modify the production of A β peptides in general and the A β 40/A β 42 ratio in particular [27]. Even though little is known about the transcriptional regulation of PS2 [28], we can legitimately postulate that variations in PS2 expression may have a specific impact on A β 40 secretion; this would explain (at least in part) the phenotype observed in our various cell lines after IL-33 over-expression (i.e. a decrease in A β 40 secretion).

In conclusion, we showed that IL-33 over-expression in HEK293 cells modulated the expression of the latter's transcriptional machinery.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

Project management and design: J-C.L. **Cell biology experiments:** A.M., Y.S., A.M.A., J.C. **Microarray experiments:** A.M., R.B., D.H. **ChIP-on-chip experiments:** A.M., L.H. S.S., D.H.: **Data analysis:** J-C.L., G.G.B., A.M., R.B., L.H., D.H. **Writing group:** J-C.L., P.A., Y.L., D.H.

AKNWOLEDGEMENTS

This work was supported by ANR MPN-2008, the Institut Pasteur de Lille, Inserm, FRC (fondation pour la recherche sur le cerveau) and Rotary. This work has been developed and supported by the LABEX (laboratory of excellence program investment for the future) DISTALZ grant (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease). A.M. received funding from the INSERM and the Nord-Pas de Calais Regional Council. J.C. was funded by the MEDIALZ Project (Grant 11001003) financed by ERDF (European Regional Development Fund) and Conseil Régional Nord Pas de Calais. F.L. received funding from the university of Lille II and the Nord-Pas de Calais Regional Council.

Financial disclosure

None of authors have any actual or potential conflicts of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Moussion C, Ortega N, Girard JP (2008) The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? PLoS One 3: e3331.
2. Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B *et al.* (2008) IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. J Immunol 181: 4780-90.
3. Iikura M, Suto H, Kajiwara N, Oboki K, Ohno T *et al.* (2007) IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. Lab Invest 87: 971-8.
4. Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ *et al.* (2009) IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. J Immunol 183: 6469-77.
5. Espinassous Q, Garcia-de-Paco E, Garcia-Verdugo I, Synguelakis M, von Aulock S *et al.* (2009) IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. J Immunol 183: 1446-55.
6. Prefontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, Audusseau S, Olivenstein R *et al.* (2009) Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. J Immunol 183: 5094-103.
7. Zeyda M, Wernly B, Demyanets S, Kaun C, Hammerle M *et al.* (2012) Severe obesity increases adipose tissue expression of interleukin-33 and its receptor ST2, both predominantly detectable in endothelial cells of human adipose tissue. Int J Obes (Lond) 10.
8. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y *et al.* (2008) IL-33 reduces the development of atherosclerosis. J Exp Med 205: 339-46.
9. Baekkevold ES, Roussigne M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL *et al.* (2003) Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. Am J Pathol 163: 69-79.
10. Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L *et al.* (2007) IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 104: 282-7.
11. Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard JP (2008) Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. EMBO Rep 9: 1006-12.
12. Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R *et al.* (2011) The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-kappaB to dampen NF-kappaB-stimulated gene transcription. J Immunol 187: 1609-16.
13. Chapuis J, Hot D, Hansmannel F, Kerdraon O, Ferreira S *et al.* (2009) Transcriptomic and genetic studies identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer's disease. Mol Psychiatry 14: 1004-16.

14. Sergeant N, David JP, Champain D, Ghestem A, Watzet A *et al.* (2002) Progressive decrease of amyloid precursor protein carboxy terminal fragments (APP-CTFs), associated with tau pathology stages, in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 81: 663-72.
15. Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O *et al.* (2004) Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated Abeta42 accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* 165: 1289-300.
16. Santiard-Baron D, Langui D, Delehedde M, Delatour B, Schombert B *et al.* (2005) Expression of human FE65 in amyloid precursor protein transgenic mice is associated with a reduction in beta-amyloid load. *J Neurochem* 93: 330-8.
17. Vingtdoux V, Hamdane M, Gompel M, Begard S, Drobecq H *et al.* (2005) Phosphorylation of amyloid precursor carboxy-terminal fragments enhances their processing by a gamma-secretase-dependent mechanism. *Neurobiol Dis* 20: 625-37.
18. Smyth GK, Yang YH, Speed T (2003) Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods Mol Biol* 224:111-36.: 111-36.
19. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V *et al.* (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 30: e15.
20. Lonnstedt I, Britton T (2005) Hierarchical Bayes models for cDNA microarray gene expression. *Biostatistics* 6: 279-91.
21. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D *et al.* (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7: 562-78.
22. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL (2009) TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25: 1105-11.
23. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G *et al.* (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 28: 511-5.
24. Chodaparambil JV, Barbera AJ, Lu X, Kaye KM, Hansen JC *et al.* (2007) A charged and contoured surface on the nucleosome regulates chromatin compaction. *Nat Struct Mol Biol* 14: 1105-7.
25. Herzig MC, Winkler DT, Burgermeister P, Pfeifer M, Kohler E *et al.* (2004) Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci* 7: 954-60.
26. Wolfe MS (2002) APP, Notch, and presenilin: molecular pieces in the puzzle of Alzheimer's disease. *Int Immunopharmacol* 2: 1919-29.
27. Walker ES, Martinez M, Brunkan AL, Goate A (2005) Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in Abeta 42/40 ratios. *J Neurochem* 92: 294-301.
28. Marambaud P, Robakis NK (2005) Genetic and molecular aspects of Alzheimer's disease shed light on new mechanisms of transcriptional regulation. *Genes Brain Behav* 4: 134-46.

Figure 1. (a) Estimation of the probability to observe by chance, 70 genes in common when combining both chIP-on-Chip and Transcriptomics experiments. One million of permutations were performed using 598 genes (number of significant genes in Transcriptomic experiments) randomly selected from the whole set of genes (23,639 genes used as a reference in the transcriptomic experiments). Each drawing lots were compared with the chIP-on-chip significant gene list (2,031 genes). P-value was then computed as the percentage of permutations with more than 70 genes in common between the two types of experiment. **(b)** Estimation of the probability to observe by chance, 14 genes in common when combining both chIP-on-Chip and Transcriptomics experiments in the IPA “Transcription of RNA” pathway. One million of permutations were performed using 56 genes (number of significant genes observed in the transcriptomic experiments and found in the IPA pathway) randomly selected from the whole set of genes (23,639 genes used as a reference in the transcriptomic experiments). Each drawing lots were compared with the chIP-on-chip gene list for that pathway (280 genes). P-value was then computed as the percentage of permutations with more than 14 genes in common between the two types of experiment. **(c)** Estimation of the probability to observe by chance, 17 genes in common when combining both chIP-on-Chip and Transcriptomics experiments in the IPA “Transcription of DNA” pathway. One million of permutations were performed using 43 genes (number of significant genes observed in the transcriptomic experiments and found in the IPA pathway) randomly selected from the whole set of genes (23,639 genes used as a reference in the transcriptomic experiments). Each drawing lots were compared with the chIP-on-chip gene list for that pathway (224 genes). P-value was then computed as the percentage of permutations with more than 17 genes in common between the two types of experiment. **(d)** Estimation of the probability to observe by chance, 14 genes in common when combining both chIP-on-Chip and Transcriptomics experiments in the IPA “Expression of DNA” pathway. One million of permutations were performed using 44 genes (number of significant genes observed in the transcriptomic experiments and found in the IPA pathway) randomly selected from the whole set of genes (23,639 genes used as a reference in the transcriptomic experiments). Each drawing lots were compared with the chIP-on-chip gene list for that pathway (226 genes). P-value was then computed as the percentage of permutations with more than 14 genes in common between the two types of experiment.

Figure 2. Effects of IL-33 over-expression in HEK293-APP695wt cells on APP metabolism and PSEN2 expression. (a) The cellular localization of IL-33 in immunofluorescence experiments. Representative confocal images from HEK293-APP^{695wt} cells (transiently transfected with IL-33 cDNA) that were immunofluorescently labelled with

an anti-IL-33 (red) antibody. Nuclei are represented in blue (DAPI). (b) A Western blot analysis of extracts from HEK293-APP^{695wt} cells transfected with pcDNA3.1 expression vector containing (or not) IL-33 cDNA, using anti-IL-33, anti-APP and anti- β actin antibodies. (c) ELISAs of A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ secretion, following HEK293- APP^{695wt} transfection with pcDNA3.1 expression vector containing (or not) IL-33 cDNA. Histograms indicate the means of seven independent experiments in duplicate. Error bars represent the mean standard error. The mock condition (cells transfected with an empty vector) was used for calibration (=1). The relative quantification of *PSEN2* expression (using RT-qPCR) in HEK293-APP^{695wt} cells over-expressing IL-33 (or not), with *YWHAQ* as reference gene. Histograms indicate the means of four independent experiments in duplicate. Error bars represent the mean standard error. mock condition (cells transfected with an empty vector) was used for calibration (=1). Statistically significant differences ($p < 0.05$ in a Wilcoxon exact test) are indicated by asterisks.

Table 1. IPA analysis. (a) IPA transcriptomic analysis from Microarray and RNA-seq experiments (598 genes). The ten best pathways are presented; (b) IPA ChIP-on-chip experiments (2,031 genes). The ten best pathways are presented; (c) Cross relating high-throughput experiments (70 genes). The significant results are presented.

<i>a. Functions</i>	<i>p-Value</i>	<i>Molecules</i>
Transcription of RNA	1.54E-06	100/2475
G2/M phase	5.78E-06	18/278
Expression of RNA	7.61E-06	106/2815
Interphase	1.38E-05	42/1025
G2 phase	2.19E-05	20/354
G1 phase	7.62E-05	27/580
Apoptosis	9.21E-05	118/4373
Cell cycle progression	1.08E-04	57/1556
Expression of DNA	1.18E-04	77/1787
Transcription of DNA	1.26E-04	76/1759

<i>b. Functions</i>	<i>p-Value</i>	<i>Molecules</i>
Differentiation of cells	3.08E-06	286/2713
Cardiogenesis	4.90E-06	66/383
Phosphorylation of protein	5.37E-06	126/997
Transcription	7.43E-06	285/2519
Transcription of RNA	8.47E-06	280/2475
Development of digestive system	2.20E-05	64/400
Transcription of DNA	3.18E-05	224/1759
Development of forebrain	3.72E-05	44/241
Development of cardiovascular system	3.76E-05	155/1395
Expression of DNA	4.26E-05	226/1787

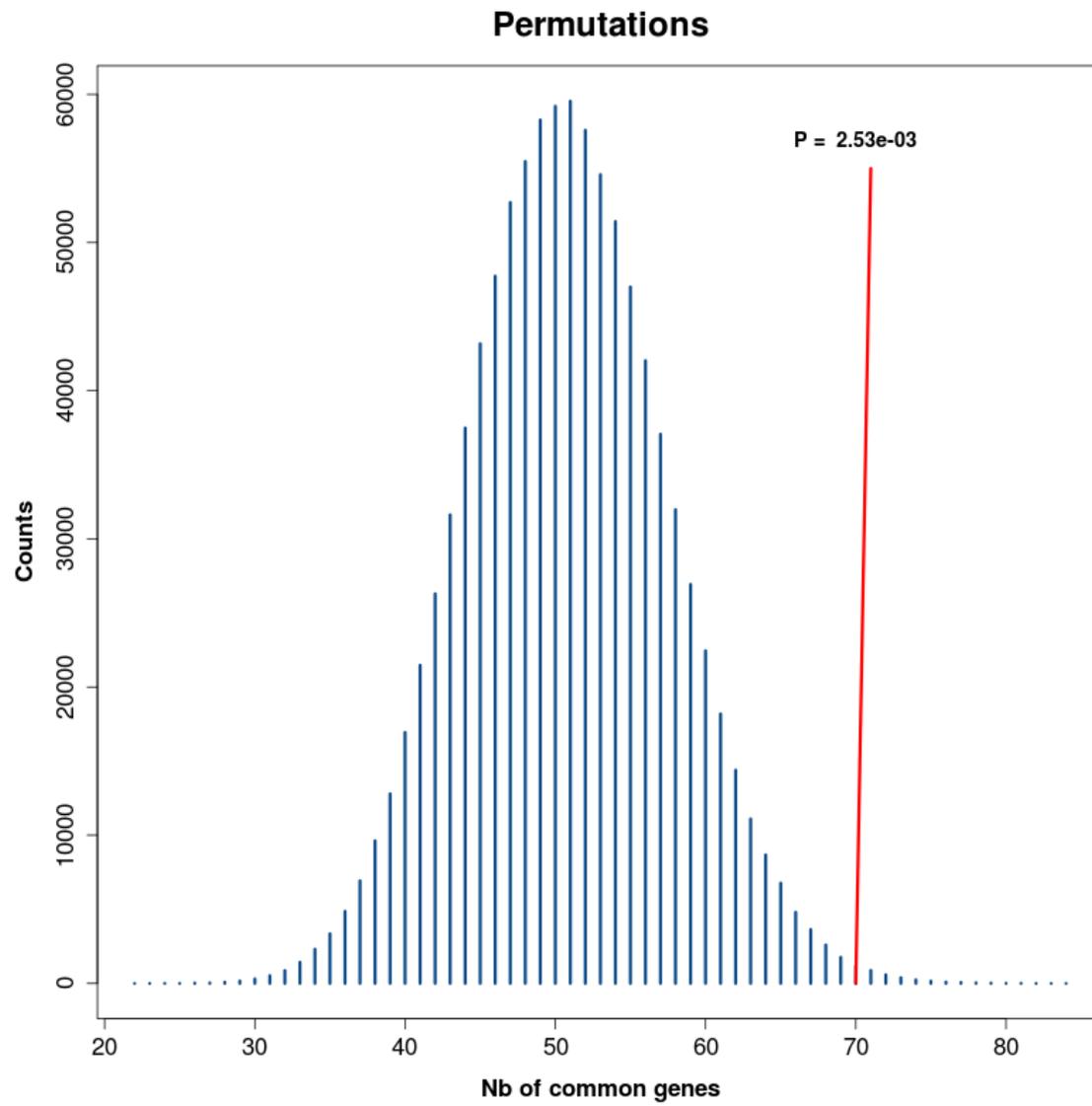
<i>c. Functions</i>	<i>p-Value</i>	<i>Molecules</i>
Formation of centriole	2.63E-03	2/22
Transcription of RNA	3.27E-03	17/2475
Quantity of chromosomes	3.47E-03	2/23
Expression of RNA	4.29E-03	18/2815
Cell cycle checkpoint control	5.12E-03	3/103
Transcription of DNA	5.62E-03	14/1759
Catabolism of ATP	5.94E-03	3/96

Table 2. list of genes showing differential expression following IL-33 over-expression in both microarray and RNA-seq experiments and ChIP-on-chip sequence enrichment.

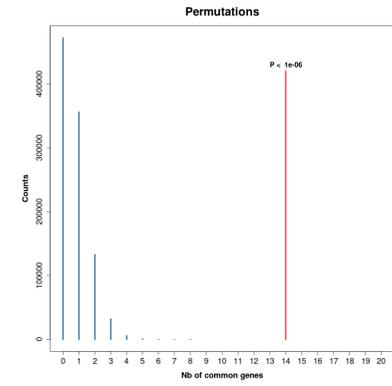
Gene	ID	Microarray		RNA-seq		ChIP-on-chip	
		Agilent_logFC	Agilent_Pvalue ¹	tophat_LogFC	tophat_Pvalue	Chip_ratio	Chip_pvalue
AKIRIN2	NM_018064	0.457	2,22E-03	0.269	5,14E-03	3,053	6,29E-15
ANK3	NM_020987	0.200	3,13E-02	0.285	2,60E-02	2,010	2,77E-13
ATF6	NM_007348	0.294	4,13E-03	0.361	5,14E-05	3,233	4,91E-13
ATF7IP	NM_018179	0.401	1,21E-02	0.370	4,88E-05	2,493	1,24E-07
ATG2B	NM_018036	0.313	1,03E-02	0.255	1,05E-02	3,801	1,30E-22
ATP5L	NM_006476	-0,303	1,47E-02	-0,351	1,59E-03	2,663	3,96E-15
BET1	NM_005868	-0,254	4,11E-02	-0,619	1,19E-13	3,020	1,54E-17
C10orf76	NM_024541	0.200	3,95E-02	0.301	4,60E-03	2,159	6,33E-07
CCDC88A	NM_018084	0.464	2,49E-02	0.280	2,26E-02	2,790	1,27E-12
CCDC91	NM_018318	0.336	1,53E-02	0.339	2,77E-03	2,290	2,52E-09
CDKN2AIP	NM_017632	0.689	5,96E-03	0.374	1,87E-04	2,638	1,54E-13
CENPN	BC039021	-0,348	4,17E-03	-0,446	1,38E-03	2,100	2,82E-04
CLDN1	NM_001040199	-0,205	3,17E-02	-0,252	2,00E-02	2,755	1,34E-14
CSRNP2	NM_030809	0.261	1,34E-02	0.261	2,04E-02	4,592	8,65E-18
DIS3L	NM_133375	0.251	3,33E-02	0.247	4,72E-02	4,560	1,56E-24
DNAJC1	NM_022365	0.366	1,23E-02	0.367	6,89E-04	3,004	1,71E-08
DUT	NM_001025248	-0,170	4,25E-02	-0,421	5,96E-05	2,837	1,81E-09
DYRK1A	NM_130436	0.287	1,74E-02	0.323	1,72E-03	2,933	8,63E-08
EMILIN2	NM_032048	0.324	1,51E-02	0.295	2,89E-02	4,188	1,12E-19
EPC1	BC036529	0.746	4,99E-03	0.248	3,13E-02	2,605	9,82E-08
EYA1	NM_000503	0.550	1,10E-02	0.357	4,87E-02	2,790	2,22E-10
FPGT	NM_003838	-0,315	3,50E-02	-0,367	1,29E-04	3,790	1,37E-24
HIST1H1C	NM_005319	1.219	1,03E-02	1,077	<1.1E-20	3,176	4,46E-10
HIST1H2BJ	NM_021058	0.469	9,57E-03	0.935	4,59E-02	3,383	7,14E-09
HIST1H3D	NM_003530	1.251	1,16E-02	1,884	1,93E-05	2,757	1,44E-07
HIST1H4H	NM_003543	1.613	8,54E-03	1,388	9,08E-04	2,398	5,34E-07
HIVEP2	NM_006734	0.325	3,04E-02	0.339	2,66E-03	2,468	2,26E-10
INSM2	NM_032594	0.683	1,37E-02	3,550	7,96E-03	3,209	1,95E-13
KATNB1	NM_005886	0.206	4,74E-02	0.241	1,28E-02	2,811	2,28E-16
KCNMB3	NM_171828	0.887	5,92E-03	0.563	5,50E-03	2,126	6,92E-09
MAD2L1	NM_002358	-0,203	4,12E-02	-0,470	1,03E-08	2,953	4,89E-22
MEX3B	NM_032246	0.328	2,55E-02	0.279	2,20E-02	4,592	2,72E-34
MOK	NM_014226	0.995	3,85E-03	0.459	3,04E-04	2,645	2,65E-06
MXD1	NM_002357	0.411	3,38E-02	0.340	3,83E-03	2,605	2,89E-08
NEK10	NM_001031741	0.449	3,25E-02	1,009	1,67E-02	3,394	7,47E-18
NREP	NM_004772	-0,320	4,09E-02	-0,311	2,96E-02	2,146	5,28E-07
NUDT12	NM_031438	-0,347	1,20E-02	-0,257	7,01E-03	2,216	4,54E-08
OSBPL6	NM_032523	0.387	5,74E-03	0.331	1,97E-03	3,146	8,73E-14
PAFAH1B1	NM_000430	0.385	5,71E-03	0.312	4,84E-04	3,168	2,06E-22
PHIP	NM_017934	0.282	2,51E-02	0.206	3,27E-02	2,316	8,31E-14
PLK2	NM_006622	0.450	5,39E-03	0.349	8,59E-03	2,072	3,59E-09
PPIH	NM_006347	-0,266	2,03E-02	-0,222	2,41E-02	2,100	2,60E-08
PPM1E	NM_014906	0.394	2,47E-02	0.432	1,09E-02	2,668	7,62E-12
PREX1	NM_020820	0.618	4,96E-03	0.446	3,09E-03	2,483	4,17E-08
PRPF38B	NM_018061	0.336	7,64E-03	0.222	4,80E-02	2,128	1,31E-13
PSMC6	NM_002806	-0,217	1,10E-02	-0,396	4,26E-06	3,493	1,29E-12
PSMD10	NM_002814	-0,354	1,53E-02	-0,304	6,65E-03	3,100	5,03E-10
PTPN12	NM_002835	0.218	3,38E-02	0.338	1,34E-02	2,918	7,45E-20
RFX3	NM_134428	0.662	2,81E-02	0.882	2,95E-07	2,572	1,02E-14
RLIM	NM_016120	0.247	2,72E-02	0.325	4,35E-04	2,787	2,02E-17
RSPH3	NM_031924	0.602	5,63E-03	0.446	5,39E-05	2,669	1,21E-09
RUNDC3B	NM_138290	0.538	1,35E-02	0.537	7,55E-04	2,927	1,41E-14
SDF2	NM_006923	-0,255	2,72E-02	-0,342	7,13E-03	3,136	2,24E-12
SFRP4	NM_003014	1,182	3,45E-03	0.926	1,07E-02	2,561	3,49E-11
SOCS2	NM_003877	0.948	3,97E-03	0.476	4,70E-04	2,407	4,59E-09
STARD3NL	NM_032016	-0,220	1,70E-02	-0,322	3,63E-04	2,100	2,27E-06
STK33	NM_030906	0.399	4,71E-03	0.344	7,67E-03	3,554	4,37E-30
SUMO2	NM_006937	-0,264	2,50E-02	-0,378	5,57E-05	2,017	6,54E-07
TEFM	NM_024683	-0,239	2,03E-02	-0,533	5,41E-07	2,855	9,23E-06
THUMPD2	NM_025264	0.580	6,05E-03	0.425	8,72E-04	3,190	3,80E-15
TJP1	NM_003257	0.270	4,20E-02	0.402	3,60E-05	3,118	1,22E-11
TMEM106B	NM_018374	-0,298	7,46E-03	-0,286	1,29E-03	3,394	3,20E-12
TRIM26	NM_003449	0.412	4,76E-03	0.326	3,52E-03	2,468	4,58E-08
TSPAN12	NM_012338	-0,367	9,74E-03	-0,226	2,87E-02	2,953	1,53E-09
USP15	NM_006313	0.348	3,65E-02	0.322	2,22E-02	3,855	8,97E-21
WDR26	NM_025160	0.289	1,83E-02	0.289	1,50E-02	3,761	2,90E-23
YAF2	NM_001012424	0.570	6,05E-03	0.300	1,77E-02	3,348	5,85E-23
ZBTB2	NM_020861	0.478	9,51E-03	0.404	2,85E-05	3,316	1,77E-19
ZNF319	NM_020807	0.387	1,08E-02	0.410	5,91E-03	2,240	1,13E-07
ZNF777	NM_015694	0.481	4,77E-03	0.395	3,51E-04	2,053	4,14E-06

Figure 1

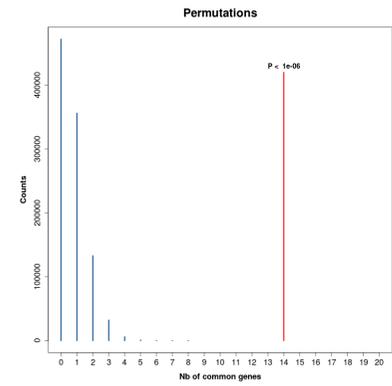
a



b



c



d

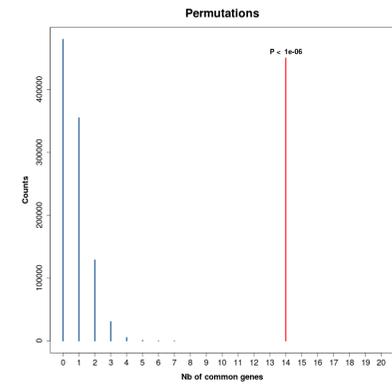
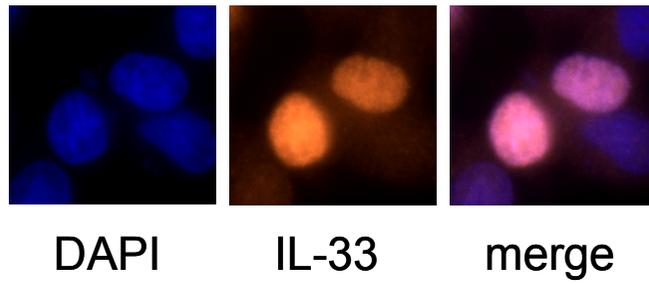
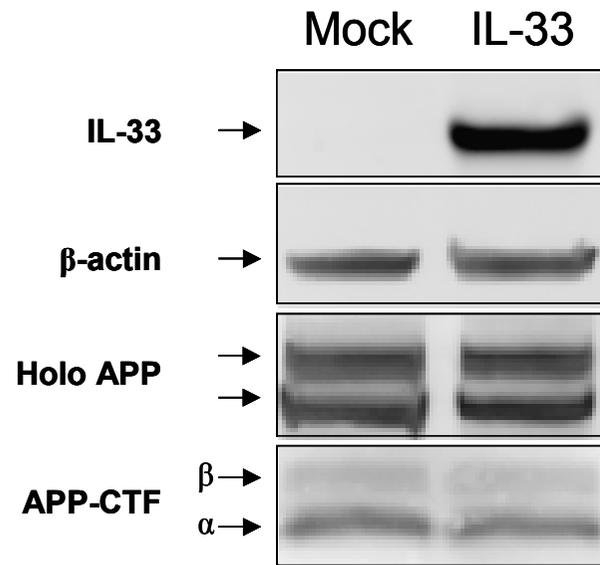


Figure 2

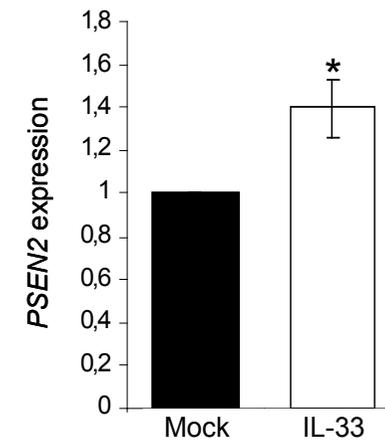
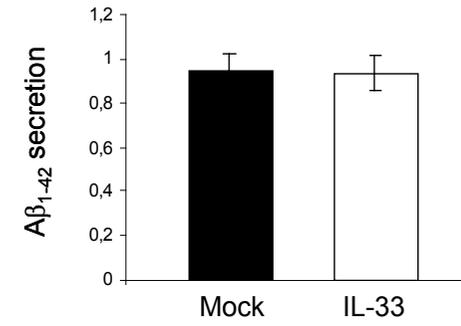
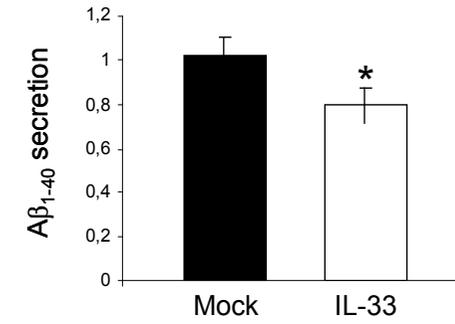
a



b



c



2) Etude de l'implication de BIN1 dans la physiopathologie de la MA

Se référer à l'article : «Increased Expression of BIN1 Mediates Alzheimer Genetic risk by Modulating Tau Pathology »

Un polymorphisme (rs744373) localisé en amont du gène *BIN1* a été identifié comme étant associé avec la MA dans les analyses de GWAS avec un effet délétère (OR : 1,166 ; $p=1,59 \times 10^{-26}$). Ce polymorphisme présentait également le plus fort niveau d'association avec la maladie après l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE* (OR : 3,685 ; $p < 1 \times 10^{-50}$) (<http://www.alzgene.org>). Nous avons donc cherché à identifier de quelle manière BIN1 pouvait être impliqué dans la MA.

2.1 *BIN1* est différenciellement exprimé dans la maladie d'Alzheimer

Des analyses de quantification du niveau d'ARNm de BIN1 dans le cerveau de patients atteints de la MA et de témoins nous ont indiqué que tout comme *IL-33*, *BIN1* est différenciellement exprimé chez les patients. En effet, il a été retrouvé comme étant sur-exprimé de 32% en normalisant sur l'expression du gène de la β -glucuronidase (*GUS*) et de 99% en normalisant sur l'expression du gène de l'actine β dans le cerveau des patients par rapport aux témoins. Ainsi, l'implication de BIN1 dans la MA pourrait être associée à l'augmentation de son expression chez les patients. Les analyses de GWAS nous ont permis d'identifier un gène d'intérêt associé à la MA mais ne permettent pas forcément d'identifier les polymorphismes responsables de cette association. Etant donné que le polymorphisme retrouvé lors des GWAS se situe en amont du gène *BIN1*, donc potentiellement dans une région régulatrice, et que ce gène est différenciellement exprimé chez les patients atteints de la maladie, nous avons cherché à identifier des polymorphismes fonctionnels pouvant expliquer cette variation de l'expression de *BIN1*. Nous avons également étudié l'implication de BIN1 dans la physiopathologie de la maladie afin de comprendre pourquoi une variation de son expression pouvait être associée à la MA.

2.2 Recherche de polymorphismes fonctionnels pouvant expliquer la variation d'expression de *BIN1* dans la MA

2.2.1 Identification d'une région d'intérêt en amont du gène *BIN1*

Afin d'identifier des polymorphismes fonctionnels pouvant expliquer l'association de *BIN1* avec la MA, nous avons effectué une imputation de 493 polymorphismes situés au niveau du gène *BIN1* dans la cohorte française EADI1 en utilisant la base de données « 1000 Genomes » (<http://www.1000genomes.org>). L'imputation est une méthode statistique qui permet d'estimer, à partir d'une population de référence, la distribution d'un polymorphisme dans une autre population. Ainsi, la connaissance d'un polymorphisme dans la population de référence permet de déduire la distribution des polymorphismes dans le cadre d'études de grandes populations. La population de référence est la base de données « 1000 Genomes », qui est une extension de la base de données HapMap ayant pour but d'identifier le plus de variants génétiques possibles, dont les variants rares, suite au séquençage de plus de 1000 individus provenant du monde entier. De cette manière, la distribution d'un nombre très important de polymorphismes a pu être estimée dans la population EADI1. Après une correction de Bonferroni définissant le seuil de significativité à 10^{-4} , deux polymorphismes sont retrouvés comme étant associés à la MA : le rs4663105 et le rs6733839. Des analyses indiquent que ces deux polymorphismes se situent dans un bloc haplotypique de 6,7 kb, comprenant le polymorphisme rs744373 qui a été initialement retrouvé comme étant associé à la MA lors des analyses de GWAS. L'imputation nous a donc permis d'identifier une région d'intérêt en amont du gène *BIN1* qui pourrait contenir des polymorphismes fonctionnels pouvant expliquer la variation de l'expression de *BIN1* retrouvée dans le cerveau des patients atteints de MA.

2.2.2 Analyse de tous les polymorphismes situés dans la région d'intérêt

La région d'intérêt pouvant contenir les polymorphismes fonctionnels a été séquencée afin d'identifier tous les polymorphismes présents. De cette manière, 8 nouveaux polymorphismes, dont 4 SNP et 4 Insertions/Délétions (Ins/Del), qui sont des variations correspondant à l'ajout ou le retrait d'un nombre variable de nucléotides, ont été identifiés. Parmi ces nouveaux polymorphismes, un seul a été

retrouvé comme étant fortement associé à la MA suite à une imputation dans la population EADI1 complète (OR=1,21 ; $p=1,3 \times 10^{-6}$). Il s'agit d'une Ins/Del (rs59335482) correspondant à l'insertion de 3 bases guanines (G). Cette association a été répliquée dans deux autres populations indépendantes. Ainsi, nous avons caractérisé une région d'intérêt en amont du gène *BIN1* contenant 3 polymorphismes fortement associés au risque de développer la MA. Nous avons ensuite cherché à déterminer si ces polymorphismes étaient fonctionnels.

2.2.3 Etude de la fonctionnalité des polymorphismes retrouvés associés à la MA

Afin d'étudier la fonctionnalité des polymorphismes, nous avons utilisé une stratégie nous permettant d'évaluer si les polymorphismes sélectionnés pouvaient moduler une activité transcriptionnelle. Des séquences contenant les polymorphismes d'intérêt (allèle sauvage ou muté) ont alors été clonées dans un vecteur rapporteur exprimant la luciférase sous contrôle d'un promoteur (pGL3-promoter – Promega). Ainsi, des cellules HEK293 et des cellules de neuroblastomes humaines SKNSH-SY5Y ont été transfectées avec ces vecteurs et pour chaque polymorphisme, l'activité luciférase a été comparée entre la condition avec le vecteur contenant l'allèle sauvage et la condition avec le vecteur contenant l'allèle muté. Or, il a été observé que l'allèle insertion du polymorphisme rs59335482 était associé avec une augmentation de l'activité luciférase dans les cellules HEK293 et de manière plus importante dans les cellules de neuroblastomes. En revanche, aucune variation de l'activité luciférase n'est observée pour les deux autres polymorphismes. L'ins/Del pourrait donc être un polymorphisme fonctionnel capable de moduler l'expression de *BIN1*. Il a d'ailleurs été observé que l'allèle insertion était associé à une augmentation de l'expression de *BIN1* dans le cerveau. Ce polymorphisme, entraînant l'augmentation de l'expression de *BIN1*, pourrait donc augmenter le risque de développer la MA.

A partir d'analyses sur le génome entier révélant une association de *BIN1* avec la MA, nous avons donc pu identifier un polymorphisme fonctionnel expliquant la variation de l'expression de *BIN1* observée chez les patients atteints de la maladie, ceci en densifiant le nombre de polymorphismes étudiés par l'utilisation de différentes techniques (Figure 30). En effet, l'imputation effectuée dans la population

EADI1 nous a permis d'identifier d'autres polymorphismes associés à la MA et de localiser une région d'intérêt. Le séquençage complet de cette région a ensuite permis d'étudier l'association avec la MA de tous les polymorphismes présents, dont ceux qui n'étaient pas répertoriés initialement dans la base de données « 1000 Genomes ». Ainsi, une Ins/Del a été identifiée comme étant associée à la MA et les analyses de fonctionnalité ont révélé que l'allèle insertion de ce polymorphisme était associé à une augmentation de l'expression de *BIN1*.

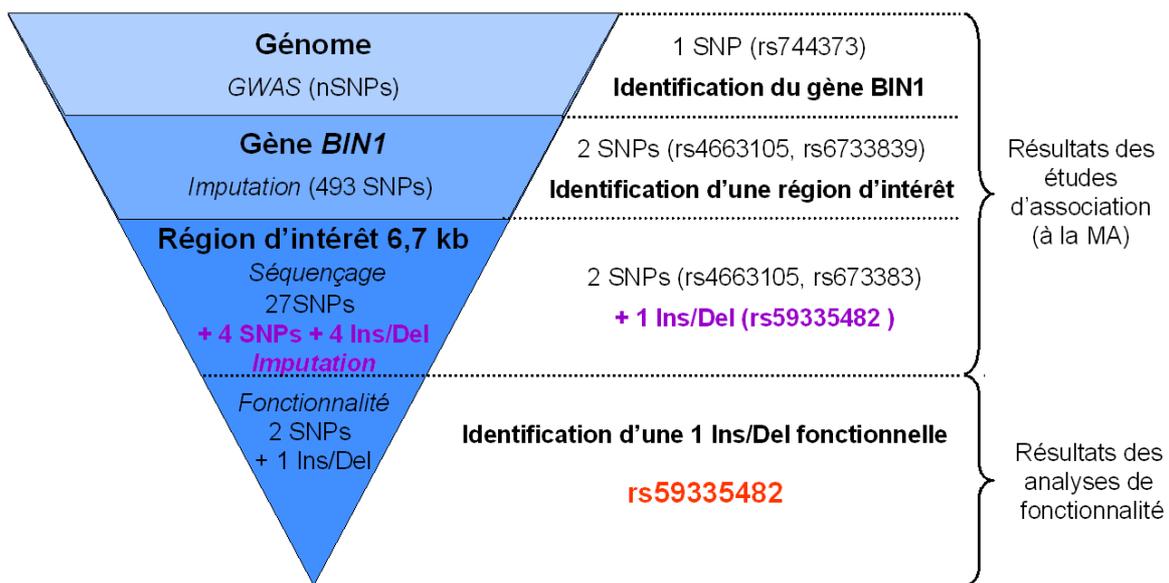


Figure 30 : Schéma récapitulatif des différentes analyses effectuées aboutissant à l'identification d'un polymorphisme fonctionnel associé à la MA

2.2.4 Etude de la fonctionnalité d'autres polymorphismes situés dans la région régulatrice du gène *BIN1* (non publié)

Suite à l'imputation des 493 polymorphismes situés au niveau du gène *BIN1*, seulement deux ont été retrouvés associés à la MA avec une valeur p inférieure à 10^{-4} . Cependant, avec un seuil à 10^{-3} , 12 polymorphismes en plus sont retrouvés comme étant associés à la MA, ce qui inclut le polymorphisme initialement trouvé lors des GWAS (rs744373). Ces polymorphismes sont tous situés en amont du gène *BIN1* et peuvent donc potentiellement être impliqués dans la régulation de l'expression de *BIN1*. La fonctionnalité de ces polymorphismes a donc été étudiée dans les cellules HEK293 et SKNSH-SY5Y (Figure 31) selon le protocole décrit précédemment.

Dans les cellules HEK293, aucun des polymorphismes testés ne semble fonctionnel au vu de nos résultats, même ceux localisés dans le bloc de déséquilibre de liaison de 6,7 kb décrit précédemment (polymorphismes représentés en rouge). En ce qui concerne les cellules de SKNSH-SY5Y, une diminution significative de l'activité luciférase en présence de l'allèle muté est retrouvée pour les polymorphismes rs11682128 (-91,2% ; p=0,0495) et rs730482 (-68% ; p=0,495). Au contraire, une augmentation significative de l'activité luciférase est observée en présence de l'allèle muté pour le polymorphisme rs744373 (+31% ; p=0,495).

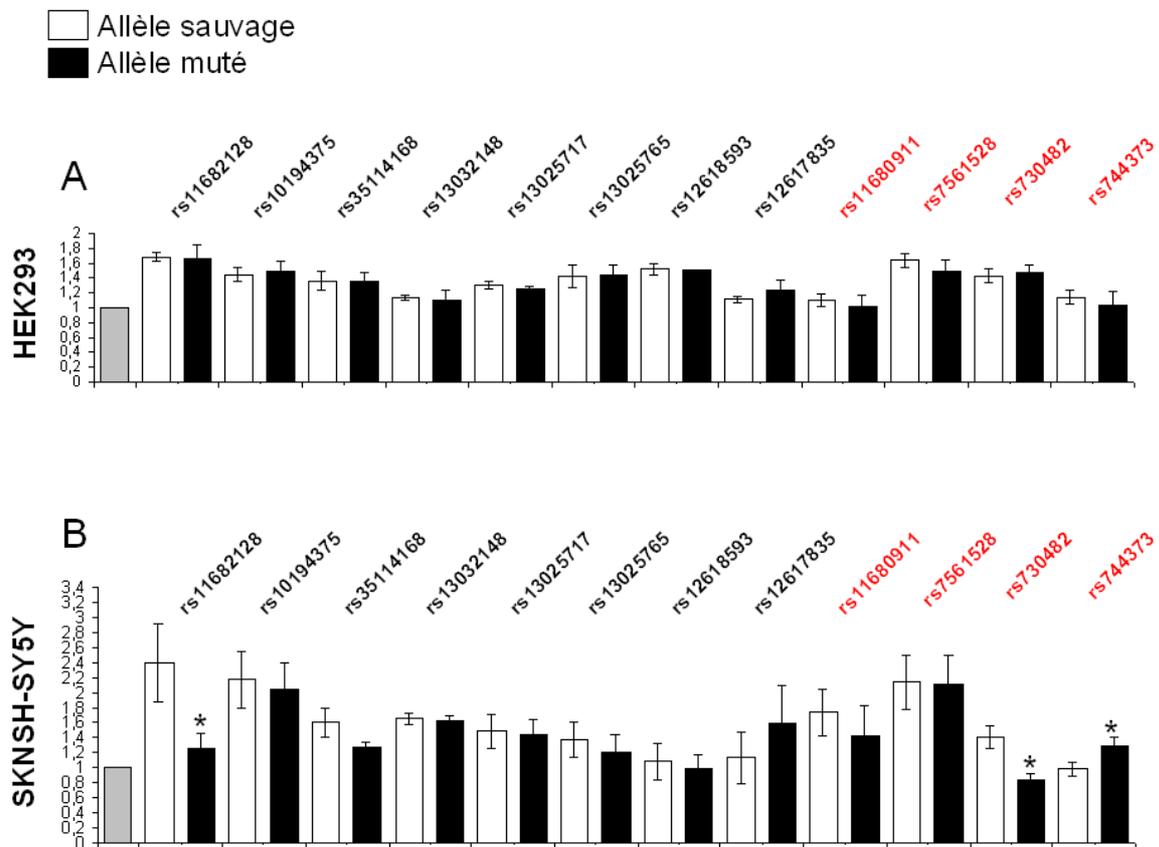


Figure 31 : Etude de la fonctionnalité des polymorphismes : (A) dans les cellules HEK293 transfectées avec le vecteur pGL3-promoter contenant l'allèle sauvage ou muté de chaque polymorphisme ; (B) dans les cellules SKNSH-SY5Y. Les polymorphismes représentés en rouge sont ceux situés dans le bloc de déséquilibre de liaison de 6,7 kb. Les graphes représentent la moyenne de 3 expérimentations indépendantes réalisées en triplicat. La condition avec le vecteur vide a été rapportée à 1 (en gris). * p<0,05 (Test de Kruskal-Wallis, SAS®).

2.3 Recherche de facteurs capables de moduler l'expression de *BIN1* (non publié)

Des analyses *in silico* ont indiqué que l'insertion des 3 bases G pouvait potentiellement créer un site de fixation de 6 facteurs de transcription différents (Tableau 6).

Tableau 6 : Facteurs de transcription pouvant potentiellement se fixer au niveau de la séquence créée par l'insertion des 3 bases G d'après l'analyse sur le logiciel MatInspector (<http://www.genomatix.de/en/index.html>).

Facteurs	Famille	Séquence
SPZ1	Testis-specific bHLH-Zip transcription factors	g GGGG ggtctc
ZNF148	C2H2 zinc finger transcription factors 2	cttagtgagaccc CCCC catctc
MAZ	Myc associated zinc fingers	atgggg GGGG tct
KLF15	Krueppel like transcription factors	gagat GGGG ggggtctc
SP1	GC-Box factors SP1/GC	gagatg GGGG ggggtctc
ZNF219	C2H2 zinc finger transcription factors 2	agtgagaccc CCCC catctctac

Le facteur SPZ1, pour « Spermatogenic leucine Zipper 1 » appartient à la famille des facteurs de transcription bHLHzip (basic-Helix-Loop-Helix Leucine Zipper), qui sont des protéines capables de se fixer à l'ADN. Ce facteur serait impliqué dans la spermatogénèse en régulant la prolifération et la différenciation cellulaire [Hsu *et al.* 2001] et pourrait également réguler l'activité de la kinase spécifique aux testicules (TESK1 pour Testis-specific protein Kinase 1) [Toshima *et al.* 1999]. Les facteurs ZNF 148 et 219, pour « Zinc Finger Protein » peuvent également se fixer à l'ADN de par leurs structures en doigt de zinc et sont impliqués dans la régulation de la transcription. ZNF148 est majoritairement impliqué dans le développement des vaisseaux sanguins [Li *et al.* 2006] alors que le facteur ZNF219 est impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires telles que la prolifération et la différenciation [Sakai *et al.* 2003]. Une étude a mis en évidence l'implication de ZNF219 dans la maladie de Parkinson en régulant l'expression de l' α -synucléine [Clough *et al.* 2009]. Le facteur MAZ, pour « Myc-Associated Zinc-finger protein » est également impliqué dans de nombreux processus dont la différenciation des cellules souches neuronales [Wang *et al.* 2012]. De plus, MAZ a été retrouvé comme étant différentiellement exprimé dans la MA [Gomez *et al.* 2010]. Le facteur KLF15, pour « Kruppel Like Factor 15 », est quant à lui majoritairement impliqué dans la genèse

et dans le transport du glucose [Gray *et al.* 2007 ; Gray *et al.* 2002]. Enfin, le facteur SP1 (Specificity Protein 1), qui possède une structure en doigt de zinc lui permettant de se fixer à l'ADN, est impliqué dans de nombreux processus cellulaires telle que la croissance ou la différenciation et peut agir aussi bien en tant qu'activateur que de répresseur. Il a été observé qu'il avait un impact dans le métabolisme de l'APP en modulant l'expression de BACE1 [Zhou *et al.* 2004].

Ainsi, en plus de leur fixation potentielle sur la séquence de l'insertion, certains de ces facteurs présentent un intérêt quant à leur implication dans la physiopathologie de la MA. Nous avons cherché à étudier leur fixation sur des séquences possédant l'allèle insertion par deux techniques différentes.

a) Mesure de l'activité luciférase en présence des facteurs de transcription

Les 6 facteurs ont été sur-exprimés dans les cellules HEK293 et dans les cellules de SKNSH-SY5Y en même temps que celles-ci étaient transfectées avec les vecteurs rapporteurs pGL3-promoter contenant l'allèle sauvage ou muté du polymorphisme rs59335482. Avant toute analyse, nous avons vérifié que la sur-expression de ces différents facteurs ne modulait pas l'activité luciférase du vecteur vide. Dans les cellules HEK293, nous avons observé une tendance à l'augmentation de l'activité luciférase en présence de l'allèle insertion suite à la sur-expression du facteur de transcription SPZ1. En revanche, en ce qui concerne les facteurs de transcription KLF15 et ZNF219, nous avons observé que suite à leur sur-expression, l'activité luciférase en présence de l'allèle insertion diminuait pour revenir au niveau de celle observée en présence de l'allèle délétion. Enfin, une tendance à la diminution de l'activité luciférase est observée en présence de l'allèle insertion suite à la sur-expression du facteur SP1 mais la valeur ne revient pas au niveau de celle observée avec l'allèle délétion (Figure 32). En ce qui concerne le facteur MAZ, nous observons une diminution de l'activité luciférase du vecteur vide après sur-expression de ce facteur (-40%). Il s'avère donc difficile de pouvoir étudier son impact sur l'activité luciférase en présence des allèles insertion ou délétion. Néanmoins, en normalisant les valeurs obtenues sur la différence d'activité luciférase du vecteur vide entre les conditions avec ou sans sur-expression de MAZ, nous ne retrouvons aucune variation de l'activité luciférase suite à la sur-expression du facteur de transcription. La même observation a été faite avec le facteur ZNF148 qui

augmente de 40% l'activité luciférase du vecteur vide. Après normalisation, nous observons une tendance à l'augmentation de l'activité luciférase suite à la sur-expression de ZNF148 aussi bien pour l'allèle insertion que l'allèle délétion.

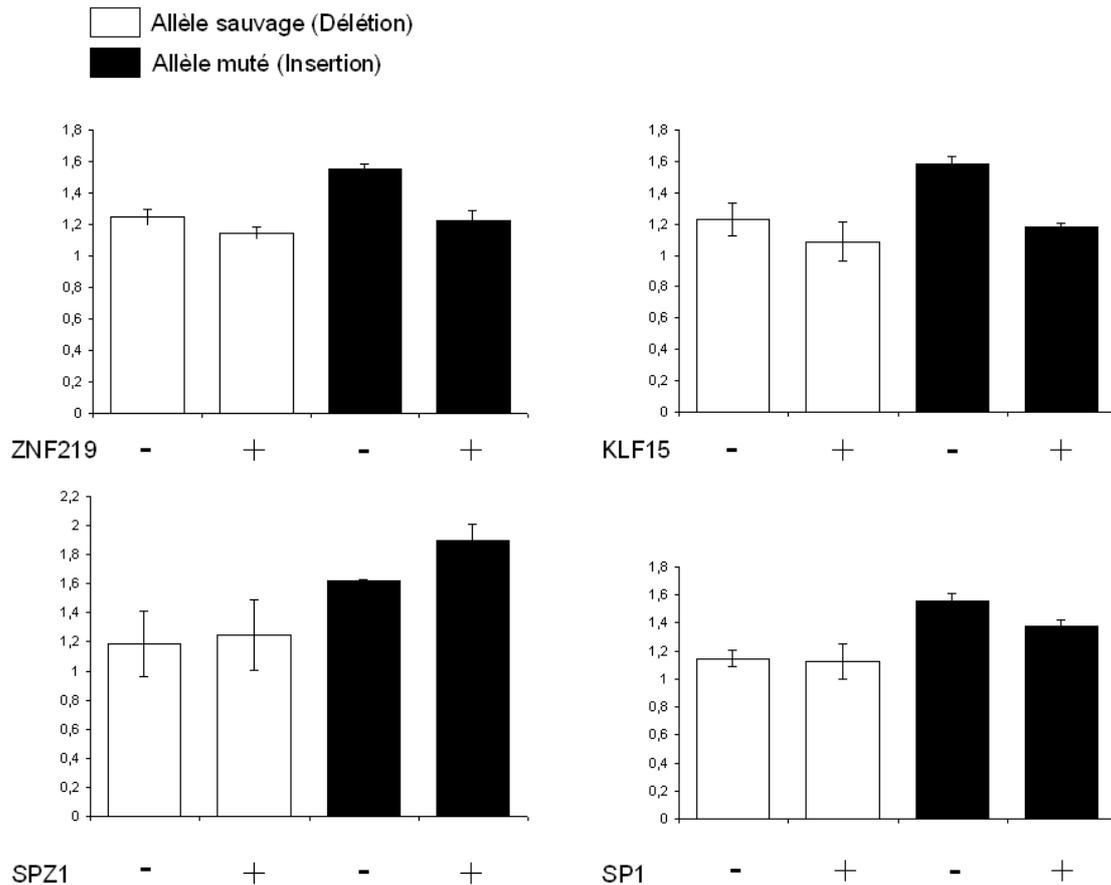


Figure 32 : Mesure de l'activité luciférase dans les cellules HEK293 transfectées avec le vecteur pGL3-promoter contenant la séquence de la délétion ou de l'insertion et sur-exprimant ou non les facteurs de transcription ZNF219, KLF15, SPZ1 et SP1. La condition avec les deux vecteurs vides a été rapportée à 1. Les graphes représentent la moyenne de 2 expérimentations indépendantes réalisées en triplicat. Ne sont représentés ici que les facteurs ne modulant pas l'expression du vecteur pGL3-promoter vide.

Concernant les cellules SKNSH-SY5Y, il a été observé que l'activité luciférase du vecteur vide était modulée de manière assez importante suite à la sur-expression des facteurs de transcription testés. Nous avons cherché à palier à ce problème par l'utilisation d'un vecteur rapporteur dans lequel des sites potentiels de fixation de facteurs de transcription ont été enlevés (pGL4 vector - promega), mais là aussi nous observons des variations de l'activité luciférase du vecteur vide en présence des différents facteurs de transcription. En normalisant les valeurs obtenues sur la différence d'activité luciférase du vecteur vide entre les conditions avec ou sans sur-expression des différents facteurs, nous retrouvons une annulation de l'effet de

l'insertion suite à la sur-expression des facteurs ZNF19 et KLF15. Nous ne retrouvons cependant aucune augmentation de l'activité luciférase en présence de l'allèle insertion suite à la sur-expression de SPZ1.

b) Expérimentations de retard sur gel

Afin d'identifier si des facteurs pouvaient se fixer préférentiellement au niveau de l'allèle insertion du polymorphisme rs59335482, nous avons réalisé des analyses de retard sur gel. Nous avons fait synthétiser des séquences de 40 paires de bases contenant les allèles insertion et délétion et marquées à la digoxigénine. Les expérimentations de retard sur gel ont été réalisées selon les instructions du kit « Dig Gel Shift 2nd Generation » (Roche) et avec les produits contenus dans ce kit. Les séquences marquées ont alors été mises à incuber avec des protéines provenant d'extraits nucléaires de cellules SKNSH-SY5Y. En parallèle, une compétition avec 10 fois plus d'oligonucléotides non marqués a été effectuée afin d'identifier la spécificité de fixation des protéines aux séquences testées. L'ADN et les protéines ont ensuite été déposés sur un gel d'acrylamide (6% Acrylamide : Bis-acrylamide 37,5 :1 Q-BIOgene) d'une épaisseur de 0,75 mm et ayant subi une pré-migration de 30 minutes. L'électrophorèse a ensuite été effectuée à 200V dans du TBE 0,5X (Tris-HCl 1M, acide borique 0,9 M, EDTA 20 mM, pH 8), suivie d'un transfert effectué à l'aide du Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Biorad) à 15V pendant 1 heure sur une membrane de nitrocellulose chargée positivement (Whatman®). Une saturation a ensuite été effectuée, suivie d'une incubation de 30 minutes avec un anticorps dirigé contre la digoxigénine et conjugué avec la phosphatase alcaline (disponible dans le kit). Suite à deux lavages, la membrane a été mise en contact avec la solution de détection (CDP-Star - Roche) et la lecture a été effectuée sur la caméra Chemidoc (Biorad).

Les analyses révèlent ainsi une fixation de protéine plus importante en présence de la séquence contenant l'allèle insertion par rapport à la séquence contenant l'allèle délétion (Figure 33). La compétition entraîne bien une diminution de l'intensité de la bande aussi bien pour la séquence contenant l'insertion que pour celle contenant la délétion, ce qui pourrait signifier que des protéines se fixent spécifiquement sur ces séquences.

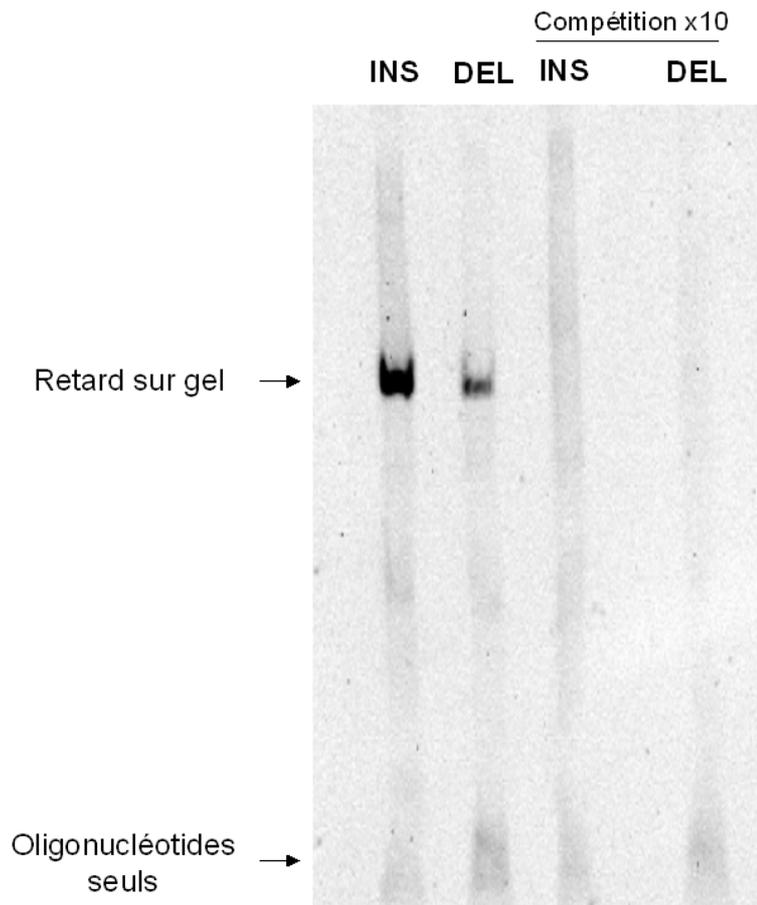


Figure 33 : Expérimentation de retard sur gel avec des oligonucléotides marqués à la digoxigénine contenant les séquences de l'allèle insertion (INS) ou délétion (DEL) du polymorphisme rs59335482. La compétition pour chacune de ces séquences a été effectuée avec 10 fois plus d'oligonucléotides non marqués de séquence identique.

2.4 Etude de l'impact de BIN1 dans la physiopathologie de la MA

Afin de déterminer l'impact de la modulation de l'expression de *BIN1* sur la physiopathologie de la MA, nous avons utilisé un modèle de drosophile sur lequel nous avons étudié le lien entre une altération de l'expression d'un orthologue de *BIN1* : *Amph* et la neurotoxicité induite par Tau ou l'A β . Il a alors été observé que BIN1 pouvait avoir un effet délétère en induisant la neurotoxicité médiée par Tau mais pas celle médiée par l'A β . En accord avec ces résultats, il a été observé que l'allèle insertion du polymorphisme rs59335482 associé à une augmentation de l'expression de *BIN1* était associé avec une augmentation du niveau de Tau mais pas de celui d'A β_{1-40} et d'A β_{1-42} dans le cerveau des patients atteints de MA.

De plus, des analyses de sur-expression de BIN1 dans les modèles cellulaires HEK293-APP^{695wt} et SKNSH-SY5Y-APP^{695wt} sur-exprimant l'APP de manière stable n'ont pas révélé de variations du métabolisme de l'APP (Figure 34).

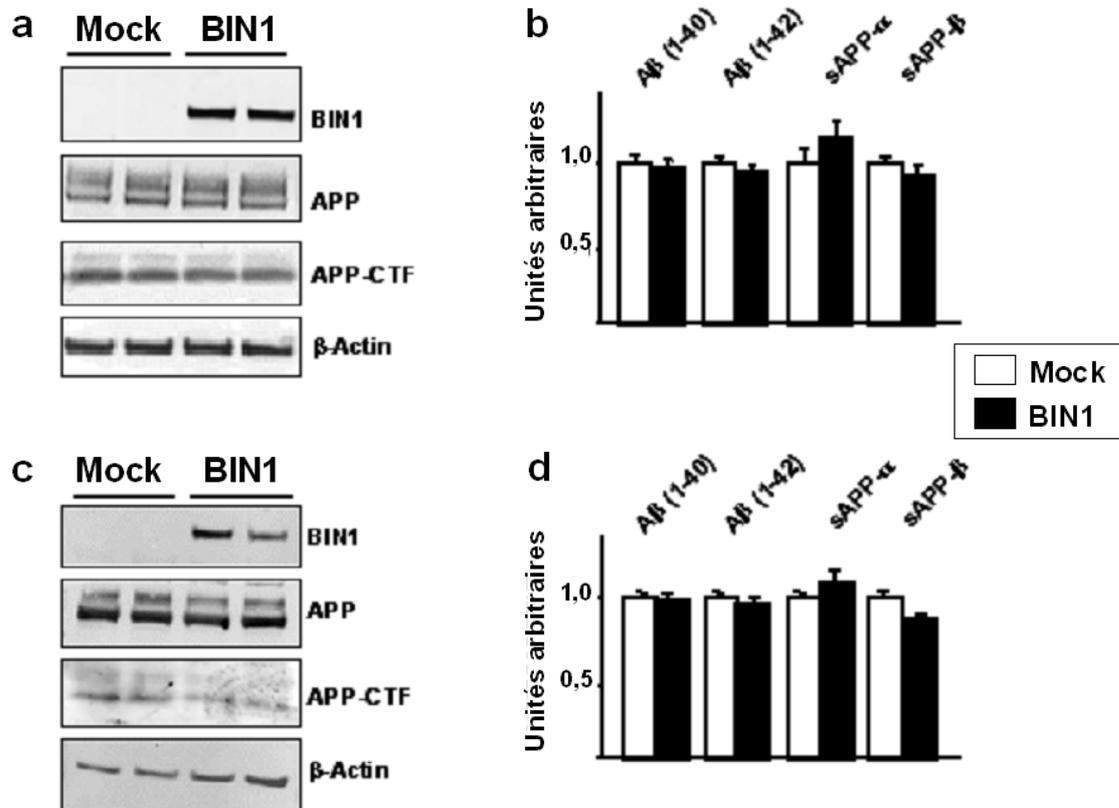


Figure 34 : Mesure de l'impact de BIN1 sur le métabolisme de l'APP. (a) Western Blot avec des anticorps reconnaissant BIN1, l'APP en C-terminal, et l'actine β à partir d'extraits protéiques de cellules SKNSH-SY5Y-APP^{695wt} transfectées avec un vecteur d'expression contenant BIN1 (BIN1) ou un vecteur vide (Mock) (b) Mesure par ELISA de la quantité d'A β et d'APPs dans les milieux de culture de ces mêmes cellules. (c) (d) Analyses similaires effectuées dans les cellules HEK293-APP^{695wt}.

L'interaction de Tau avec BIN1 a par la suite été étudiée. Pour cela, leur localisation cellulaire a tout d'abord été observée dans les cellules SKNSH-SY5Y par des expérimentations d'immunofluorescence. Ainsi, BIN1 et Tau montrent une forte co-localisation dans le cytosol des cellules. Une co-immunoprécipitation de BIN1 avec Tau a également été observée dans ces mêmes cellules sur-exprimant les deux protéines. Cette co-immunoprécipitation a aussi été observée à un niveau plus physiologique, c'est à dire à partir de fractions synaptosomales prélevées dans des cerveaux de souris. Des expérimentations utilisant des protéines recombinantes de Tau et BIN1 ont enfin révélé qu'il s'agissait d'une interaction directe.

2.5 Discussion

Des analyses génétiques nous ont permis d'identifier des polymorphismes associés à la MA dans une région d'intérêt située en amont du gène *BIN1*. Nous avons alors supposé que ces polymorphismes pouvaient expliquer la modulation de l'expression de *BIN1* observée dans le cerveau des patients atteints de MA.

2.5.1 Identification d'un polymorphisme fonctionnel associé à la MA et modulant l'expression de *BIN1*

Parmi les polymorphismes associés à la MA, nous avons pu identifier un polymorphisme fonctionnel associé à l'expression de *BIN1* dans le cerveau : le rs59335482, qui correspond à une Ins/Del de 3 bases G. Tout comme des polymorphismes fonctionnels ont pu être identifiés comme modulant l'expression de l'*APP* ou de l'*APOE*, nous avons alors identifié un polymorphisme modulant l'expression de *BIN1*. Ce polymorphisme se situe dans le même bloc haplotypique que celui initialement trouvé dans les GWAS (rs744373) et est d'ailleurs en déséquilibre de liaison presque complet avec ce polymorphisme ($D'=0,98$, $r^2=0,94$). En revanche, ce polymorphisme est en déséquilibre de liaison incomplet avec le rs4663105 ($D'=0,98$; $r^2=0,56$) et le rs6733839 ($D'=0,94$; $r^2=0,47$), ceci étant probablement dû à la différence de fréquence de l'allèle mineur entre le polymorphisme rs59335482 (0,27) et les polymorphismes rs4663105 (0,40) et rs6733839 (0,39). L'Ins/Del pourrait donc expliquer l'association du polymorphisme original (rs744373) avec la MA, l'allèle insertion étant associé à un risque plus élevé de développer la MA en augmentant l'expression de *BIN1*.

En abaissant le seuil de 10^{-4} à 10^{-3} suite à l'imputation, 12 polymorphismes en plus peuvent être considérés comme associés à la MA. Parmi ces polymorphismes, 4 sont situés dans la région d'intérêt de 6,7 kb dont le polymorphisme initialement retrouvé dans les analyses de GWAS. Trois polymorphismes montrent une variation significative de l'activité luciférase dans les cellules SKNSH-SY5Y (rs11682128, rs730482, rs744373), dont deux dans la région de 6,7 kb (rs730482 et rs744373) et pourraient donc expliquer la variation d'expression de *BIN1*. Cependant, les polymorphismes rs11682128 et rs730482 présentent une diminution de l'activité luciférase en présence de l'allèle muté, ce qui n'est pas en accord avec

l'augmentation de l'expression de *BIN1* observée. Le polymorphisme rs744373 montre quant à lui une faible augmentation de l'activité luciférase comparé à celle observée avec le polymorphisme rs59335482. De plus, aucune variation n'est retrouvée dans les cellules HEK293.

2.5.2 Recherche de facteurs impliqués dans la modulation de l'expression de *BIN1*

Nous avons ensuite cherché à identifier quels facteurs étaient susceptibles de se fixer sur la séquence créée par l'insertion des trois bases G. Les analyses en gènes rapporteurs n'ont pas permis d'identifier un facteur en présence duquel l'activité luciférase serait significativement augmentée pour l'allèle insertion. Cependant, ces facteurs sont peut être déjà présents en quantité importante dans les cellules et leur sur-expression influencerait donc peu sur l'activité luciférase. La diminution de l'activité luciférase en présence de l'insertion suite à la sur-expression des facteurs ZNF219 et KLF15 semble indiquer que ces facteurs seraient susceptibles de se fixer sur la séquence contenant l'allèle insertion. Cette diminution n'est pas significative car seulement deux expérimentations ont été effectuées pour le moment. Ces facteurs pourraient alors avoir un effet inhibiteur mais cela ne serait pas en accord avec l'augmentation de l'activité luciférase observée en présence de l'allèle insertion.

Les expérimentations de retard sur gel ont néanmoins indiqué qu'une quantité plus importante de protéines nucléaires pouvait se fixer sur la séquence contenant l'insertion des trois G par rapport à la séquence de la délétion. Des expérimentations de « Supershift », qui consistent à ajouter au mélange contenant les oligonucléotides et les protéines un anticorps dirigé contre un facteur susceptible de se fixer sur ces séquences, sont en cours avec les anticorps dirigés contre les 6 facteurs de transcription. Si aucun retard sur gel n'est observé avec les facteurs testés, il sera alors nécessaire de récupérer les protéines se fixant sur ces séquences et de chercher à les identifier en utilisant par exemple une technique de spectrométrie de masse.

2.5.3 Association entre l'augmentation de l'expression de *BIN1* et les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la MA

Nous avons cherché à comprendre par la suite l'impact de l'augmentation de l'expression de *BIN1* dans la physiopathologie de la MA. Du fait de son implication dans l'endocytose et de l'effet connu de ce mécanisme sur la régulation du métabolisme de l'APP, il avait d'abord été supposé que BIN1 pouvait avoir un impact sur la production d'A β . Nous n'observons pas de modulation du métabolisme de l'APP lors de nos analyses de sur-expression dans les modèles cellulaires et SKNSH-SY5Y-APP^{695wt} et HEK293-APP^{695wt}. Cependant, en plus des modèles de sur-expression, il est nécessaire de vérifier l'effet de BIN1 sur le métabolisme de l'APP dans des modèles d'inactivation de BIN1 avant d'affirmer avec certitude que la protéine n'a pas d'impact sur ce processus.

Néanmoins, les analyses effectuées sur les drosophiles et l'étude de l'association de l'allèle insertion du polymorphisme rs59335482 avec les marqueurs de la MA ont révélé que BIN1 aurait plutôt un impact sur la pathologie Tau. De plus, une interaction directe entre Tau et BIN1 a été détectée. Cependant, les mécanismes faisant le lien entre Tau, BIN1 et les processus physiopathologiques de la maladie restent à déterminer. BIN1 pourrait agir sur Tau en modulant sa phosphorylation, affectant alors la stabilité des microtubules ou entraînant son agrégation. Il a en effet été observé que BIN1 pouvait avoir un impact dans la phosphorylation de certaines protéines [Masumi *et al.* 2005 ; Pineda-Lucena *et al.* 2005]. En revanche, BIN1 ne semble pas avoir d'impact sur la formation des DNF car aucune co-localisation de BIN1 avec ces lésions n'a été observée. BIN1 semblerait donc agir à des stades plus précoces sur la pathologie Tau. Ainsi, le fait que BIN1 semble préférentiellement agir sur la pathologie Tau en fait le premier déterminant génétique de la MA associé à Tau. L'analyse de l'impact de BIN1 dans la physiopathologie de la MA d'après nos résultats et les données issues de la bibliographie est développée dans la partie « Discussion générale et perspectives ».

ARTICLE : «Increased Expression of BIN1 Mediates Alzheimer Genetic risk by Modulating Tau Pathology »

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Au laboratoire, par différentes approches regroupées sous le terme d'analyses génomiques, nous avons pu identifier des gènes dont l'expression était modulée au cours de la MA. *IL-33* a tout d'abord été identifié comme étant sous-exprimé dans le cerveau de patients atteints de MA lors d'analyses transcriptomiques puis des études d'association génétique ont mis en évidence que des polymorphismes localisés sur le gène *IL-33* pouvaient potentiellement être associés à la MA. Au contraire, *BIN1* a tout d'abord été identifié comme étant associé à la MA par des analyses génétiques puis des analyses d'expression ont révélé que *BIN1* était sur-exprimé dans le cerveau des patients atteints de la maladie. En plus d'une modulation de leur expression dans la MA, nous avons donc pu, par nos analyses, identifier deux déterminants génétiques potentiels de la maladie. Il a donc été supposé que les protéines IL-33 et BIN1 pouvaient avoir un impact dans la physiopathologie de la MA.

Les premières données obtenues sur IL-33 nous ont indiqué que la protéine pouvait moduler le métabolisme de l'APP de par son activité de régulation transcriptionnelle, d'où la stratégie d'analyses à haut débit mise au point afin d'identifier l'ensemble des gènes modulés par ce facteur. En revanche, l'association d'IL-33 avec la MA n'a pour l'instant pas été retrouvée, ce qui n'enlève pas son intérêt dans l'étude de la physiopathologie de la maladie. Concernant BIN1, nous avons tout d'abord trouvé une association de son gène avec la MA par GWAS et ensuite observé que *BIN1* était différentiellement exprimé chez les patients atteints de la maladie. Nous avons par la suite identifié un polymorphisme fonctionnel expliquant l'association de *BIN1* avec la MA et l'augmentation de l'expression de *BIN1* dans le cerveau des patients atteints de la maladie. Enfin, nous avons observé un effet de BIN1 sur la pathologie Tau.

A partir des résultats obtenus, nous avons donc pu faire ressortir des mécanismes précis permettant d'expliquer l'implication de ces deux protéines dans la MA.

1) Implication d'IL-33 dans la physiopathologie de la MA

1.1 IL-33 et lésions vasculaires observées dans la MA

IL-33 est impliquée dans de nombreux processus physiopathologiques, notamment au niveau cardio-vasculaire. Un effet protecteur sur l'hypertrophie cardiaque et l'athérosclérose a notamment été retrouvé [Miller *et al.* 2008], l'impact d'IL-33 sur ces mécanismes étant médié par son activité interleukine. Des lésions vasculaires sont retrouvées dans la MA et nous avons alors supposé qu'IL-33 pouvait avoir un impact sur ces lésions. Une angiogénèse anormale a par exemple été observée chez les patients atteints de MA [Grammas *et al.* 2011]. Cette angiogénèse serait stimulée par l'hypoxie qui est fréquemment observée dans la MA [Luo *et al.* 2012]. Il a également été observé que l'angiogénèse pouvait être stimulée par l'A β [Cantara *et al.* 2004]. Or, il a été observé qu'IL-33 semblerait avoir un effet répresseur sur l'angiogénèse [Kuchler *et al.* 2008]. Nous pouvons alors supposer que cet effet répresseur serait induit par la diminution de la sécrétion d'A β ₁₋₄₀ provoquée par IL-33. IL-33 pourrait également agir sur une autre lésion vasculaire observée dans la MA : l'AAC. En effet, au laboratoire, une association entre IL-33 et l'AAC a été retrouvée, avec un effet protecteur d'IL-33 sur cette affection. IL-33 pourrait donc avoir un impact sur cette pathologie en induisant une diminution de la sécrétion d'A β ₁₋₄₀, qui est le constituant majeur de l'AAC. Ainsi, de par son effet sur le métabolisme de l'APP, IL-33 pourrait avoir un impact sur les lésions vasculaires observées dans la MA. Cet effet d'IL-33 sur le métabolisme de l'APP ne serait pas médié par son activité d'interleukine mais par sa fonction de facteur de régulation transcriptionnelle. Contrairement à sa fonction d'interleukine, cette fonction d'IL-33 est encore peu connue. De ce fait, nous avons recherché par des analyses à haut débit les gènes différentiellement exprimés suite à la sur-expression d'IL-33 afin d'expliquer son effet sur la sécrétion d'A β ₁₋₄₀.

Ces analyses ont majoritairement fait ressortir un impact d'IL-33 sur la régulation de la transcription et un effet possible sur la compaction de la chromatine en modulant l'expression de certaines histones. Ainsi, IL-33, en se fixant sur un groupe d'histones particulier et en modulant leur expression, pourrait moduler spécifiquement l'expression de certains gènes. De plus, IL-33 activerait de nombreux gènes impliqués dans la machinerie de la transcription et agirait alors de manière plus spécifique sur l'expression des gènes par le biais de son action sur certains

groupes d'histones. Parmi ces gènes, nous avons recherché si certains étaient impliqués dans la physiopathologie de la MA et plus particulièrement dans le métabolisme de l'APP.

1.2 Effet d'IL-33 sur l'activité de la γ -sécrétase

Le gène *PSEN2* a été identifié comme étant sur-exprimé suite à la sur-expression d'IL-33 lors des analyses transcriptomiques. Ce gène code pour la préséniline 2, qui est un composant de la γ -sécrétase. La modulation de l'expression de ce gène pourrait donc expliquer la diminution de la sécrétion d'A β ₁₋₄₀ observée suite à la sur-expression d'IL-33. De plus, nos résultats ont indiqué une diminution préférentielle de l'A β ₁₋₄₀ par rapport à l'A β ₁₋₄₂, or il est reconnu que la γ -sécrétase détermine la nature du peptide amyloïde généré (Introduction : paragraphe 3.2.4.3.1.3 c). Nous avons alors cherché à expliquer en quoi une augmentation de l'expression de la PS2 pouvait entraîner une diminution de la production d'A β ₁₋₄₀.

Il a été observé que les molécules de PS1 et PS2 produites étaient stabilisées et subissaient l'endoprotéolyse nécessaire à leur activation par un nombre limité de facteurs cellulaires communs pour les deux PS et que les molécules en excès étaient rapidement dégradées [Thinakaran *et al.* 1997]. Nous pouvons donc supposer qu'une augmentation de l'expression de la PS2 va entraîner un recrutement plus important de facteurs nécessaires à sa stabilisation, parmi lesquels se trouvent les autres composants de la γ -sécrétase (NCT, Aph1, Pen2), et à son activation, tels que les présénilases, entrant alors en compétition avec la PS1 qui a besoin des mêmes facteurs pour être stabilisée et activée. Ainsi, une sur-expression de la PS2 entraînerait une augmentation de la présence de PS2 active au sein de la cellule et par conséquent, une diminution de la présence de la PS1 sous sa forme active. Il serait alors observé une augmentation de la production de complexes γ -sécrétase contenant la PS2 et une diminution de la production de complexes contenant la PS1, car les autres composants de ces complexes sont présents en quantité limitante. Cela entraînerait donc une augmentation de l'activité γ -sécrétase portée par la PS2 et une diminution de l'activité γ -sécrétase portée par la PS1. Des études ont montré que la PS2 pouvait entrer en compétition avec la PS1 pour son interaction avec l'APP [Pradier *et al.* 1999]. Ainsi, une augmentation de l'expression de la PS2 entraînerait une augmentation du ratio PS2/PS1 actives ce qui aboutirait à une

augmentation du clivage de l'APP par la PS2 et une diminution du clivage de l'APP par la PS1. Cependant, des études ont montré que l'activité γ -sécrétase était majoritairement portée par la PS1 [Steiner *et al.* 1999]. Ainsi, suite à la sur-expression de la PS2, la diminution du clivage de l'APP due à une diminution de l'activité γ -sécrétase portée par la PS1 ne serait pas compensée par l'augmentation de l'activité γ -sécrétase portée par la PS2. La sur-expression de la PS2 pourrait donc entraîner une diminution de la sécrétion d'A β (Figure 35).

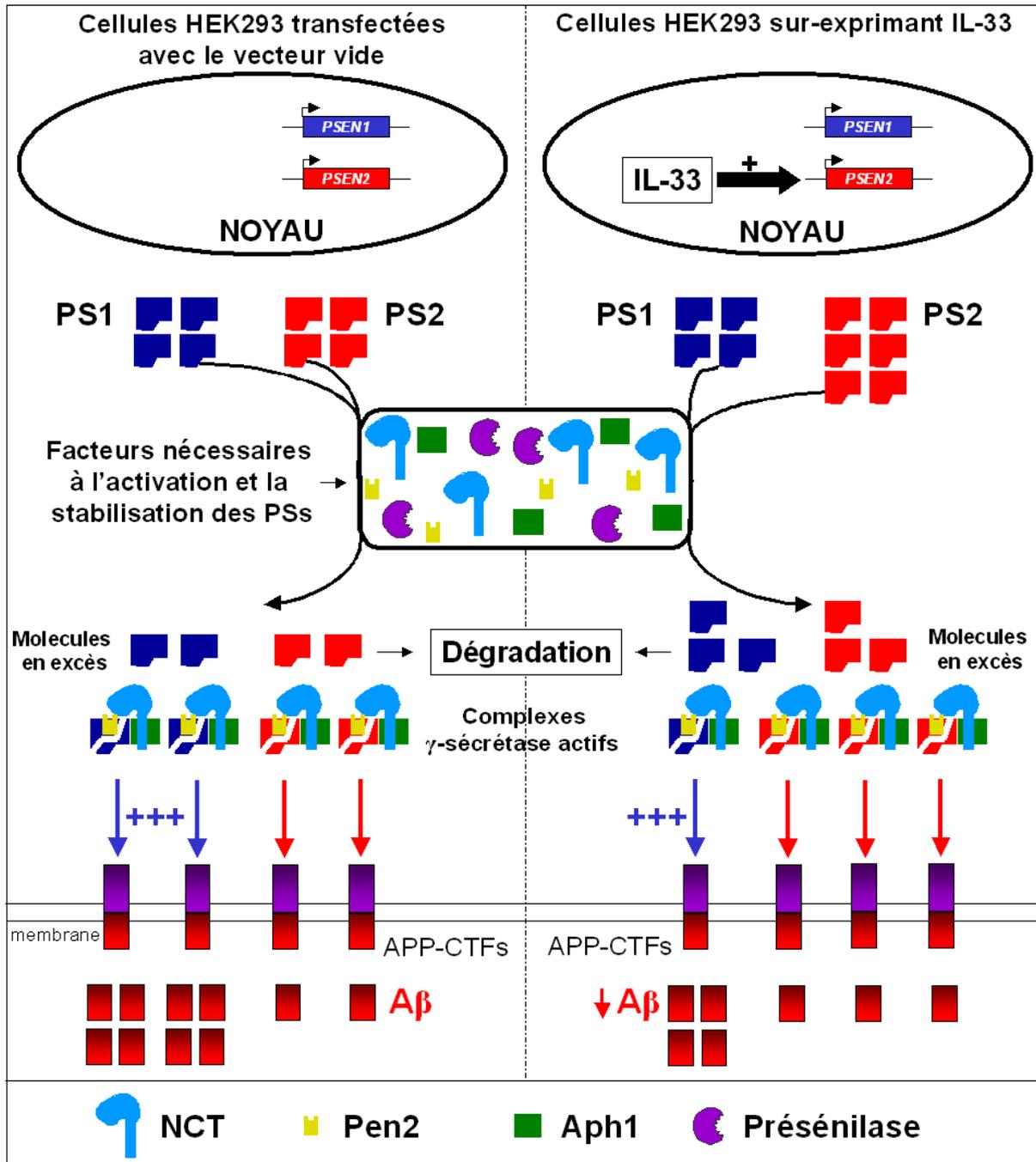


Figure 35 : Hypothèse expliquant en quoi la sur-expression de la PS2 induite par IL-33 entraîne une diminution de la sécrétion d'A β (schéma simplifié).

Nous avons ensuite cherché à comprendre pourquoi l'augmentation de l'expression de la PS2 n'affectait que la production d'A β ₁₋₄₀. Des études ont montré que les PS 1 et 2 n'agissaient pas de la même manière sur les clivages séquentiels de la γ -sécrétase qui sont à l'origine de la génération d'A β ₁₋₄₀ ou d'A β ₁₋₄₂ [Pintchovski *et al.* 2012], ce qui peut ainsi expliquer la diminution préférentielle de la sécrétion d'A β ₁₋₄₀. Il a été observé que les complexes contenant la PS1 produisaient plus de formes A β ₁₋₄₂ que les complexes contenant la PS2 [Lee *et al.* 2011]. Cependant, dans ce cas, une augmentation de l'expression de la PS2 affecterait plus particulièrement la production d'A β ₁₋₄₂ en entraînant une diminution de l'activité γ -sécrétase portée par la PS1. Les mécanismes expliquant le fait qu'IL-33 diminuerait préférentiellement la production d'A β ₁₋₄₀ restent donc encore à élucider.

1.3 Effet d'IL-33 au niveau de l'endothélium vasculaire cérébral

L'effet d'IL-33 sur la sécrétion d'A β ₁₋₄₀ pourrait être plus important au niveau de l'endothélium vasculaire cérébral. En effet, au laboratoire, l'expression IL-33 a été retrouvée comme étant restreinte à l'endothélium vasculaire cérébral [Chapuis *et al.* 2009]. L'AAC est associée à un dépôt d'A β dans les vaisseaux sanguins cérébraux, celui-ci étant principalement composé d'A β ₁₋₄₀. IL-33 pourrait donc avoir un effet protecteur sur cette affection en diminuant la production d'A β ₁₋₄₀. Or, il a été observé que l'A β pouvait être sécrété par les CML et par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins cérébraux [Schweinzer *et al.* 2011 ; Frackowiak *et al.* 2009]. Au laboratoire, nous avons également observé qu'IL-33 était sous-exprimé dans le cerveau des malades par rapport aux témoins [Chapuis *et al.* 2009]. Ainsi, une diminution de l'expression d'IL-33 diminuerait son effet la régulation de l'expression des gènes et donc sur l'expression de la PS2, diminuant alors la proportion de PS2 active par rapport à la PS1. Cela entraînerait alors une augmentation de l'activité γ -sécrétase portée par la PS1 et une diminution de l'activité γ -sécrétase portée par la PS2, ce qui aboutirait alors à un clivage plus important de l'APP et à une augmentation de la production d'A β . Il y aurait donc une plus grande quantité d'A β ₁₋₄₀ sécrétée par les cellules endothéliales chez les patients atteints de la MA, ce qui aboutirait à une augmentation de son dépôt dans la paroi des vaisseaux sanguins cérébraux et une AAC plus sévère (Figure 36). Il a d'ailleurs été observé que des polymorphismes localisés dans le gène IL-33 étaient associés à la MA chez les

individus non porteurs de l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE* [Chapuis *et al.* 2009], ce qui semble appuyer l'hypothèse selon laquelle IL-33 pourrait avoir un impact sur l'AAC.

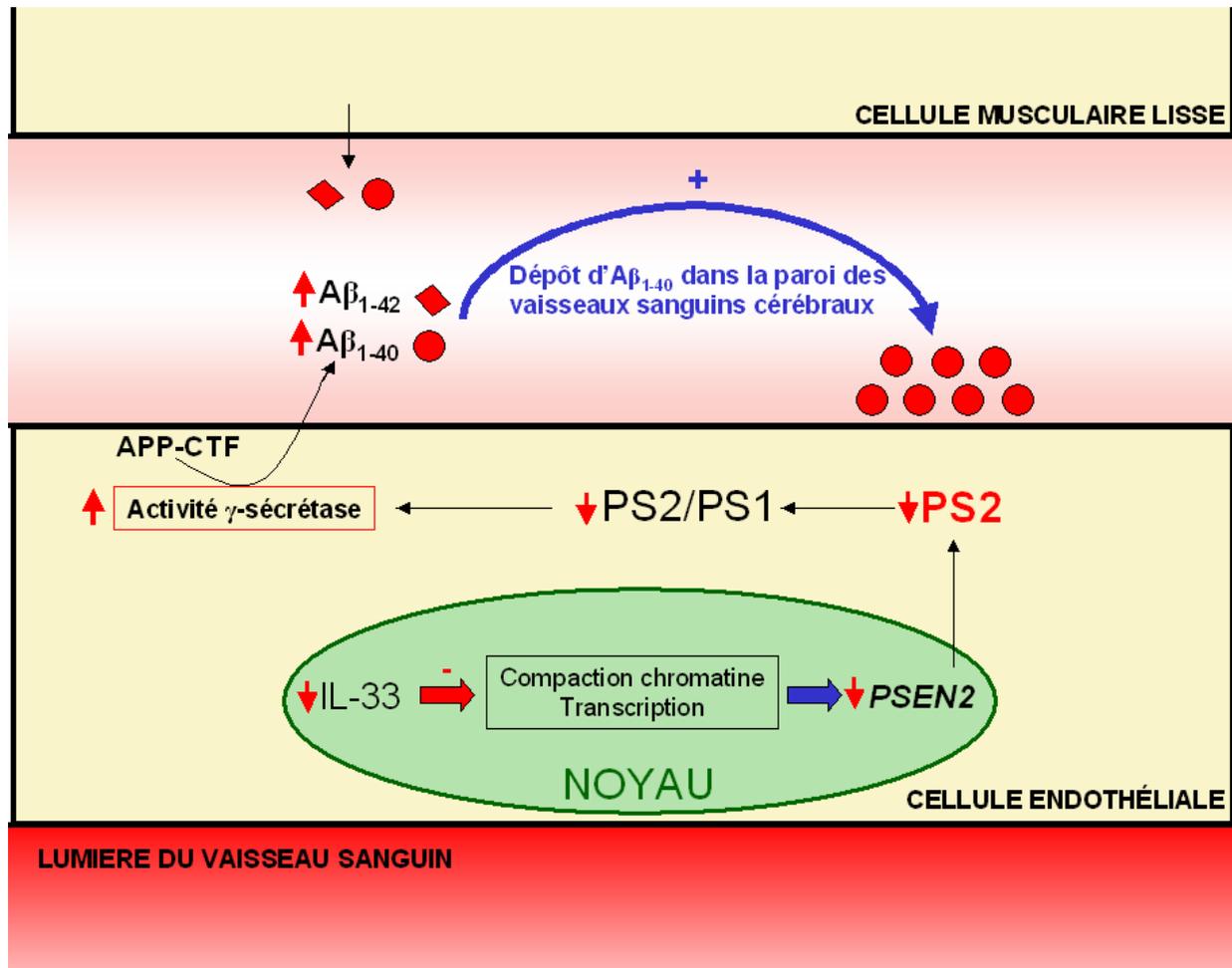


Figure 36 : Schéma résumant l'hypothèse de l'effet de la diminution de l'expression d'IL-33 chez les patients atteints de la MA sur le métabolisme de l'APP et sur l'AAC.

Il serait donc intéressant d'étudier l'effet d'IL-33 sur la sécrétion d' $A\beta_{1-40}$ dans des cellules endothéliales. Il existe des lignées de cellules endothéliales qui expriment IL-33 de manière endogène (HEVECs pour High Endothelial Venules Endothelial Cells). Nous pourrions alors comparer l'expression des gènes entre des cellules HEVECs exprimant *IL-33* de manière endogène et des cellules HEVECs dans lesquelles l'expression d'*IL-33* aurait été inhibée par un ARN interférent. Cependant, comme il a été décrit précédemment, il suffit d'une faible expression d'*IL-33* pour que cela entraîne une modulation de l'expression des gènes. En effet, la variation de l'expression des gènes n'était plus observée entre les cellules HEK293 sur-exprimant IL-33 et ces mêmes cellules transfectées avec le vecteur vide si celles-ci exprimaient *IL-33*, même faiblement, de manière endogène. Ainsi, nous ne

pouvons pas utiliser un ARN interférant dirigé contre IL-33 dans les cellules endothéliales pour que cela corresponde à la condition sans expression d'IL-33. En effet, cette technique ne permet pas d'inhiber totalement l'expression d'une protéine et nous rencontrerions alors le même problème qu'avec les cellules HEK293. Cependant, des souris KO pour le gène *IL-33* ont été mises au point [Oboki *et al.* 2010] et il serait possible de croiser ces souris avec des souris sur-exprimant l'APP et ainsi de comparer l'expression des gènes dans des cellules endothéliales de souris KO pour *IL-33* et de souris exprimant *IL-33*. Des analyses du métabolisme de l'APP pourraient également être mises au point à partir de ces cellules. De plus, des analyses *in vivo* permettraient de mieux évaluer les effets d'IL-33 sur la physiopathologie de la MA, et plus particulièrement au niveau des lésions vasculaires.

2) Implication de BIN1 dans la physiopathologie de la MA

2.1 Implication de BIN1 dans le dysfonctionnement synaptique observé dans la MA

BIN1, tout comme l'amphiphysine 1, possède un rôle essentiel dans l'endocytose au niveau des terminaisons nerveuses (voir introduction paragraphe 6.2.3.2). Au niveau des synapses, l'endocytose est impliquée dans le recyclage vésiculaire, un mécanisme nécessaire au maintien de la transmission synaptique [Sudhof 2004 ; Kavalali 2007]. Cet impact de BIN1 sur la transmission synaptique semblerait être régulé par différents mécanismes, par analogie avec ce qui est connu pour l'amphiphysine 1.

Tout d'abord, il a été observé que la phosphorylation de l'amphiphysine 1 par Cdk5 inhiberait son interaction à la membrane qui est nécessaire à l'endocytose [Liang *et al.* 2007]. La phosphorylation de Cdk5 a lieu sur le domaine riche en prolines de l'amphiphysine 1, qui est fortement homologue avec celui de BIN1, ce qui suggère que cette phosphorylation peut également altérer la fonction de BIN1. Cette phosphorylation pourrait également entraîner une altération de l'interaction des amphiphysines entre elles ou avec d'autres protéines impliquées dans l'endocytose. Il a également été observé que BIN1 pouvait agir comme un régulateur de l'activité de Cdk5 de par son interaction avec le facteur c-Abl (voir Introduction paragraphe 6.2.3.5). Ainsi, BIN1 pourrait intervenir dans les fonctions synaptiques en régulant l'activité de Cdk5.

D'autres études ont indiqué que l'amphiphysine 1 pouvait être clivée par la calpaïne et que cela entraînait une inhibition de l'endocytose des vésicules [Wu *et al.* 2007]. L'amphiphysine ainsi clivée ne pourrait plus se fixer à la dynamine et former la structure en forme d'anneau nécessaire à l'endocytose, ce qui inhiberait la transmission synaptique. Des sites de clivage ont été identifiés dans le domaine CLAP de l'amphiphysine 1, fortement homologue avec celui de BIN1, ce qui suggère que BIN1 pourrait également être clivé par la calpaïne.

Ainsi, la phosphorylation par Cdk5 et le clivage par la calpaïne sont deux mécanismes permettant de réguler l'endocytose en inhibant les fonctions de l'amphiphysine 1 et potentiellement de BIN1. Or, une augmentation de l'activité de Cdk5 et de l'activité de la calpaïne est observée dans la MA [Cheung *et al.* 2012 ; Wu *et al.* 2004]. BIN1 pourrait donc être impliquée dans le dysfonctionnement synaptique observé dans la MA de par son inactivation par Cdk5 et la calpaïne. Nous avons

alors cherché à établir un lien entre BIN1 et les mécanismes physiopathologiques de la MA impliqués dans la toxicité au niveau des synapses.

2.2 Lien entre BIN1 et la toxicité de l'A β

Des études ont montré que l'A β entraînait une activation de la calpaïne [Kelly *et al.* 2006] et de Cdk5 [Lopes *et al.* 2010] dans les neurones hippocampiques de par son effet sur le maintien de l'influx de calcium médié par les récepteurs au NMDA. Une perturbation de l'homéostasie calcique est en effet proposée comme étant impliquée dans la pathogénèse de la MA [Marambaud *et al.* 2009]. De plus, il a été observé que l'A β entraînait une altération du recyclage vésiculaire en affectant l'endocytose dans les neurones hippocampiques [Kelly *et al.* 2007]. Ainsi, l'A β , en activant Cdk5 et la calpaïne, pourrait induire l'inhibition de la fonction de l'amphiphysine 1 et de BIN1, perturbant alors l'endocytose. En effet, des études ont montré que l'A β , en activant la calpaïne, pouvait induire une dégradation de la dynamine et également une accumulation anormale de l'amphiphysine sous sa forme tronquée à la membrane [Kelly *et al.* 2006]. L'activation de la calpaïne par l'A β pourrait donc également entraîner le clivage de BIN1 et ainsi altérer l'endocytose et le recyclage vésiculaire. Les mêmes conséquences pourraient être observées suite à une phosphorylation massive de BIN1 par Cdk5 induite par l'A β . De nombreuses études ont montré que les formes solubles d'A β étaient particulièrement toxiques pour les synapses (voir Introduction, paragraphe 3.2.2). Cette toxicité pourrait alors être médiée par une altération de la fonction de l'amphiphysine et potentiellement de la fonction de BIN1 qui serait consécutive à leur phosphorylation par Cdk5 ou leur clivage par la calpaïne, ce qui aboutirait à une altération de l'endocytose et par conséquent de la transmission synaptique.

Afin de vérifier ces hypothèses, nous prévoyons de traiter des cultures primaires de neurones ou des cultures de cellules différenciées avec de l'A β et d'étudier si cela provoque bien une altération de la fonction de BIN1 en étudiant sa phosphorylation, son interaction avec les protéines impliquées dans l'endocytose et en vérifiant s'il y a production de formes tronquées.

Nous avons donc pu établir un lien possible entre BIN1 et la toxicité médiée par l'A β au niveau de la synapse. Cependant, nos analyses nous ont également révélé un lien entre BIN1 et Tau. En effet, les analyses effectuées sur les modèles de

drosophiles ont indiqué que BIN1 était impliqué dans la toxicité médiée par Tau, l'inhibition de l'expression d'un homologue de BIN1 suffisant à diminuer la toxicité induite par Tau dans ces modèles. Nous avons donc cherché à comprendre de quelle manière BIN1 pouvait être impliquée dans ce mécanisme.

2.3 Lien entre BIN1 et la toxicité médiée par Tau

La première hypothèse émise est que BIN1 pourrait avoir un impact sur la phosphorylation de Tau de par son effet activateur sur la kinase Cdk5 (voir introduction paragraphe 6.2.3.5). Cette kinase est en effet reconnue comme étant impliquée dans la phosphorylation pathogénique de Tau (voir introduction paragraphe 3.3.3.3). BIN1 pourrait donc augmenter la phosphorylation de Tau et augmenter son détachement des microtubules ainsi que son agrégation.

Nous avons observé que la toxicité de Tau dans les modèles de drosophiles passait par une toxicité synaptique. BIN1 étant localisée à la synapse, la protéine pourrait alors avoir un lien avec la toxicité de Tau au niveau synaptique. En effet, les études dans des modèles de drosophiles ont révélé une implication de la calpaïne dans la toxicité médiée par Tau [Reinecke *et al.* 2011]. Il a été observé que Tau pouvait, tout comme BIN1, être clivée par la calpaïne, entraînant la génération d'une forme tronquée potentiellement neurotoxique [Nicholson *et al.* 2009]. Cette forme tronquée de Tau pourrait alors s'agréger plus rapidement que la forme complète comme ce qui est observé pour la forme tronquée produite par un clivage par la caspase 3 [Gamblin *et al.* 2003]. Nous pouvons également émettre l'hypothèse selon laquelle, tout comme la forme tronquée de BIN1, la forme tronquée de Tau pourrait s'accumuler de façon anormale à la membrane et perturber l'endocytose. Lors de nos analyses, nous avons observé une interaction directe entre BIN1 et Tau. La partie C-terminale tronquée de BIN1 ou la protéine phosphorylée inactive pourraient alors interagir avec Tau et altérer son rôle physiologique ainsi qu'augmenter son agrégation. De plus, dans la MA, une altération de la dégradation des protéines est observée [Checler *et al.* 2000], ce qui expliquerait l'accumulation de ces formes toxiques. Ces différentes observations indiquent donc que BIN1 pourrait être un lien entre l'A β et la neurotoxicité médiée par Tau.

L'interaction de BIN1 avec Tau va être étudiée plus en détail par des techniques de résonance magnétique nucléaire (RMN). Nous projetons également

d'induire l'endocytose dans des modèles cellulaires et de voir si BIN1 interagit avec Tau dans ce mécanisme. Enfin, il est prévu d'inactiver différents gènes tels que Cdk5 ou la calpaïne dans les modèles de drosophiles afin de mieux comprendre l'implication des différents acteurs évoqués sur la neurotoxicité médiée par Tau. Des analyses pourront également être effectuées par la suite dans des modèles murins. Il est en effet prévu d'utiliser un modèle de souris transgéniques sur-exprimant l'isoforme neuronale principale de BIN1 (BIN1^{neu}) de façon conditionnelle dans le tissu cérébral (Taconic, New-York). Les souris Camk2Cre/stop^f-BIN1^{neu} seront croisées avec le modèle triple transgénique (3xTg-AD) sur-exprimant les formes humaines mutées PS1_{M146V}, APP_{swe} et Tau_{P301L} [Oddo *et al.* 2003]. Ces souris triple transgéniques présentent une accumulation intra et extra-neuronale d'Aβ, une altération des fonctions synaptiques et des protéines Tau présentant les phosphorylations pathogènes observées dans la MA. Elles représentent alors un modèle adapté pour étudier l'effet de BIN1 sur la toxicité synaptique.

L'hypothèse issue de nos résultats et des recherches bibliographiques stipule donc que l'Aβ entraînerait un influx de calcium au niveau des synapses qui, entraînant l'activation de la calpaïne et de Cdk5, provoquerait une altération de la fonction de BIN1 par sa phosphorylation et la génération de formes tronquées de la protéine, ce qui entraînerait une toxicité synaptique induite par une altération de l'endocytose et donc du recyclage vésiculaire (Figure 37).

Nous pouvons alors supposer que l'augmentation de l'expression de *BIN1* observée dans le cerveau des patients lors de nos analyses pourrait être un mécanisme compensatoire à cette altération de l'activité de BIN1 induite par l'Aβ. L'augmentation de l'expression de *BIN1* serait alors provoquée par la fixation de certains facteurs au niveau de polymorphismes fonctionnels situés en amont du gène *BIN1*, comme par exemple sur l'allèle insertion du polymorphisme rs59335482. Il s'avère donc important de pouvoir identifier ces facteurs. Cependant, les protéines BIN1 ainsi produites seraient à leur tour phosphorylées ou tronquées par Cdk5 ou la calpaïne. Ainsi, cette augmentation de l'expression de *BIN1* ne permettrait pas de compenser la diminution initiale de l'activité de BIN1 au niveau des synapses mais entraînerait une augmentation de la production de formes phosphorylées ou tronquées inactives et potentiellement toxiques. Ce mécanisme au départ compensatoire deviendrait donc délétère.

Ces formes inactives de BIN1 pourraient alors interagir avec Tau et faire le lien entre l'A β et la toxicité médiée par Tau. Plusieurs hypothèses sont avancées à ce sujet, telle qu'une altération du rôle physiologique de Tau de par son interaction avec une forme inactive de BIN1 qui pourrait soit entraîner une modulation de la stabilité des microtubules, soit affecter l'agrégation de Tau ou encore l'hypothèse d'une modulation de la phosphorylation de Tau par BIN1 (Figure 36).

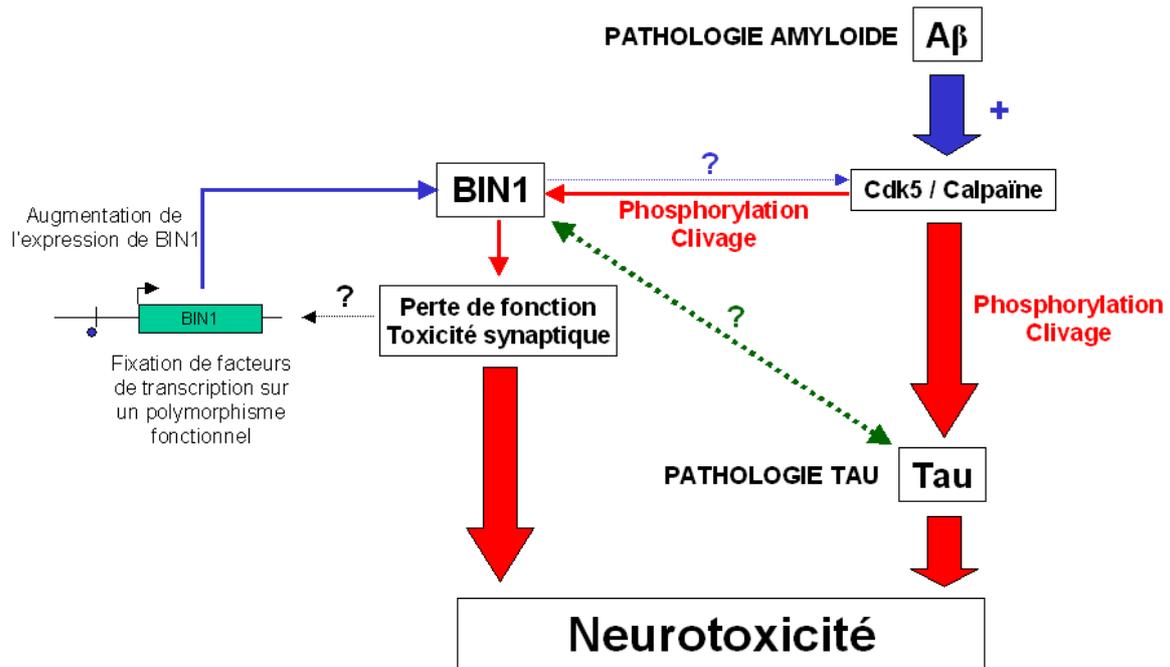


Figure 37 : Schéma résumant l'hypothèse de l'implication de BIN1 dans la physiopathologie de la MA d'après les résultats obtenus et les données bibliographiques.

CONCLUSION

Nos travaux ont permis d'approfondir les résultats issus des analyses transcriptomiques et génomiques en cherchant à étudier plus en détail l'implication des facteurs trouvés lors de ces analyses dans les mécanismes physiopathologiques intervenant dans la MA. Les analyses GWAS ont permis une grande avancée dans l'étude du déterminisme génétique de la MA. Les analyses transcriptomiques ont également une grande importance car elles permettent d'identifier des gènes modulés dans la MA qui pourront aider au diagnostic de la maladie ou à l'élaboration des cibles thérapeutiques et surtout à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la MA. Nous avons par exemple observé que BIN1 semblerait faire le lien entre l'augmentation de la sécrétion d'A β et la pathologie Tau, ce qui permettrait d'apporter de nouveaux éléments dans l'hypothèse de la cascade amyloïde et l'élaboration de stratégies thérapeutiques visant à limiter l'effet toxique de l'A β . La protéine IL-33, intervenant dans de nombreux processus physiopathologiques, semblerait quant à elle agir sur la pathologie A β , notamment au niveau de sa composante vasculaire. Nous avons également étudié en détail, à travers les deux gènes retrouvés lors des analyses, l'importance de la régulation de la transcription dans la MA.

Les analyses génomiques apportent donc des bases à la fois pour déterminer des facteurs de susceptibilité de la maladie permettant d'améliorer le diagnostic qui est un point crucial pour optimiser le traitement des malades mais également pour mieux comprendre la maladie et aboutir à des cibles thérapeutiques potentielles. Il est cependant nécessaire d'étudier en détail les effets des différents facteurs identifiés lors de ces analyses, aussi bien au niveau moléculaire, cellulaire que *in vivo*. Un nombre très varié d'approches a alors été développé au laboratoire afin de comprendre au mieux l'implication de ces facteurs dans la MA. L'objectif est alors d'effectuer le même travail sur tous les déterminants génétiques retrouvés lors des analyses de GWAS. Dans ce contexte, un laboratoire d'excellence (LabEx) nommé DISTALZ (Développement de stratégies innovantes pour une approche transdisciplinaire de la maladie d'Alzheimer) regroupant sept unités de recherche dont la notre a été créé afin de caractériser au mieux les processus biologiques impliqués dans la MA suite aux résultats des analyses génomiques de par des approches transdisciplinaires.

REFERENCES

A

- Abdel RR, Alves S, Pantesco V, De Vos J, Michel B *et al.* Distinct transcriptome expression of the temporal cortex of the primate *Microcebus murinus* during brain aging versus Alzheimer's disease-like pathology. *PLoS One*. 2010; **5**: e12770.
- Abraha A, Ghoshal N, Gamblin TC, Cryns V, Berry RW *et al.* C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease. *J Cell Sci*. 2000; **113**: 3737-3745.
- Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2009; **361**: 2066-2078.
- Aguero-Torres H, Fratiglioni L, Guo Z, Viitanen M, Winblad B. Mortality from dementia in advanced age: a 5-year follow-up study of incident dementia cases. *J Clin Epidemiol*. 1999; **52**: 737-743.
- Al Bassam J, Ozer RS, Safer D, Halpain S, Milligan RA. MAP2 and tau bind longitudinally along the outer ridges of microtubule protofilaments. *J Cell Biol*. 2002; **157**: 1187-1196.
- Ali S, Huber M, Kollwe C, Bischoff SC, Falk W *et al.* IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007; **104**: 18660-18665.
- Ali S, Mohs A, Thomas M, Klare J, Ross R *et al.* The dual function cytokine IL-33 interacts with the transcription factor NF-kappaB to dampen NF-kappaB-stimulated gene transcription. *J Immunol*. 2011; **187**: 1609-1616.
- Alonso AD, Grundke-Iqbal I, Barra HS, Iqbal K. Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1997; **94**: 298-303.
- Alves-Filho JC, Sonogo F, Souto FO, Freitas A, Verri WA, Jr. *et al.* Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med*. 2010; **16**: 708-712.
- Andreadis A, Brown WM, Kosik KS. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry*. 1992; **31**: 10626-10633.
- Annaert WG, Esselens C, Baert V, Boeve C, Snellings G *et al.* Interaction with telencephalin and the amyloid precursor protein predicts a ring structure for presenilins. *Neuron*. 2001; **32**: 579-589.
- Anstey KJ, Lipnicki DM, Low LF. Cholesterol as a risk factor for dementia and cognitive decline: a systematic review of prospective studies with meta-analysis. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2008; **16**: 343-354.
- Aoki S, Hayakawa M, Ozaki H, Takezako N, Obata H *et al.* ST2 gene expression is proliferation-dependent and its ligand, IL-33, induces inflammatory reaction in endothelial cells. *Mol Cell Biochem*. 2010; **335**: 75-81.

Arango D, Cruets M, Torres O, Backhovens H, Serrano ML *et al.* Systematic genetic study of Alzheimer disease in Latin America: mutation frequencies of the amyloid beta precursor protein and presenilin genes in Colombia. *Am J Med Genet.* 2001; **103**: 138-143.

Araria-Goumidi L, Huguet JB, Lambert JC, Frigard B, Cotel D *et al.* No association of the -48CT polymorphism of the presenilin 1 gene with Alzheimer disease in a late-onset sporadic population. *J Neural Transm.* 2002; **109**: 1023-1027.

Arnold CS, Johnson GV, Cole RN, Dong DL, Lee M *et al.* The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem.* 1996; **271**: 28741-28744.

Attems J, Jellinger K, Thal DR, Van Nostrand W. Review: sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2011; **37**: 75-93.

Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2002; **103**: 26-35.

Avila J, Leon-Espinosa G, Garcia E, Garcia-Escudero V, Hernandez F *et al.* Tau Phosphorylation by GSK3 in Different Conditions. *Int J Alzheimers Dis.* 2012; **17**: 578373.

B

Bækkevold ES, Roussigne M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL *et al.* Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am J Pathol.* 2003; **163**: 69-79.

Bahmanyar S, Higgins GA, Goldgaber D, Lewis DA, Morrison JH *et al.* Localization of amyloid beta protein messenger RNA in brains from patients with Alzheimer's disease. *Science.* 1987; **237**: 77-80.

Bales KR. Brain lipid metabolism, apolipoprotein E and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* 2010; **59**: 295-302.

Bekris LM, Yu CE, Bird TD, Tsuang DW. Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 2010; **23**: 213-227.

Bell RD, Sagare AP, Friedman AE, Bedi GS, Holtzman DM *et al.* Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007; **27**: 909-918.

Bennett BD, Babu-Khan S, Loeloff R, Louis JC, Curran E *et al.* Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J Biol Chem.* 2000; **275**: 20647-20651.

Bensemam F, Hot D, Ferreira S, Dumont J, Bombois S *et al.* Evidence for induction of the ornithine transcarbamylase expression in Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry.* 2009; **14**: 106-116.

Bentahir M, Nyabi O, Verhamme J, Tolia A, Horre K *et al.* Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms. *J Neurochem.* 2006; **96**: 732-742.

Benton AL. Abbreviated versions of the Visual Retention Test. *J Psychol.* 1972; **80**: 189-192.

- Bernardi L, Geracitano S, Colao R, Puccio G, Gallo M *et al.* AbetaPP A713T mutation in late onset Alzheimer's disease with cerebrovascular lesions. *J Alzheimers Dis.* 2009; **17**: 383-389.
- Bertram L, Lange C, Mullin K, Parkinson M, Hsiao M *et al.* Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *Am J Hum Genet.* 2008; **83**: 623-632.
- Bertram L, Lill CM, Tanzi RE. The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron.* 2010; **68**: 270-281.
- Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet.* 2007; **39**: 17-23.
- Bertram L, Tanzi RE. The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest.* 2005; **115**: 1449-1457.
- Bertram L, Tanzi RE. Genome-wide association studies in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 2009; **18**: R137-R145.
- Beydoun MA, Beydoun HA, Wang Y. Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.* 2008; **9**: 204-218.
- Biernat J, Wu YZ, Timm T, Zheng-Fischhofer Q, Mandelkow E *et al.* Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity. *Mol Biol Cell.* 2002; **13**: 4013-4028.
- Biffi A, Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy: a systematic review. *J Clin Neurol.* 2011; **7**: 1-9.
- Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol.* 1985; **101**: 1371-1378.
- Bird TD. Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med.* 2008; **10**: 231-239.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL *et al.* A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature.* 1997; **385**: 729-733.
- Blacker D, Bertram L, Saunders AJ, Moscarillo TJ, Albert MS *et al.* Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's disease families. *Hum Mol Genet.* 2003; **12**: 23-32.
- Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A *et al.* Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* 2003; **22**: 5551-5560.
- Borg JP, Yang Y, Taddeo-Borg M, Margolis B, Turner RS. The X11alpha protein slows cellular amyloid precursor protein processing and reduces Abeta40 and Abeta42 secretion. *J Biol Chem.* 1998; **273**: 14761-14766.
- Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991; **82**: 239-259.
- Braak H, Del Tredici K, Schultz C, Braak E. Vulnerability of select neuronal types to Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; **924**: 53-61.

Brandt R, Lee G. Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro. *J Biol Chem.* 1993; **268**: 3414-3419.

Brandt R, Leger J, Lee G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol.* 1995; **131**: 1327-1340.

Brickell KL, Steinbart EJ, Rumbaugh M, Payami H, Schellenberg GD *et al.* Early-onset Alzheimer disease in families with late-onset Alzheimer disease: a potential important subtype of familial Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2006; **63**: 1307-1311.

Brouwers N, Sleegers K, Engelborghs S, Bogaerts V, Serneels S *et al.* Genetic risk and transcriptional variability of amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Brain.* 2006; **129**: 2984-2991.

Brouwers N, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update. *Ann Med.* 2008; **40**: 562-583.

Brugge KL, Nichols SL, Salmon DP, Hill LR, Delis DC *et al.* Cognitive impairment in adults with Down's syndrome: similarities to early cognitive changes in Alzheimer's disease. *Neurology.* 1994; **44**: 232-238.

Busciglio J, Lorenzo A, Yankner BA. Methodological variables in the assessment of beta amyloid neurotoxicity. *Neurobiol Aging.* 1992; **13**: 609-612.

Butler MH, David C, Ochoa GC, Freyberg Z, Daniell L *et al.* Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 1997; **137**: 1355-1367.

Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL *et al.* Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem.* 1998; **273** : 27765-27767.

C

Cabrejo L, Guyant-Marechal L, Laquerriere A, Vercelletto M, De la FF *et al.* Phenotype associated with APP duplication in five families. *Brain.* 2006; **129** : 2966-2976.

Cacabelos R. Genomic characterization of Alzheimer's disease and genotype-related phenotypic analysis of biological markers in dementia. *Pharmacogenomics.* 2004; **5**: 1049-1105.

Cai D, Netzer WJ, Zhong M, Lin Y, Du G *et al.* Presenilin-1 uses phospholipase D1 as a negative regulator of beta-amyloid formation. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 2006; **103**: 1941-1946.

Campion D, Brice A, Dumanchin C, Puel M, Baulac M *et al.* A novel presenilin 1 mutation resulting in familial Alzheimer's disease with an onset age of 29 years. *Neuroreport.* 1996; **7**: 1582-1584.

Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S *et al.* Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet.* 1999; **65**: 664-670.

- Campion D, Hannequin D. [APP duplication causes autosomal dominant Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy]. *Med Sci (Paris)*. 2006; **22**: 468-469.
- Cantara S, Donnini S, Morbidelli L, Giachetti A, Schulz R *et al*. Physiological levels of amyloid peptides stimulate the angiogenic response through FGF-2. *FASEB J*. 2004; **18**: 1943-1945.
- Capell A, Kaether C, Edbauer D, Shirotani K, Merkl S *et al*. Nicastrin interacts with gamma-secretase complex components via the N-terminal part of its transmembrane domain. *J Biol Chem*. 2003; **278**: 52519-52523.
- Caporaso GL, Takei K, Gandy SE, Matteoli M, Mundigl O *et al*. Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *J Neurosci*. 1994; **14**: 3122-3138.
- Carey RM, Balcz BA, Lopez-Coviella I, Slack BE. Inhibition of dynamin-dependent endocytosis increases shedding of the amyloid precursor protein ectodomain and reduces generation of amyloid beta protein. *BMC Cell Biol*. 2005; **6**: 30.
- Carrasquillo MM, Zou F, Pankratz VS, Wilcox SL, Ma L *et al*. Genetic variation in PCDH11X is associated with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009; **41**: 192-198.
- Carriere V, Roussel L, Ortega N, Lacorre DA, Americh L *et al*. IL-33, the IL-1-like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007; **104**: 282-287.
- Carson JA, Turner AJ. Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases? *J Neurochem*. 2002; **81**: 1-8.
- Carter DA, Desmarais E, Bellis M, Campion D, Clerget-Darpoux F *et al*. More missense in amyloid gene. *Nat Genet*. 1992; **2**: 255-256.
- Casal E, Federici L, Zhang W, Fernandez-Recio J, Priego EM *et al*. The crystal structure of the BAR domain from human Bin1/amphiphysin II and its implications for molecular recognition. *Biochemistry*. 2006; **45**: 12917-12928.
- Cayrol C, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2009; **106**: 9021-9026.
- Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S *et al*. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol*. 2007; **179**: 2551-2555.
- Chandu D, Huppert SS, Kopan R. Analysis of transmembrane domain mutants is consistent with sequential cleavage of Notch by gamma-secretase. *J Neurochem*. 2006; **96**: 228-235.
- Chapuis J, Hot D, Hansmannel F, Kerdraon O, Ferreira S *et al*. Transcriptomic and genetic studies identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2009; **14**: 1004-1016.
- Charidimou A, Gang Q, Werring DJ. Sporadic cerebral amyloid angiopathy revisited: recent insights into pathophysiology and clinical spectrum. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012; **83**: 124-137.

- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D *et al.* Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature*. 1991; **353**: 844-846.
- Chavez-Gutierrez L, Tolia A, Maes E, Li T, Wong PC *et al.* Glu(332) in the Nicastrin ectodomain is essential for gamma-secretase complex maturation but not for its activity. *J Biol Chem*. 2008; **283**: 20096-20105.
- Checler F, da Costa CA, Ancolio K, Chevallier N, Lopez-Perez E *et al.* Role of the proteasome in Alzheimer's disease. *Biochim.Biophys.Acta*. 2000; **1502**: 133-138.
- Chen CD, Oh SY, Hinman JD, Abraham CR. Visualization of APP dimerization and APP-Notch2 heterodimerization in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *J Neurochem*. 2006; **97**: 30-43.
- Chen J, Kanai Y, Cowan NJ, Hirokawa N. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*. 1992; **360**: 674-677.
- Chen JH, Lin KP, Chen YC. Risk factors for dementia. *J Formos.Med Assoc*. 2009; **108**: 754-764.
- Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol*. 2007; **25**: 1329-1333.
- Chen Y, Deng L, Maeno-Hikichi Y, Lai M, Chang S *et al.* Formation of an endophilin-Ca²⁺ channel complex is critical for clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Cell*. 2003; **115**: 37-48.
- Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; **121**: 1484-1490.
- Chesneau L, Dupre S, Burdina A, Roger J, Le Panse S *et al.* Gyp5p and Gyl1p are involved in the control of polarized exocytosis in budding yeast. *J Cell Sci*. 2004; **117**: 4757-4767.
- Cheung ZH, Ip NY. Cdk5: a multifaceted kinase in neurodegenerative diseases. *Trends Cell Biol*. 2012; **22**: 169-175.
- Cho JH, Johnson GV. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding. *J Biol Chem*. 2003; **278**: 187-193.
- Chodaparambil JV, Barbera AJ, Lu X, Kaye KM, Hansen JC *et al.* A charged and contoured surface on the nucleosome regulates chromatin compaction. *Nat Struct.Mol Biol*. 2007; **14**: 1105-1107.
- Choi YS, Choi HJ, Min JK, Pyun BJ, Maeng YS *et al.* Interleukin-33 induces angiogenesis and vascular permeability through ST2/TRAF6-mediated endothelial nitric oxide production. *Blood*. 2009; **114**: 3117-3126.
- Chu DS, Pishvaei B, Payne GS. The light chain subunit is required for clathrin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1996; **271**: 33123-33130.
- Chyung JH, Selkoe DJ. Inhibition of receptor-mediated endocytosis demonstrates generation of amyloid beta-protein at the cell surface. *J Biol Chem*. 2003; **278**: 51035-51043.

Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA *et al.* Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci.* 2005; **8**: 79-84.

Clough RL, Dermentzaki G, Stefanis L. Functional dissection of the alpha-synuclein promoter: transcriptional regulation by ZSCAN21 and ZNF219. *J Neurochem.* 2009; **110**: 1479-1490.

Cohen P. Classification of protein-serine/threonine phosphatases: identification and quantitation in cell extracts. *Methods Enzymol.* 1991; **201**: 389-398.

Colwill K, Field D, Moore L, Friesen J, Andrews B. In vivo analysis of the domains of yeast Rvs167p suggests Rvs167p function is mediated through multiple protein interactions. *Genetics.* 1999; **152**: 881-893.

Cooper-Knock J, Kirby J, Ferraiuolo L, Heath PR, Rattray M *et al.* Gene expression profiling in human neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol.* 2012; **8**: 518-530.

Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE *et al.* Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet.* 1994; **7**: 180-184.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC *et al.* Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 1993; **261**: 921-923.

Corral-Debrinski M, Belgareh N, Blugeon C, Claros MG, Doye V *et al.* Overexpression of yeast karyopherin Pse1p/Kap121p stimulates the mitochondrial import of hydrophobic proteins in vivo. *Mol Microbiol.* 1999; **31**: 1499-1511.

Crespo-Biel N, Theunis C, Van Leuven F. Protein tau: prime cause of synaptic and neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis.* 2012; **2012**: 251426.

Cruts M, Backhovens H, Wang SY, Van Gassen G, Theuns J *et al.* Molecular genetic analysis of familial early-onset Alzheimer's disease linked to chromosome 14q24.3. *Hum Mol Genet.* 1995; **4**: 2363-2371.

Cruts M, Dermaut B, Rademakers R, Van den BM, Stogbauer F *et al.* Novel APP mutation V715A associated with presenile Alzheimer's disease in a German family. *J Neurol.* 2003; **250**: 1374-1375.

Cruts M, Van Broeckhoven C. Presenilin mutations in Alzheimer's disease. *Hum Mutat.* 1998; **11**: 183-190.

Crystal AS, Morais VA, Pierson TC, Pijak DS, Carlin D *et al.* Membrane topology of gamma-secretase component PEN-2. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 20117-20123.

Curtis D, North BV, Sham PC. A novel method of two-locus linkage analysis applied to a genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Ann Hum Genet.* 2001; **65**: 473-481.

D

Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S *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.* 1999; **90**: 1-13.

- De Jonghe C, Esselens C, Kumar-Singh S, Craessaerts K, Serneels S *et al.* Pathogenic APP mutations near the gamma-secretase cleavage site differentially affect Abeta secretion and APP C-terminal fragment stability. *Hum Mol Genet.* 2001; **10**: 1665-1671.
- De Strooper B, Annaert W. Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease. *Annu.Rev Cell Dev.Biol.* 2010; **26**: 235-260.
- De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K *et al.* A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature.* 1999; **398**: 518-522.
- De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G *et al.* Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature.* 1998; **391**: 387-390.
- Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S *et al.* apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest.* 2008; **118**: 4002-4013.
- Delacourte A, Buee L. Normal and pathological Tau proteins as factors for microtubule assembly. *Int Rev Cytol.* 1997; **171**: 167-224.
- Di Fede G, Catania M, Morbin M, Giaccone G, Moro ML *et al.* Good gene, bad gene: New APP variant may be both. *Prog.Neurobiol.* 2012; **99(3)**: 281-292
- Di Fede G, Catania M, Morbin M, Rossi G, Suardi S *et al.* A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science.* 2009; **323**: 1473-1477.
- Dessi F, Colle MA, Hauw JJ, Duyckaerts C. Accumulation of SNAP-25 immunoreactive material in axons of Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 1997; **8**: 3685-3689.
- Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 2003; **116**: 1175-1186.
- Dotti CG, De Strooper B. Alzheimer's dementia by circulation disorders: when trees hide the forest. *Nat Cell Biol.* 2009; **11**: 114-116.
- Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell.* 1992; **3**: 1141-1154.
- Drewes G, Trinczek B, Illenberger S, Biernat J, Schmitt-Ulms G *et al.* Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J Biol Chem.* 1995; **270**: 7679-7688.
- Du J, Chang J, Guo S, Zhang Q, Wang Z. ApoE 4 reduces the expression of Abeta degrading enzyme IDE by activating the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 2009; **464**: 140-145.
- Dubois B, Feldman HH, Jacova C, Dekosky ST, Barberger-Gateau P *et al.* Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol.* 2007; **6**: 734-746.
- Duron E, Hanon O. Hypertension, cognitive decline and dementia. *Arch Cardiovasc Dis.* 2008; **101**: 181-189.

E

Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med.* 2008; **29**: 258-289.

Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol.* 2003; **160**: 113-123.

Ekinci FJ, Malik KU, Shea TB. Activation of the L voltage-sensitive calcium channel by mitogen-activated protein (MAP) kinase following exposure of neuronal cells to beta-amyloid. MAP kinase mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J Biol Chem.* 1999; **274**: 30322-30327.

Esler WP, Kimberly WT, Ostaszewski BL, Ye W, Diehl TS *et al.* Activity-dependent isolation of the presenilin- gamma -secretase complex reveals nicastrin and a gamma substrate. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 2002; **99**: 2720-2725.

Espinassous Q, Garcia-de-Paco E, Garcia-Verdugo I, Synguelakis M, von Aulock S *et al.* IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. *J Immunol.* 2009; **183**: 1446-1455.

F

Farber SA, Nitsch RM, Schulz JG, Wurtman RJ. Regulated secretion of beta-amyloid precursor protein in rat brain. *J Neurosci.* 1995; **15**: 7442-7451.

Farrer LA, Bowirrat A, Friedland RP, Waraska K, Korczyn AD *et al.* Identification of multiple loci for Alzheimer disease in a consanguineous Israeli-Arab community. *Hum Mol Genet.* 2003; **12**: 415-422.

Farrer LA, Cupples LA, Haines JL, Hyman B, Kukull WA *et al.* Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA.* 1997; **278**: 1349-1356.

Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA *et al.* 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.* 2003; **100**: 4162-4167.

Farzan M, Schnitzler CE, Vasilieva N, Leung D, Choe H. BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 2000; **97**: 9712-9717.

Fassbender K, Masters C, Beyreuther K. Alzheimer's disease: molecular concepts and therapeutic targets. *Naturwissenschaften.* 2001; **88**: 261-267.

Feart C, Samieri C, Barberger-Gateau P. Mediterranean diet and cognitive function in older adults. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010; **13**: 14-18.

- Fernando P, Sandoz JS, Ding W, de Repentigny Y, Brunette S *et al.* Bin1 SRC homology 3 domain acts as a scaffold for myofiber sarcomere assembly. *J Biol Chem.* 2009; **284**: 27674-27686.
- Ferreira PC, Piai KA, Takayanagui AM, Segura-Munoz SI. Aluminum as a risk factor for Alzheimer's disease. *Rev Lat.Am Enfermagem.* 2008; **16**: 151-157.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L *et al.* Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet.* 2005; **366**: 2112-2117.
- Finckh U, Kuschel C, Anagnostouli M, Patsouris E, Pantos GV *et al.* Novel mutations and repeated findings of mutations in familial Alzheimer disease. *Neurogenetics.* 2005; **6**: 85-89.
- Fleming LM, Johnson GV. Modulation of the phosphorylation state of tau in situ: the roles of calcium and cyclic AMP. *Biochem J.* 1995; **309**: 41-47.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR. "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr.Res.* 1975; **12**: 189-198.
- Forsell C, Lannfelt L. Amyloid precursor protein mutation at codon 713 (Ala-->Val) does not cause schizophrenia: non-pathogenic variant found at codon 705 (silent). *Neurosci Lett.* 1995; **184**: 90-93.
- Frackowiak J, Potempska A, Mazur-Kolecka B. Formation of amyloid-beta oligomers in brain vascular smooth muscle cells transiently exposed to iron-induced oxidative stress. *Acta Neuropathol.* 2009; **117**: 557-567.
- Fraering PC, LaVoie MJ, Ye W, Ostaszewski BL, Kimberly WT *et al.* Detergent-dependent dissociation of active gamma-secretase reveals an interaction between Pen-2 and PS1-NTF and offers a model for subunit organization within the complex. *Biochemistry.* 2004; **43**: 323-333.
- Fraering PC, Ye W, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Selkoe DJ *et al.* gamma-Secretase substrate selectivity can be modulated directly via interaction with a nucleotide-binding site. *J Biol Chem.* 2005; **280**: 41987-41996.
- Francis R, McGrath G, Zhang J, Ruddy DA, Sym M *et al.* aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev.Cell.* 2002; **3**: 85-97.
- Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL *et al.* A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature.* 2007; **449**: 851-861.
- Fryer JD, Simmons K, Parsadanian M, Bales KR, Paul SM *et al.* Human apolipoprotein E4 alters the amyloid-beta 40:42 ratio and promotes the formation of cerebral amyloid angiopathy in an amyloid precursor protein transgenic model. *J Neurosci.* 2005; **25**: 2803-2810.
- Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC. Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2002; **59**: 1381-1389.
- Furihata S, Ito T, Kamatani N. Test of association between haplotypes and phenotypes in case-control studies: examination of validity of the application of an algorithm for samples from cohort or clinical trials to case-control samples using simulated and real data. *Genetics.* 2006; **174**: 1505-1516.

G

- Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S *et al.* Caspase cleavage of tau: linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 2003; **100**: 10032-10037.
- Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA *et al.* Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen.Psychiatry.* 2006; **63**: 168-174.
- Genin E, Hannequin D, Wallon D, Sleegers K, Hiltunen M *et al.* APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry.* 2011; **16**: 903-907.
- George-Hyslop PH, Tanzi RE, Polinsky RJ, Haines JL, Nee L *et al.* The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science.* 1987; **235**: 885-890.
- Ghosh S, Thakur MK. PS1 expression is downregulated by gonadal steroids in adult mouse brain. *Neurochem Res.* 2008; **33**: 365-369.
- Gillespie SL, Golde TE, Younkin SG. Secretory processing of the Alzheimer amyloid beta/A4 protein precursor is increased by protein phosphorylation. *Biochem Biophys.Res Commun.* 1992; **187**: 1285-1290.
- Glennner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys.Res Commun.* 1984a; **120**: 885-890.
- Glennner GG, Wong CW, Quaranta V, Eanes ED. The amyloid deposits in Alzheimer's disease: their nature and pathogenesis. *Appl.Pathol.* 1984b; **2**: 357-369.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F *et al.* Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature.* 1991; **349**: 704-706.
- Godfroid E, Octave JN. Glycosylation of the amyloid peptide precursor containing the Kunitz protease inhibitor domain improves the inhibition of trypsin. *Biochem Biophys.Res Commun.* 1990; **171**: 1015-1021.
- Goedert M, Jakes R, Crowther RA, Hasegawa M, Smith MJ *et al.* Intraneuronal filamentous tau protein and alpha-synuclein deposits in neurodegenerative diseases. *Biochem Soc Trans.* 1998; **26**: 463-471.
- Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron.* 1992; **8**: 159-168.
- Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J.* 1989; **8**: 393-399.
- Golde TE, Estus S, Usiak M, Younkin LH, Younkin SG. Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron.* 1990; **4**: 253-267.
- Gomez RM, Rosso OA, Berretta R, Moscato P. Uncovering molecular biomarkers that correlate cognitive decline with the changes of hippocampus' gene expression profiles in Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2010; **5**: e10153.

- Gong CX, Shaikh S, Wang JZ, Zaidi T, Grundke-Iqbal I *et al.* Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated tau: decrease in Alzheimer disease brain. *J Neurochem.* 1995; **65**: 732-738.
- Gordon D, Haynes C, Finch SJ, Brown AM. Increase in linkage information by stratification of pedigree data into gold-standard and standard diagnoses: application to the NIMH Alzheimer Disease Genetics Initiative Dataset. *Hum Hered.* 2006; **61**: 97-103.
- Gotz J, Schild A, Hoerndli F, Pennanen L. Amyloid-induced neurofibrillary tangle formation in Alzheimer's disease: insight from transgenic mouse and tissue-culture models. *Int J Dev. Neurosci.* 2004; **22**: 453-465.
- Goutte C. Genetics leads the way to the accomplices of presenilins. *Dev. Cell.* 2002; **3**: 6-7.
- Grammas P, Sanchez A, Tripathy D, Luo E, Martinez J. Vascular signaling abnormalities in Alzheimer disease. *Cleve. Clin J Med.* 2011; **78 Suppl 1**: S50-S53.
- Gray S, Feinberg MW, Hull S, Kuo CT, Watanabe M *et al.* The Kruppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 34322-34328.
- Gray S, Wang B, Orihuela Y, Hong EG, Fisch S *et al.* Regulation of gluconeogenesis by Kruppel-like factor 15. *Cell Metab.* 2007; **5**: 305-312.
- Greenberg SM, Shin Y, Grabowski TJ, Cooper GE, Rebeck GW *et al.* Hemorrhagic stroke associated with the Iowa amyloid precursor protein mutation. *Neurology.* 2003; **60**: 1020-1022.
- Greenwood JA, Scott CW, Spreen RC, Caputo CB, Johnson GV. Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J Biol Chem.* 1994; **269**: 4373-4380.
- Gregoire SM, Charidimou A, Gadapa N, Dolan E, Antoun N *et al.* Acute ischaemic brain lesions in intracerebral haemorrhage: multicentre cross-sectional magnetic resonance imaging study. *Brain.* 2011; **134**: 2376-2386.
- Grober E, Buschke H, Crystal H, Bang S, Dresner R. Screening for dementia by memory testing. *Neurology.* 1988; **38**: 900-903.
- Gu Y, Oyama F, Ihara Y. Tau is widely expressed in rat tissues. *J Neurochem.* 1996; **67**: 1235-1244.
- Guerreiro RJ, Baquero M, Blesa R, Boada M, Bras JM *et al.* Genetic screening of Alzheimer's disease genes in Iberian and African samples yields novel mutations in presenilins and APP. *Neurobiol Aging.* 2010; **31**: 725-731.
- Gunawardena S, Goldstein LS. Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron.* 2001; **32**: 389-401.
- Gustke N, Trinczek B, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry.* 1994; **33**: 9511-9522.
- Guyant-Marechal L, Rovelet-Lecrux A, Goumidi L, Cousin E, Hannequin D *et al.* Variations in the APP gene promoter region and risk of Alzheimer disease. *Neurology.* 2007; **68**: 684-687.

H

- Haase C, Stieler JT, Arendt T, Holzer M. Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation. *J Neurochem.* 2004; **88**: 1509-1520.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A *et al.* Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature.* 1992; **359**: 322-325.
- Haglund M, Passant U, Sjobeck M, Ghebremedhin E, Englund E. Cerebral amyloid angiopathy and cortical microinfarcts as putative substrates of vascular dementia. *Int J Geriatr Psychiatry.* 2006; **21**: 681-687.
- Haltiwanger RS, Busby S, Grove K, Li S, Mason D *et al.* O-glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins: regulation analogous to phosphorylation? *Biochem Biophys.Res Commun.* 1997; **231**: 237-242.
- Hamdane M, Sambo AV, Delobel P, Begard S, Violleau A *et al.* Mitotic-like tau phosphorylation by p25-Cdk5 kinase complex. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 34026-34034.
- Halimi G, Duplan L, Bideau C, Iniesta D, Berthezene P *et al.* Association of APOE promoter but not A2M polymorphisms with risk of developing Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 2000; **11**: 3599-3601.
- Haraldsen G, Balogh J, Pollheimer J, Sponheim J, Kuchler AM. Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? *Trends Immunol.* 2009; **30**: 227-233.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002; **297**: 353-356.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 1992; **256**: 184-185.
- Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A *et al.* Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009; **41**: 1088-1093.
- Haroutunian V, Hoffman LB, Beeri MS. Is there a neuropathology difference between mild cognitive impairment and dementia? *Dialogues.Clin Neurosci.* 2009a; **11**: 171-179.
- Haroutunian V, Katsel P, Schmeidler J. Transcriptional vulnerability of brain regions in Alzheimer's disease and dementia. *Neurobiol Aging.* 2009b; **30**: 561-573.
- Harper JD, Lansbury PT, Jr. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu.Rev Biochem.* 1997; **66**: 385-407.
- Hart GW, Kreppel LK, Comer FI, Arnold CS, Snow DM *et al.* O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization. *Glycobiology.* 1996; **6**: 711-716.
- Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem.* 2007; **282**: 26369-26380.
- Hayakawa M, Hayakawa H, Matsuyama Y, Tamemoto H, Okazaki H *et al.* Mature interleukin-33 is produced by calpain-mediated cleavage in vivo. *Biochem Biophys.Res Commun.* 2009; **387**: 218-222.

- Hebert SS, Serneels L, Dejaegere T, Horre K, Dabrowski M *et al.* Coordinated and widespread expression of gamma-secretase in vivo: evidence for size and molecular heterogeneity. *Neurobiol Dis.* 2004; **17**: 260-272.
- Helmer C, Letenneur L, Rouch I, Richard-Harston S, Barberger-Gateau P *et al.* Occupation during life and risk of dementia in French elderly community residents. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001; **71**: 303-309.
- Henricson A, Kall L, Sonnhhammer EL. A novel transmembrane topology of presenilin based on reconciling experimental and computational evidence. *FEBS J.* 2005; **272**: 2727-2733.
- Herzig MC, Van Nostrand WE, Jucker M. Mechanism of cerebral beta-amyloid angiopathy: murine and cellular models. *Brain Pathol.* 2006; **16**: 40-54.
- Herzig MC, Winkler DT, Burgermeister P, Pfeifer M, Kohler E *et al.* Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci.* 2004; **7**: 954-960.
- Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert JC *et al.* Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2011; **43**: 429-435.
- Hou L, Zagorski MG. NMR reveals anomalous copper(II) binding to the amyloid Abeta peptide of Alzheimer's disease. *J Am Chem Soc.* 2006; **128**: 9260-9261.
- Howlett DR, Jennings KH, Lee DC, Clark MS, Brown F *et al.* Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. *Neurodegeneration.* 1995; **4**: 23-32.
- Hsu SH, Shyu HW, Hsieh-Li HM, Li H. Spz1, a novel bHLH-Zip protein, is specifically expressed in testis. *Mech.Dev.* 2001; **100**: 177-187.
- Hu J, Igarashi A, Kamata M, Nakagawa H. Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid beta-peptide (A beta); retards A beta aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 47863-47868.
- Hu X, Hicks CW, He W, Wong P, Macklin WB *et al.* Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci.* 2006; **9**: 1520-1525.
- Huang HC, Jiang ZF. Accumulated amyloid-beta peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009; **16**: 15-27.
- Huang Y. Abeta-independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med.* 2010; **16**: 287-294.
- Huber G, Bailly Y, Martin JR, Mariani J, Brugg B. Synaptic beta-amyloid precursor proteins increase with learning capacity in rats. *Neuroscience.* 1997; **80**: 313-320.
- Hudson CA, Christophi GP, Gruber RC, Wilmore JR, Lawrence DA *et al.* Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia. *J Leukoc.Biol.* 2008; **84**: 631-643.
- Huebbe P, Lodge JK, Rimbach G. Implications of apolipoprotein E genotype on inflammation and vitamin E status. *Mol Nutr Food Res.* 2010; **54**: 623-630.
- Humphreys NE, Xu D, Hepworth MR, Liew FY, Grecis RK. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J Immunol.* 2008; **180**: 2443-2449.

Hunt CE, Turner AJ. Cell biology, regulation and inhibition of beta-secretase (BACE-1). *FEBS J.* 2009; **276**: 1845-1859.

Hutton M, Busfield F, Wragg M, Crook R, Perez-Tur J *et al.* Complete analysis of the presenilin 1 gene in early onset Alzheimer's disease. *Neuroreport.* 1996; **7**: 801-805.

Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, Baker M, Froelich S *et al.* Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature.* 1998; **393**: 702-705.

Hyman BT, Damasio H, Damasio AR, Van Hoesen GW. Alzheimer's disease. *Annu.Rev Public Health.* 1989; **10**: 115-140.

I

Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2004; **5**: 347-360.

Iikura M, Suto H, Kajiwara N, Oboki K, Ohno T *et al.* IL-33 can promote survival, adhesion and cytokine production in human mast cells. *Lab Invest.* 2007; **87**: 971-978.

International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature.* 2005; **437**: 1299-1320.

Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Pharmacological approaches of neurofibrillary degeneration. *Curr Alzheimer Res.* 2005; **2**: 335-341.

Iqbal K, Liu F, Gong CX, Alonso AC, Grundke-Iqbal I. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol.* 2009; **118**: 53-69.

Iqbal K, Liu F, Gong CX, Grundke-Iqbal I. Tau in Alzheimer disease and related tauopathies. *Curr Alzheimer Res.* 2010; **7**: 656-664.

Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D *et al.* Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci.* 1997; **17**: 7053-7059.

Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Watanabe K, Sekiguchi M *et al.* Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nat Med.* 2000; **6**: 143-150.

J

Jack CR, Jr., Wiste HJ, Vemuri P, Weigand SD, Senjem ML *et al.* Brain beta-amyloid measures and magnetic resonance imaging atrophy both predict time-to-progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain.* 2010; **133**: 3336-3348.

Janssen JC, Beck JA, Campbell TA, Dickinson A, Fox NC *et al.* Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families. *Neurology.* 2003; **60**: 235-239.

Jellinger KA. Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J Neural Transm.* 2002a; **109**: 813-836.

Jellinger KA. The pathology of ischemic-vascular dementia: an update. *J Neurol Sci.* 2002b; **203-204**: 153-157.

Jhamandas JH, Cho C, Jassar B, Harris K, MacTavish D *et al.* Cellular mechanisms for amyloid beta-protein activation of rat cholinergic basal forebrain neurons. *J Neurophysiol.* 2001; **86**: 1312-1320.

Jho YS, Zhulina EB, Kim MW, Pincus PA. Monte carlo simulations of tau proteins: effect of phosphorylation. *Biophys.J.* 2010; **99**: 2387-2397.

Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P *et al.* ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron.* 2008; **58**: 681-693.

Johnson GV. Tau phosphorylation and proteolysis: insights and perspectives. *J Alzheimers Dis.* 2006; **9**: 243-250.

Johnson NA, Jahng GH, Weiner MW, Miller BL, Chui HC *et al.* Pattern of cerebral hypoperfusion in Alzheimer disease and mild cognitive impairment measured with arterial spin-labeling MR imaging: initial experience. *Radiology.* 2005; **234**: 851-859.

Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV *et al.* A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature.* 2012; **488**: 96-99.

Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci.* 2004; **29**: 95-102.

Jorissen E, Prox J, Bernreuther C, Weber S, Schwanbeck R *et al.* The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J Neurosci.* 2010; **30**: 4833-4844.

Joseph J, Cole G, Head E, Ingram D. Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *J Neurosci.* 2009; **29**: 12795-12801.

K

Kadlec L, Pendergast AM. The amphiphysin-like protein 1 (ALP1) interacts functionally with the cABL tyrosine kinase and may play a role in cytoskeletal regulation. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 1997; **94**: 12390-12395.

Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; **7**: 827-840.

Kalback W, Esh C, Castano EM, Rahman A, Kokjohn T *et al.* Atherosclerosis, vascular amyloidosis and brain hypoperfusion in the pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease. *Neurol Res.* 2004; **26**: 525-539.

Kamboh MI. Molecular genetics of late-onset Alzheimer's disease. *Ann Hum Genet.* 2004; **68**: 381-404.

Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D *et al.* APP processing and synaptic function. *Neuron.* 2003; **37**: 925-937.

Kar S, Seto D, Gaudreau P, Quirion R. Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices. *J Neurosci.* 1996; **16**: 1034-1040.

- Katsel P, Li C, Haroutunian V. Gene expression alterations in the sphingolipid metabolism pathways during progression of dementia and Alzheimer's disease: a shift toward ceramide accumulation at the earliest recognizable stages of Alzheimer's disease? *Neurochem Res.* 2007; **32**: 845-856.
- Katsel P, Tan W, Haroutunian V. Gain in brain immunity in the oldest-old differentiates cognitively normal from demented individuals. *PLoS One.* 2009; **4**: e7642.
- Kavalali ET. Multiple vesicle recycling pathways in central synapses and their impact on neurotransmission. *J Physiol.* 2007; **585**: 669-679.
- Kawarabayashi T, Shoji M, Younkin LH, Wen-Lang L, Dickson DW *et al.* Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2004; **24**: 3801-3809.
- Kehoe P, Wavrant-De Vrieze F, Crook R, Wu WS, Holmans P *et al.* A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 1999; **8**: 237-245.
- Kelly BL, Ferreira A. beta-Amyloid-induced dynamin 1 degradation is mediated by N-methyl-D-aspartate receptors in hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 2006; **281**: 28079-28089.
- Kelly BL, Ferreira A. Beta-amyloid disrupted synaptic vesicle endocytosis in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience.* 2007; **147**: 60-70.
- KIDD M. Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease. *Nature.* 1963; **197**: 192-193.
- Kienlen-Campard P, Tasiaux B, Van Hees J, Li M, Huysseune S *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.* 2008; **283**: 7733-7744.
- Kirazov E, Kirazov L, Bigl V, Schliebs R. Ontogenetic changes in protein level of amyloid precursor protein (APP) in growth cones and synaptosomes from rat brain and prenatal expression pattern of APP mRNA isoforms in developing rat embryo. *Int J Dev. Neurosci.* 2001; **19**: 287-296.
- Kirkitadze MD, Kowalska A. Molecular mechanisms initiating amyloid beta-fibril formation in Alzheimer's disease. *Acta Biochim. Pol.* 2005; **52**: 417-423.
- Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shiojiri S, Ito H. Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature.* 1988; **331**: 530-532.
- Kitazume S, Tachida Y, Oka R, Shirotani K, Saido TC *et al.* Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase. *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.* 2001; **98**: 13554-13559.
- Kline A. Apolipoprotein E, amyloid-ss clearance and therapeutic opportunities in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2012; **4**: 32.
- Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A. HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med.* 2008; **14**: 476-484.

- Kohutek ZA, diPierro CG, Redpath GT, Hussaini IM. ADAM-10-mediated N-cadherin cleavage is protein kinase C-alpha dependent and promotes glioblastoma cell migration. *J Neurosci*. 2009; **29**: 4605-4615.
- Koike H, Tomioka S, Sorimachi H, Saido TC, Maruyama K *et al*. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein. *Biochem J*. 1999; **343**: 371-375.
- Kojro E, Gimpl G, Lammich S, Marz W, Fahrenholz F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*. 2001; **98**: 5815-5820.
- Komai-Koma M, Xu D, Li Y, McKenzie AN, McInnes IB *et al*. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur J Immunol*. 2007; **37**: 2779-2786.
- Konig G, Monning U, Czech C, Prior R, Banati R *et al*. Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the beta A4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells. *J Biol Chem*. 1992; **267**: 10804-10809.
- Korf ES, Wahlund LO, Visser PJ, Scheltens P. Medial temporal lobe atrophy on MRI predicts dementia in patients with mild cognitive impairment. *Neurology*. 2004; **63**: 94-100.
- Kosik KS, Orecchio LD, Bakalis S, Neve RL. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron*. 1989; **2**: 1389-1397.
- Ksiezak-Reding H, Binder LI, Yen SH. Alzheimer disease proteins (A68) share epitopes with tau but show distinct biochemical properties. *J Neurosci Res*. 1990; **25**: 420-430.
- Ksiezak-Reding H, Liu WK, Yen SH. Phosphate analysis and dephosphorylation of modified tau associated with paired helical filaments. *Brain Res*. 1992; **597**: 209-219.
- Kuchler AM, Pollheimer J, Balogh J, Sponheim J, Manley L *et al*. Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. *Am J Pathol*. 2008; **173**: 1229-1242.
- Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U *et al*. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J*. 2010; **29**: 3020-3032.
- Kumar-Singh S, Cras P, Wang R, Kros JM, van Swieten J *et al*. Dense-core senile plaques in the Flemish variant of Alzheimer's disease are vasocentric. *Am J Pathol*. 2002; **161**: 507-520.
- Kuroiwa K, Arai T, Okazaki H, Minota S, Tominaga S. Identification of human ST2 protein in the sera of patients with autoimmune diseases. *Biochem Biophys.Res Commun*. 2001; **284**: 1104-1108.
- Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B *et al*. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol*. 2008; **181**: 4780-4790.
- Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ *et al*. IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *J Immunol*. 2009; **183**: 6469-6477.

Kwok JB, Li QX, Hallupp M, Whyte S, Ames D *et al.* Novel Leu723Pro amyloid precursor protein mutation increases amyloid beta42(43) peptide levels and induces apoptosis. *Ann Neurol.* 2000; **47**: 249-253.

L

Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K *et al.* BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci.* 2005; **25**: 11693-11709.

Lambert JC, Berr C, Pasquier F, Delacourte A, Frigard B *et al.* Pronounced impact of Th1/E47cs mutation compared with -491 AT mutation on neural APOE gene expression and risk of developing Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 1998; **7**: 1511-1516.

Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K *et al.* Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009; **41**: 1094-1099.

Lambert JC, Mann DM, Harris JM, Chartier-Harlin MC, Cumming A *et al.* The -48 C/T polymorphism in the presenilin 1 promoter is associated with an increased risk of developing Alzheimer's disease and an increased A β load in brain. *J Med Genet.* 2001; **38**: 353-355.

Lambert JC, Mann D, Richard F, Tian J, Shi J *et al.* Is there a relation between APOE expression and brain amyloid load in Alzheimer's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005; **76**: 928-933.

Lambert JC, Testa E, Cognat V, Soula J, Hot D *et al.* Relevance and limitations of public databases for microarray design: a critical approach to gene predictions. *Pharmacogenomics J.* 2003; **3**: 235-241.

Lamkanfi M, Kanneganti TD, Van Damme P, Vanden Berghe T, Vanoverberghe I *et al.* Targeted peptidocentric proteomics reveals caspase-7 as a substrate of the caspase-1 inflammasomes. *Mol Cell Proteomics.* 2008; **7**: 2350-2363.

LaVoie MJ, Fraering PC, Ostaszewski BL, Ye W, Kimberly WT *et al.* Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate subcomplex of Aph-1 and nicastrin. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 37213-37222.

Le Gall SM, Bobe P, Reiss K, Horiuchi K, Niu XD *et al.* ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell.* 2009; **20**: 1785-1794.

Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA *et al.* Amphiphysin 2 (Bin1) and T-tubule biogenesis in muscle. *Science.* 2002; **297**: 1193-1196.

Lee J, Song L, Terracina G, Bara T, Josien H *et al.* Identification of presenilin 1-selective gamma-secretase inhibitors with reconstituted gamma-secretase complexes. *Biochemistry.* 2011; **50**: 4973-4980.

Lee JH, Cheng R, Santana V, Williamson J, Lantigua R *et al.* Expanded genomewide scan implicates a novel locus at 3q28 among Caribbean hispanics with familial Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2006; **63**: 1591-1598.

- Lee JH, Mayeux R, Mayo D, Mo J, Santana V *et al.* Fine mapping of 10q and 18q for familial Alzheimer's disease in Caribbean Hispanics. *Mol Psychiatry*. 2004; **9**: 1042-1051.
- Lee VM, Balin BJ, Otvos L, Jr., Trojanowski JQ. A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal Tau. *Science*. 1991; **251**: 675-678.
- Leprince C, Le Scolan E, Meunier B, Fraisier V, Brandon N *et al.* Sorting nexin 4 and amphiphysin 2, a new partnership between endocytosis and intracellular trafficking. *J Cell Sci*. 2003; **116**: 1937-1948.
- Leprince C, Romero F, Cussac D, Vayssiere B, Berger R *et al.* A new member of the amphiphysin family connecting endocytosis and signal transduction pathways. *J Biol Chem*. 1997; **272**: 15101-15105.
- Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A *et al.* Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*. 2001; **293**: 1487-1491.
- Li B, Chohan MO, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau. *Acta Neuropathol*. 2007; **113**: 501-511.
- Li X, Xiong JW, Shelley CS, Park H, Arnaout MA. The transcription factor ZBP-89 controls generation of the hematopoietic lineage in zebrafish and mouse embryonic stem cells. *Development*. 2006; **133**: 3641-3650.
- Li YJ, Scott WK, Hedges DJ, Zhang F, Gaskell PC *et al.* Age at onset in two common neurodegenerative diseases is genetically controlled. *Am J Hum Genet*. 2002; **70**: 985-993.
- Liang S, Wei FY, Wu YM, Tanabe K, Abe T *et al.* Major Cdk5-dependent phosphorylation sites of amphiphysin 1 are implicated in the regulation of the membrane binding and endocytosis. *J Neurochem*. 2007; **102**: 1466-1476.
- Lindquist SG, Schwartz M, Batbayli M, Waldemar G, Nielsen JE. Genetic testing in familial AD and FTD: mutation and phenotype spectrum in a Danish cohort. *Clin Genet*. 2009; **76**: 205-209.
- Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B and PP5 to the regulation of tau phosphorylation. *Eur J Neurosci*. 2005; **22**: 1942-1950.
- Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Hart GW, Gong CX. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2004; **101**: 10804-10809.
- Liu WK, Dickson DW, Yen SH. Amino acid residues 226-240 of tau, which encompass the first Lys-Ser-Pro site of tau, are partially phosphorylated in Alzheimer paired helical filament-tau. *J Neurochem*. 1994; **62**: 1055-1061.
- Liu WK, Moore WT, Williams RT, Hall FL, Yen SH. Application of synthetic phospho- and unphospho- peptides to identify phosphorylation sites in a subregion of the tau molecule, which is modified in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 1993; **34**: 371-376.
- Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A *et al.* Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology*. 2000; **54**: S4-S9.

- Lohning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S *et al.* T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; **95**: 6930-6935.
- Lopes JP, Oliveira CR, Agostinho P. Neurodegeneration in an Abeta-induced model of Alzheimer's disease: the role of Cdk5. *Aging Cell.* 2010; **9**: 64-77.
- LoPresti P, Szuchet S, Papasozomenos SC, Zinkowski RP, Binder LI. Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 1995; **92**: 10369-10373.
- Love S, Miners S, Palmer J, Chalmers K, Kehoe P. Insights into the pathogenesis and pathogenicity of cerebral amyloid angiopathy. *Front Biosci.* 2009; **14**: 4778-4792.
- Love S, Saitoh T, Quijada S, Cole GM, Terry RD. Alz-50, ubiquitin and tau immunoreactivity of neurofibrillary tangles, Pick bodies and Lewy bodies. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1988; **47**: 393-405.
- Luchsinger JA, Reitz C, Patel B, Tang MX, Manly JJ *et al.* Relation of diabetes to mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* 2007; **64**: 570-575.
- Luo J, Martinez J, Yin X, Sanchez A, Tripathy D *et al.* Hypoxia induces angiogenic factors in brain microvascular endothelial cells. *Microvasc.Res.* 2012; **83**: 138-145.
- Lusis AJ, Taylor BA, Quon D, Zollman S, LeBoeuf RC. Genetic factors controlling structure and expression of apolipoproteins B and E in mice. *J Biol Chem.* 1987; **262**: 7594-7604.
- Luthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS *et al.* Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity.* 2009; **31**: 84-98.

M

- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS. *J Lipid Res.* 2009; **50** : S183-S188.
- Mandell JW, Banker GA. A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons. *J Neurosci.* 1996; **16**: 5727-5740.
- Marambaud P, Dreses-Werringloer U, Vingtdeux V. Calcium signaling in neurodegeneration. *Mol Neurodegener.* 2009; **4**: 20.
- Marvie P, Lisbonne M, L'helgoualc'h A, Rauch M, Turlin B *et al.* Interleukin-33 overexpression is associated with liver fibrosis in mice and humans. *J Cell Mol Med.* 2010; **14**: 1726-1739.
- Marzolo MP, Bu G. Lipoprotein receptors and cholesterol in APP trafficking and proteolytic processing, implications for Alzheimer's disease. *Semin.Cell Dev.Biol.* 2009; **20**: 191-200.
- Mastrangelo P, Mathews PM, Chishti MA, Schmidt SD, Gu Y *et al.* Dissociated phenotypes in presenilin transgenic mice define functionally distinct gamma-secretases. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 2005; **102**: 8972-8977.

- Masumi A, Aizaki H, Suzuki T, DuHadaway JB, Prendergast GC *et al.* Reduction of hepatitis C virus NS5A phosphorylation through its interaction with amphiphysin II. *Biochem Biophys. Res Commun.* 2005; **336**: 572-578.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I *et al.* beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci.* 1992; **12**: 376-389.
- McAllister C, Long J, Bowers A, Walker A, Cao P *et al.* Genetic targeting aromatase in male amyloid precursor protein transgenic mice down-regulates beta-secretase (BACE1) and prevents Alzheimer-like pathology and cognitive impairment. *J Neurosci.* 2010; **30**: 7326-7334.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D *et al.* Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology.* 1984; **34**: 939-944.
- Melov S, Adlard PA, Morten K, Johnson F, Golden TR *et al.* Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS One.* 2007; **6**: e536.
- Micheva KD, Ramjaun AR, Kay BK, McPherson PS. SH3 domain-dependent interactions of endophilin with amphiphysin. *FEBS Lett.* 1997; **414**: 308-312.
- Milhiet PE, Yamamoto D, Berthoumieu O, Dosset P, Le Grimmelc C *et al.* Deciphering the structure, growth and assembly of amyloid-like fibrils using high-speed atomic force microscopy. *PLoS One.* 2010; **5**: e13240.
- Miller AM, Liew FY. The IL-33/ST2 pathway--A new therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol. Ther.* 2011; **131**: 179-186.
- Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y *et al.* IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med.* 2008; **205**: 339-346.
- Mills J, Reiner PB. Mitogen-activated protein kinase is involved in N-methyl-D-aspartate receptor regulation of amyloid precursor protein cleavage. *Neuroscience.* 1999; **94**: 1333-1338.
- Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ *et al.* The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology.* 1991; **41**: 479-486.
- Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature.* 1997; **385**: 733-736.
- Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS One.* 2008; **3**: e3331.
- Mueller-Stainer S, Zhou Y, Arai H, Roberson ED, Sun B *et al.* Antiamyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron.* 2006; **51**: 703-714.

Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L *et al.* A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet.* 1992; **1**: 345-347.

Muyllaert D, Kremer A, Jaworski T, Borghgraef P, Devijver H *et al.* Glycogen synthase kinase-3beta, or a link between amyloid and tau pathology? *Genes Brain Behav.* 2008; **7 Suppl 1**: 57-66.

Myers A, Wavrant De-Vrieze F, Holmans P, Hamshere M, Crook R *et al.* Full genome screen for Alzheimer disease: stage II analysis. *Am J Med Genet.* 2002; **114**: 235-244.

N

Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang LS, Vardarajan BN *et al.* Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2011; **43**: 436-441.

Namba Y, Tomonaga M, Kawasaki H, Otomo E, Ikeda K. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 1991; **541**: 163-166.

Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW *et al.* Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science.* 1994; **264**: 850-852.

Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* 1986; **387**: 271-280.

Nicholson AM, Ferreira A. Increased membrane cholesterol might render mature hippocampal neurons more susceptible to beta-amyloid-induced calpain activation and tau toxicity. *J Neurosci.* 2009; **29**: 4640-4651.

Niimura M, Isoo N, Takasugi N, Tsuruoka M, Ui-Tei K *et al.* Aph-1 contributes to the stabilization and trafficking of the gamma-secretase complex through mechanisms involving intermolecular and intramolecular interactions. *J Biol Chem.* 2005; **280**: 12967-12975.

Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K *et al.* The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci.* 2001; **4**: 887-893.

Nitsch RM, Deng M, Tennis M, Schoenfeld D, Growdon JH. The selective muscarinic M1 agonist AF102B decreases levels of total Abeta in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2000; **48**: 913-918.

Nitsch RM, Deng A, Wurtman RJ, Growdon JH. Metabotropic glutamate receptor subtype mGluR1alpha stimulates the secretion of the amyloid beta-protein precursor ectodomain. *J Neurochem.* 1997; **69**: 704-712.

Nyabi O, Bentahir M, Horre K, Herreman A, Gottardi-Littell N *et al.* Presenilins mutated at Asp-257 or Asp-385 restore Pen-2 expression and Nicastrin glycosylation but remain catalytically inactive in the absence of wild type Presenilin. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 43430-43436.

O

- Obici L, Demarchi A, de Rosa G, Bellotti V, Marciano S *et al.* A novel AbetaPP mutation exclusively associated with cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol.* 2005; **58**: 639-644.
- Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H *et al.* IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 2010; **107**: 18581-18586.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE *et al.* Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron.* 2003; **39**: 409-421.
- Okamoto T, Takeda S, Murayama Y, Ogata E, Nishimoto I. Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor. *J Biol Chem.* 1995; **270**: 4205-4208.
- Olson JM, Goddard KA, Dudek DM. A second locus for very-late-onset Alzheimer disease: a genome scan reveals linkage to 20p and epistasis between 20p and the amyloid precursor protein region. *Am J Hum Genet.* 2002; **71**: 154-161.
- Oltersdorf T, Ward PJ, Henriksson T, Beattie EC, Neve R *et al.* The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J Biol Chem.* 1990; **265**: 4492-4497.
- Onda H, Kasuya H, Takakura K, Hori T, Imaizumi T *et al.* Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb.Blood Flow Metab.* 1999; **19**: 1279-1288.

P

- Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA *et al.* Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009; **60**: 738-749.
- Park SY, Ferreira A. The generation of a 17 kDa neurotoxic fragment: an alternative mechanism by which tau mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J Neurosci.* 2005; **25**: 5365-5375.
- Parvathy S, Oppong SY, Karran EH, Buckle DR, Turner AJ *et al.* Angiotensin-converting enzyme secretase is inhibited by zinc metalloprotease inhibitors and requires its substrate to be inserted in a lipid bilayer. *Biochem J.* 1997; **327** : 37-43.
- Peacock ML, Murman DL, Sima AA, Warren JT, Jr., Roses AD *et al.* Novel amyloid precursor protein gene mutation (codon 665Asp) in a patient with late-onset Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1994; **35**: 432-438.
- Pei JJ, Sjogren M, Winblad B. Neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease: from molecular mechanisms to identification of drug targets. *Curr Opin Psychiatry.* 2008; **21**: 555-561.
- Peila R, Rodriguez BL, Launer LJ. Type 2 diabetes, APOE gene, and the risk for dementia and related pathologies: The Honolulu-Asia Aging Study. *Diabetes.* 2002; **51**: 1256-1262.

- Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH, Gaskell PC, Scott WK *et al.* Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12. *JAMA*. 1997; **278**: 1237-1241.
- Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC, Jr., Yamaoka LH, Hung WY *et al.* Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet*. 1991; **48**: 1034-1050.
- Pericak-Vance MA, Grubber J, Bailey LR, Hedges D, West S *et al.* Identification of novel genes in late-onset Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*. 2000; **35**: 1343-1352.
- Perlmutter LS, Barron E, Saperia D, Chui HC. Association between vascular basement membrane components and the lesions of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 1991; **30**: 673-681.
- Perry G, Friedman R, Shaw G, Chau V. Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 1987; **84**: 3033-3036.
- Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJ *et al.* BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science*. 2004; **303**: 495-499.
- Peters R, Beckett N, Forette F, Tuomilehto J, Clarke R *et al.* Incident dementia and blood pressure lowering in the Hypertension in the Very Elderly Trial cognitive function assessment (HYVET-COG): a double-blind, placebo controlled trial. *Lancet Neurol*. 2008; **7**: 683-689.
- Pflanzner T, Kuhlmann CR, Pietrzik CU. Blood-brain-barrier models for the investigation of transporter- and receptor-mediated amyloid-beta clearance in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2010; **7**: 578-590.
- Pike CJ, Cummings BJ, Cotman CW. beta-Amyloid induces neuritic dystrophy in vitro: similarities with Alzheimer pathology. *Neuroreport*. 1992; **3**: 769-772.
- Pike CJ, Walencewicz AJ, Glabe CG, Cotman CW. In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res*. 1991; **563**: 311-314.
- Pineda-Lucena A, Ho CS, Mao DY, Sheng Y, Laister RC *et al.* A structure-based model of the c-Myc/Bin1 protein interaction shows alternative splicing of Bin1 and c-Myc phosphorylation are key binding determinants. *J Mol Biol*. 2005; **351**: 182-194.
- Pintchovski SA, Schenk DB, Basi GS. Evidence that enzyme processivity mediates differential A β production by PS1 and PS2. *Curr Alzheimer Res*. 2012.
- Poirier J, Baccichet A, Dea D, Gauthier S. Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience*. 1993; **55**: 81-90.
- Polvikoski T, Sulkava R, Haltia M, Kainulainen K, Vuorio A *et al.* Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein. *N Engl.J Med*. 1995; **333**: 1242-1247.
- Pottier C, Wallon D, Lecrux AR, Maltete D, Bombois S *et al.* Amyloid-beta protein precursor gene expression in alzheimer's disease and other conditions. *J Alzheimers Dis*. 2012; **28**: 561-566.
- Pradier L, Carpentier N, Delalonde L, Clavel N, Bock MD *et al.* Mapping the APP/presenilin (PS) binding domains: the hydrophilic N-terminus of PS2 is sufficient for interaction with APP and can displace APP/PS1 interaction. *Neurobiol Dis*. 1999; **6**: 43-55.

Prefontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, Audusseau S, Olivenstein R *et al.* Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J Immunol.* 2009; **183**: 5094-5103.

Preston SD, Steart PV, Wilkinson A, Nicoll JA, Weller RO. Capillary and arterial cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease: defining the perivascular route for the elimination of amyloid beta from the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2003; **29**: 106-117.

Prokop S, Haass C, Steiner H. Length and overall sequence of the PEN-2 C-terminal domain determines its function in the stabilization of presenilin fragments. *J Neurochem.* 2005; **94**: 57-62.

Psaty BM, O'Donnell CJ, Gudnason V, Lunetta KL, Folsom AR *et al.* Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Consortium: Design of prospective meta-analyses of genome-wide association studies from 5 cohorts. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009; **2**: 73-80.

Pushparaj PN, Tay HK, H'ng SC, Pitman N, Xu D *et al.* The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2009; **106**: 9773-9778.

Q

Qi-Takahara Y, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Dolios G, Hirotsu N *et al.* Longer forms of amyloid beta protein: implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *J Neurosci.* 2005; **25**: 436-445.

Qiu WQ, Folstein MF. Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging.* 2006; **27**: 190-198.

Qiu WQ, Walsh DM, Ye Z, Vekrellis K, Zhang J *et al.* Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem.* 1998; **273**: 32730-32738.

R

Ramaroson H, Helmer C, Barberger-Gateau P, Letenneur L, Dartigues JF. [Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort]. *Rev Neurol (Paris).* 2003; **159**: 405-411.

Ramjaun AR, Philie J, de Heuvel E, McPherson PS. The N terminus of amphiphysin II mediates dimerization and plasma membrane targeting. *J Biol Chem.* 1999; **274**: 19785-19791.

Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL *et al.* IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; **123**: 1047-1054.

Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP, Ferreira A. Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002; **99**: 6364-6369.

- Raux G, Guyant-Marechal L, Martin C, Bou J, Penet C *et al.* Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update. *J Med Genet.* 2005; **42**: 793-795.
- Reiman EM, Chen K, Langbaum JB, Lee W, Reschke C *et al.* Higher serum total cholesterol levels in late middle age are associated with glucose hypometabolism in brain regions affected by Alzheimer's disease and normal aging. *Neuroimage.* 2010; **49**: 169-176.
- Reiman EM, Webster JA, Myers AJ, Hardy J, Dunckley T *et al.* GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. *Neuron.* 2007; **54**: 713-720.
- Reinecke JB, DeVos SL, McGrath JP, Shepard AM, Goncharoff DK *et al.* Implicating calpain in tau-mediated toxicity in vivo. *PLoS One.* 2011; **6**: e23865.
- Reitz C, Brayne C, Mayeux R. Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* 2011; **7**: 137-152.
- Ren G, Vajjhala P, Lee JS, Winsor B, Munn AL. The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006; **70**: 37-120.
- Ren Z, Schenk D, Basi GS, Shapiro IP. Amyloid beta-protein precursor juxtamembrane domain regulates specificity of gamma-secretase-dependent cleavages. *J Biol Chem.* 2007; **282**: 35350-35360.
- Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU *et al.* The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci.* 2007; **27**: 7817-7826.
- Robertson LA, Moya KL, Breen KC. The potential role of tau protein O-glycosylation in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2004; **6**: 489-495.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M *et al.* Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature.* 1995; **376**: 775-778.
- Rosen WG, Mohs RC, Davis KL. A new rating scale for Alzheimer's disease. *Am J Psychiatry.* 1984; **141**: 1356-1364.
- Roussel L, Erard M, Cayrol C, Girard JP. Molecular mimicry between IL-33 and KSHV for attachment to chromatin through the H2A-H2B acidic pocket. *EMBO Rep.* 2008; **9**: 1006-1012.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerriere A *et al.* APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet.* 2006; **38**: 24-26.

S

- Sabo SL, Ikin AF, Buxbaum JD, Greengard P. The Alzheimer amyloid precursor protein (APP) and FE65, an APP-binding protein, regulate cell movement. *J Cell Biol.* 2001; **153**: 1403-1414.

- Sakai T, Hino K, Wada S, Maeda H. Identification of the DNA binding specificity of the human ZNF219 protein and its function as a transcriptional repressor. *DNA Res.* 2003; **10**: 155-165.
- Sakamuro D, Elliott KJ, Wechsler-Reya R, Prendergast GC. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat Genet.* 1996; **14**: 69-77.
- Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN *et al.* IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest.* 2007; **117**: 1538-1549.
- Savonenko AV, Melnikova T, Laird FM, Stewart KA, Price DL *et al.* Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 2008; **105**: 5585-5590.
- Sayas CL, Avila J, Wandosell F. Regulation of neuronal cytoskeleton by lysophosphatidic acid: role of GSK-3. *Biochim.Biophys.Acta.* 2002; **1582**: 144-153.
- Scheibel AB, Duong TH, Jacobs R. Alzheimer's disease as a capillary dementia. *Ann Med.* 1989; **21**: 103-107.
- Schellenberg GD, Bird TD, Wijsman EM, Orr HT, Anderson L *et al.* Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science.* 1992; **258**: 668-671.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995; **270**: 467-470.
- Scheuermann S, Hamsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C *et al.* Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 33923-33929.
- Schmechel DE, Goldgaber D, Burkhart DS, Gilbert JR, Gajdusek DC *et al.* Cellular localization of messenger RNA encoding amyloid-beta-protein in normal tissue and in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 1988; **2**: 96-111.
- Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E *et al.* IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity.* 2005; **23**: 479-490.
- Schroeter EH, Ilagan MX, Brunkan AL, Hecimovic S, Li YM *et al.* A presenilin dimer at the core of the gamma-secretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 2003; **100**: 13075-13080.
- Schubert D, LaCorbiere M, Saitoh T, Cole G. Characterization of an amyloid beta precursor protein that binds heparin and contains tyrosine sulfate. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 1989; **86**: 2066-2069.
- Schweitzer C, Kober A, Lang I, Etschmaier K, Scholler M *et al.* Processing of endogenous AbetaPP in blood-brain barrier endothelial cells is modulated by liver-X receptor agonists and altered cellular cholesterol homeostasis. *J Alzheimers Dis.* 2011; **27**: 341-360.
- Scott WK, Hauser ER, Schmechel DE, Welsh-Bohmer KA, Small GW *et al.* Ordered-subsets linkage analysis detects novel Alzheimer disease loci on chromosomes 2q34 and 15q22. *Am J Hum Genet.* 2003; **73**: 1041-1051.

- Seabrook GR, Smith DW, Bowery BJ, Easter A, Reynolds T *et al.* Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology*. 1999; **38**: 349-359.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid beta-protein. *J Alzheimers Dis*. 2001; **3**: 75-80.
- Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G *et al.* Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 1988; **85**: 7341-7345.
- Sengupta A, Wu Q, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Singh TJ. Potentiation of GSK-3-catalyzed Alzheimer-like phosphorylation of human tau by cdk5. *Mol Cell Biochem*. 1997; **167**: 99-105.
- Seshadri S, Fitzpatrick AL, Ikram MA, DeStefano AL, Gudnason V *et al.* Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA*. 2010; **303**: 1832-1840.
- Seshadri S, Wolf PA. Lifetime risk of stroke and dementia: current concepts, and estimates from the Framingham Study. *Lancet Neurol*. 2007; **6**: 1106-1114.
- Seshadri S, Wolf PA, Beiser A, Au R, McNulty K *et al.* Lifetime risk of dementia and Alzheimer's disease. The impact of mortality on risk estimates in the Framingham Study. *Neurology*. 1997; **49**: 1498-1504.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE *et al.* Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*. 2008; **14**: 837-842.
- Sherrington R, Froelich S, Sorbi S, Campion D, Chi H *et al.* Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum Mol Genet*. 1996; **5**: 985-988.
- Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G *et al.* Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1995; **375**: 754-760.
- Shigematsu K, McGeer PL, McGeer EG. Localization of amyloid precursor protein in selective postsynaptic densities of rat cortical neurons. *Brain Res*. 1992; **592**: 353-357.
- Shirotani K, Edbauer D, Capell A, Schmitz J, Steiner H *et al.* Gamma-secretase activity is associated with a conformational change of nicastrin. *J Biol Chem*. 2003; **278**: 16474-16477.
- Shirotani K, Edbauer D, Kostka M, Steiner H, Haass C. Immature nicastrin stabilizes APH-1 independent of PEN-2 and presenilin: identification of nicastrin mutants that selectively interact with APH-1. *J Neurochem*. 2004; **89**: 1520-1527.
- Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J *et al.* Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem*. 1995; **41**: 1068-1086.
- Sillen A, Forsell C, Lilius L, Axelman K, Bjork BF *et al.* Genome scan on Swedish Alzheimer's disease families. *Mol Psychiatry*. 2006; **11**: 182-186.
- Simmons LK, May PC, Tomaselli KJ, Rydel RE, Fuson KS *et al.* Secondary structure of amyloid beta peptide correlates with neurotoxic activity in vitro. *Mol Pharmacol*. 1994; **45**: 373-379.

- Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal Alzheimer-like state. *J Neurochem.* 1995; **64**: 1420-1423.
- Singh TJ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Differential phosphorylation of human tau isoforms containing three repeats by several protein kinases. *Arch Biochem Biophys.* 1996a; **328**: 43-50.
- Singh TJ, Grundke-Iqbal I, McDonald B, Iqbal K. Comparison of the phosphorylation of microtubule-associated protein tau by non-proline dependent protein kinases. *Mol Cell Biochem.* 1994; **131**: 181-189.
- Singh TJ, Wang JZ, Novak M, Kontzekova E, Grundke-Iqbal I *et al.* Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylates tau at Ser-262 but only partially inhibits its binding to microtubules. *FEBS Lett.* 1996b; **387**: 145-148.
- Sivadon P, Bauer F, Aigle M, Crouzet M. Actin cytoskeleton and budding pattern are altered in the yeast rvs161 mutant: the Rvs161 protein shares common domains with the brain protein amphiphysin. *Mol Gen. Genet.* 1995; **246**: 485-495.
- Skovronsky DM, Moore DB, Milla ME, Doms RW, Lee VM. Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem.* 2000; **275**: 2568-2575.
- Slack BE, Ma LK, Seah CC. Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha converting enzyme. *Biochem J.* 2001; **357**: 787-794.
- Slepnev VI, Ochoa GC, Butler MH, Grabs D, De Camilli P. Role of phosphorylation in regulation of the assembly of endocytic coat complexes. *Science.* 1998; **281**: 821-824.
- Small SA, Duff K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron.* 2008; **60**: 534-542.
- Smith EE, Greenberg SM. Beta-amyloid, blood vessels, and brain function. *Stroke.* 2009; **40**: 2601-2606.
- Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R *et al.* IL-33 amplifies both Th1- and Th2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive Th2 cells, iNKT and NK cells. *Int Immunol.* 2008; **20**: 1019-1030.
- Soba P, Eggert S, Wagner K, Zentgraf H, Siehl K *et al.* Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J.* 2005; **24**: 3624-3634.
- Soulie C, Lepagnol J, Delacourte A, Caillet-Boudin ML. Dephosphorylation studies of SKNSH-SY 5Y cell Tau proteins by endogenous phosphatase activity. *Neurosci Lett.* 1996; **206**: 189-192.
- Spasic D, Annaert W. Building gamma-secretase: the bits and pieces. *J Cell Sci.* 2008; **121**: 413-420.
- Sponheim J, Pollheimer J, Olsen T, Balogh J, Hammarstrom C *et al.* Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts. *Am J Pathol.* 2010; **177**: 2804-2815.

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

Steiner H, Capell A, Leimer U, Haass C. Genes and mechanisms involved in beta-amyloid generation and Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1999; **249**: 266-270.

Steiner H, Kostka M, Romig H, Basset G, Pesold B *et al.* Glycine 384 is required for presenilin-1 function and is conserved in bacterial polytopic aspartyl proteases. *Nat Cell Biol.* 2000; **2**: 848-851.

Storey E, Beyreuther K, Masters CL. Alzheimer's disease amyloid precursor protein on the surface of cortical neurons in primary culture co-localizes with adhesion patch components. *Brain Res.* 1996; **735**: 217-231.

Stratman NC, Castle CK, Taylor BM, Epps DE, Melchior GW *et al.* Isoform-specific interactions of human apolipoprotein E to an intermediate conformation of human Alzheimer amyloid-beta peptide. *Chem Phys.Lipids.* 2005; **137**: 52-61.

Strittmatter WJ, Roses AD. Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 1995; **92**: 4725-4727.

Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS *et al.* Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 1993; **90**: 8098-8102.

Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu.Rev Neurosci.* 2004; **27**: 509-547.

Sultan M, Schulz MH, Richard H, Magen A, Klingenhoff A *et al.* A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science.* 2008; **321**: 956-960.

Suzuki Y, Brender JR, Hartman K, Ramamoorthy A, Marsh EN. Alternative Pathways of Human Islet Amyloid Polypeptide Aggregation Distinguished by (19)F Nuclear Magnetic Resonance-Detected Kinetics of Monomer Consumption. *Biochemistry.* 2012.

T

Tagliavini F, Rossi G, Padovani A, Magoni M, Andora G *et al.* A new β PP mutation related to hereditary cerebral haemorrhage. *Alzheimer's Reports* 1999 ; **2**: Supp 1: S28.

Tago K, Noda T, Hayakawa M, Iwahana H, Yanagisawa K *et al.* Tissue distribution and subcellular localization of a variant form of the human ST2 gene product, ST2V. *Biochem Biophys.Res Commun.* 2001; **285**: 1377-1383.

Tajima S, Oshikawa K, Tominaga S, Sugiyama Y. The increase in serum soluble ST2 protein upon acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2003; **124**: 1206-1214.

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

- Takeda M, Martinez R, Kudo T, Tanaka T, Okochi M *et al.* Apolipoprotein E and central nervous system disorders: reviews of clinical findings. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2010; **64**: 592-607.
- Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Gabay C, Palmer G. Interleukin-33 is biologically active independently of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem.* 2009; **284**: 19420-19426.
- Tanaka S, Nakamura S, Ueda K, Kameyama M, Shiojiri S *et al.* Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: their differential expression in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys. Res Commun.* 1988; **157**: 472-479.
- Tatebayashi Y, Haque N, Tung YC, Iqbal K, Grundke-Iqbal I. Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of organelle transport. *J Cell Sci.* 2004; **117**: 1653-1663.
- Terreni L, Fogliarino S, Franceschi, Forloni G. Novel pathogenic mutation in an Italian patient with familial Alzheimer's disease detected in APP gene. *Neurobiology of Aging.* 2002 **23**: S319.
- Tesco G, Ginestroni A, Hiltunen M, Kim M, Dolios G *et al.* APP substitutions V715F and L720P alter PS1 conformation and differentially affect Abeta and AICD generation. *J Neurochem.* 2005; **95**: 446-456.
- Thal DR, Ghebremedhin E, Rub U, Yamaguchi H, Del Tredici K *et al.* Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; **61**: 282-293.
- Theuns J, Brouwers N, Engelborghs S, Sleegers K, Bogaerts V *et al.* Promoter mutations that increase amyloid precursor-protein expression are associated with Alzheimer disease. *Am J Hum Genet.* 2006a; **78**: 936-946.
- Theuns J, Marjaux E, Vandenbulcke M, Van Laere K, Kumar-Singh S *et al.* Alzheimer dementia caused by a novel mutation located in the APP C-terminal intracytosolic fragment. *Hum Mutat.* 2006b; **27**: 888-896.
- Theuns J, Van Broeckhoven C. Transcriptional regulation of Alzheimer's disease genes: implications for susceptibility. *Hum Mol Genet.* 2000; **9**: 2383-2394.
- Thinakaran G, Borchelt DR, Lee MK, Slunt HH, Spitzer L *et al.* Endoproteolysis of presenilin 1 and accumulation of processed derivatives in vivo. *Neuron.* 1996; **17**: 181-190.
- Thinakaran G, Harris CL, Ratovitski T, Davenport F, Slunt HH *et al.* Evidence that levels of presenilins (PS1 and PS2) are coordinately regulated by competition for limiting cellular factors. *J Biol Chem.* 1997; **272**: 28415-28422.
- Thonberg H, Fallstrom M, Bjorkstrom J, Schoumans J, Nennesmo I *et al.* Mutation screening of patients with Alzheimer disease identifies APP locus duplication in a Swedish patient. *BMC Res Notes.* 2011; **4**: 476.
- Tian J, Shi J, Bailey K, Lendon CL, Pickering-Brown SM *et al.* Association between apolipoprotein E e4 allele and arteriosclerosis, cerebral amyloid angiopathy, and cerebral white matter damage in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004; **75**: 696-699.

- Tiraboschi P, Hansen LA, Masliah E, Alford M, Thal LJ *et al.* Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology*. 2004; **62**: 1977-1983.
- Tolia A, Chavez-Gutierrez L, De Strooper B. Contribution of presenilin transmembrane domains 6 and 7 to a water-containing cavity in the gamma-secretase complex. *J Biol Chem*. 2006; **281**: 27633-27642.
- Tolia A, De Strooper B. Structure and function of gamma-secretase. *Semin.Cell Dev.Biol*. 2009; **20**: 211-218.
- Tomimoto H, Akiguchi I, Wakita H, Nakamura S, Kimura J. Ultrastructural localization of amyloid protein precursor in the normal and postischemic gerbil brain. *Brain Res*. 1995; **672**: 187-195.
- Tominaga A, Mita S, Kikuchi Y, Hitoshi Y, Takatsu K *et al.* Establishment of IL-5-dependent early B cell lines by long-term bone marrow cultures. *Growth Factors*. 1989; **1**: 135-146.
- Tomiya T, Nagata T, Shimada H, Teraoka R, Fukushima A *et al.* A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol*. 2008; **63**: 377-387.
- Toshima J, Tanaka T, Mizuno K. Dual specificity protein kinase activity of testis-specific protein kinase 1 and its regulation by autophosphorylation of serine-215 within the activation loop. *J Biol Chem*. 1999; **274**: 12171-12176.
- Tregouet DA, Escolano S, Tiret L, Mallet A, Golmard JL. A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm. *Ann Hum Genet*. 2004; **68**: 165-177.
- Tsutsui K, Maeda Y, Tsutsui K, Seki S, Tokunaga A. cDNA cloning of a novel amphiphysin isoform and tissue-specific expression of its multiple splice variants. *Biochem Biophys.Res Commun*. 1997; **236**: 178-183.
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog.Neurobiol*. 2003; **70**: 1-32.

V

- Van Broeckhoven C, Haan J, Bakker E, Hardy JA, Van Hul W *et al.* Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). *Science*. 1990; **248**: 1120-1122.
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA *et al.* Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*. 1999; **286**: 735-741.
- Vekrellis K, Ye Z, Qiu WQ, Walsh D, Hartley D *et al.* Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme. *J Neurosci*. 2000; **20**: 1657-1665.

Verri WA, Jr., Guerrero AT, Fukada SY, Valerio DA, Cunha TM *et al.* IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 2008; **105**: 2723-2728.

Vetrivel KS, Cheng H, Kim SH, Chen Y, Barnes NY *et al.* Spatial segregation of gamma-secretase and substrates in distinct membrane domains. *J Biol Chem.* 2005; **280**: 25892-25900.

Vetrivel KS, Thinakaran G. Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology.* 2006; **66**: S69-S73.

Vingtdeux V, Marambaud P. Identification and biology of alpha-secretase. *J Neurochem.* 2012; **120**: 34-45.

Vinters HV. Cerebral amyloid angiopathy. A critical review. *Stroke.* 1987; **18**: 311-324.

W

Wakutani Y. Gene symbol: APP. Disease: Familial Alzheimer's disease. *Hum Genet.* 2005; **117**: 299.

Wakutani Y, Watanabe K, Adachi Y, Wada-Isoe K, Urakami K *et al.* Novel amyloid precursor protein gene missense mutation (D678N) in probable familial Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004; **75**: 1039-1042.

Walker ES, Martinez M, Brunkan AL, Goate A. Presenilin 2 familial Alzheimer's disease mutations result in partial loss of function and dramatic changes in Abeta 42/40 ratios. *J Neurochem.* 2005; **92**: 294-301.

Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM *et al.* Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem.* 1999; **274**: 25945-25952.

Walsh DM, Selkoe DJ. Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept.Lett.* 2004; **11**: 213-228.

Walsh DM, Tseng BP, Rydel RE, Podlisny MB, Selkoe DJ. The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain. *Biochemistry.* 2000; **39** : 10831-10839.

Walzl G, Matthews S, Kendall S, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ *et al.* Inhibition of T1/ST2 during respiratory syncytial virus infection prevents T helper cell type 2 (Th2)- but not Th1-driven immunopathology. *J Exp Med.* 2001; **193**: 785-792.

Wang CY, Wang T, Zheng W, Zhao BL, Danscher G *et al.* Zinc overload enhances APP cleavage and Abeta deposition in the Alzheimer mouse brain. *PLoS One.* 2010; **5**: e15349.

Wang J, Cheng H, Li X, Lu W, Wang K *et al.* Regulation of Neural Stem Cell Differentiation by Transcription Factors HNF4-1 and MAZ-1. *Mol Neurobiol.* 2012; **47**: 228-240.

Wang JZ, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *Eur J Neurosci.* 2007; **25**: 59-68.

- Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R *et al.* A subset of NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature*. 2001; **414**: 212-216.
- Weggen S, Eriksen JL, Sagi SA, Pietrzik CU, Ozols V *et al.* Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid beta 42 production by direct modulation of gamma-secretase activity. *J Biol Chem*. 2003; **278**: 31831-31837.
- Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM *et al.* Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell*. 1989; **57**: 115-126.
- Weidemann A, Paliga K, Durrwang U, Reinhard FB, Schuckert O *et al.* Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein within its cytoplasmic domain by caspase-like proteases. *J Biol Chem*. 1999; **274**: 5823-5829.
- Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 1975; **72**: 1858-1862.
- Weisgraber KH. Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv.Protein Chem*. 1994; **45**: 249-302.
- Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E: the Alzheimer's disease connection. *FASEB J*. 1996; **10**: 1485-1494.
- Weller RO, Djuanda E, Yow HY, Carare RO. Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta Neuropathol*. 2009; **117**: 1-14.
- Weller RO, Nicoll JA. Cerebral amyloid angiopathy: both viper and maggot in the brain. *Ann Neurol*. 2005; **58**: 348-350.
- Westmeyer GG, Willem M, Lichtenthaler SF, Lurman G, Multhaup G *et al.* Dimerization of beta-site beta-amyloid precursor protein-cleaving enzyme. *J Biol Chem*. 2004; **279**: 53205-53212.
- Wigge P, Kohler K, Vallis Y, Doyle CA, Owen D *et al.* Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell*. 1997; **8** : 2003-2015.
- Wigge P, McMahon HT. The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci*. 1998; **21**: 339-344.
- Williamson WD, Pinto I. Histones and genome integrity. *Front Biosci*. 2012; **17**: 984-995.
- Wimo A, Winblad B, Aguero-Torres H, von Strauss E. The magnitude of dementia occurrence in the world. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2003; **17**: 63-67.
- Wisniewski HM, Narang HK, Terry RD. Neurofibrillary tangles of paired helical filaments. *J Neurol Sci*. 1976; **27**: 173-181.
- Wisniewski T, Frangione B. Apolipoprotein E: a pathological chaperone protein in patients with cerebral and systemic amyloid. *Neurosci Lett*. 1992; **135**: 235-238.
- Wolfson C, Wolfson DB, Asgharian M, M'Lan CE, Ostbye T *et al.* A reevaluation of the duration of survival after the onset of dementia. *N Engl.J Med*. 2001; **344**: 1111-1116.

Wu HY, Tomizawa K, Oda Y, Wei FY, Lu YF *et al.* Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration. *J Biol Chem.* 2004; **279**: 4929-4940.

Wu J, Basha MR, Brock B, Cox DP, Cardozo-Pelaez F *et al.* Alzheimer's disease (AD)-like pathology in aged monkeys after infantile exposure to environmental metal lead (Pb): evidence for a developmental origin and environmental link for AD. *J Neurosci.* 2008; **28**: 3-9.

Wu LG. Kinetic regulation of vesicle endocytosis at synapses. *Trends Neurosci.* 2004; **27**: 548-554.

Wu Y, Liang S, Oda Y, Ohmori I, Nishiki T *et al.* Truncations of amphiphysin I by calpain inhibit vesicle endocytosis during neural hyperexcitation. *EMBO J.* 2007; **26**: 2981-2990.

Wyss-Coray T, Mucke L. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron.* 2002; **35**: 419-432.

X

Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R *et al.* IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.* 2008; **105** : 10913-10918.

Y

Yagishita S, Morishima-Kawashima M, Tanimura Y, Ishiura S, Ihara Y. DAPT-induced intracellular accumulations of longer amyloid beta-proteins: further implications for the mechanism of intramembrane cleavage by gamma-secretase. *Biochemistry.* 2006; **45**: 3952-3960.

Yasojima K, McGeer EG, McGeer PL. Relationship between beta amyloid peptide generating molecules and neprilysin in Alzheimer disease and normal brain. *Brain Res.* 2001; **919**: 115-121.

Yasuoka S, Kawanokuchi J, Parajuli B, Jin S, Doi Y *et al.* Production and functions of IL-33 in the central nervous system. *Brain Res.* 2011; **1385**: 8-17.

Yen SH, Liu WK, Hall FL, Yan SD, Stern D *et al.* Alzheimer neurofibrillary lesions: molecular nature and potential roles of different components. *Neurobiol Aging.* 1995; **16**: 381-387.

Yoshida Y, Kinuta M, Abe T, Liang S, Araki K *et al.* The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature. *EMBO J.* 2004; **23**: 3483-3491.

Younkin SG. Evidence that A beta 42 is the real culprit in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 1995; **37**: 287-288.

Yu G, Nishimura M, Arawaka S, Levitan D, Zhang L *et al.* Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing. *Nature.* 2000; **407**: 48-54.

Z

Zelhof AC, Bao H, Hardy RW, Razzaq A, Zhang B *et al.* Drosophila Amphiphysin is implicated in protein localization and membrane morphogenesis but not in synaptic vesicle endocytosis. *Development*. 2001; **128**: 5005-5015.

Zhang M, Haapasalo A, Kim DY, Ingano LA, Pettingell WH *et al.* Presenilin/gamma-secretase activity regulates protein clearance from the endocytic recycling compartment. *FASEB J*. 2006; **20**: 1176-1178.

Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain*. 2011; **4**: 3.

Zhou J, Fan JY, Rangasamy D, Tremethick DJ. The nucleosome surface regulates chromatin compaction and couples it with transcriptional repression. *Nat Struct.Mol Biol*. 2007; **14**: 1070-1076.

Zhou W, Qing H, Tong Y, Song W. BACE1 gene expression and protein degradation. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; **1035**: 49-67.