

Sommaire

Introduction.....	1-2
I - Généralités sur la maladie d'Alzheimer	
I.1 - Épidémiologie et diagnostic.....	3
I.2 - Les marqueurs histopathologiques.....	3-6
- Les déficits synaptiques.....	4
- Les dégénérescences neurofibrillaires.....	5
- Les plaques séniles.....	5-6
I.3 - L'hypothèse amyloïde.....	6-8
II - Le métabolisme du peptide amyloïde-β	
II.1 Le précurseur APP.....	9-11
- Expression, structure et génétique.....	9-11
- Un rôle physiologique et neuronal majeur.....	11
II.2 - Le clivage alpha-sécrétase.....	12-13
- Une coupure dépendante des ADAM.....	13
- Un clivage neurotrophique.....	13
II.3 - Le clivage bêta-sécrétase.....	14-17
- La protéase acide BACE1.....	14-16
- Des isoformes aux rôles indéfinis.....	16
- L'activité enzymatique neuronale de BACE1.....	16-17
II.4 - La coupure gamma-sécrétase.....	18-21
- Une fonction pour les fragments cytosoliques de l'APP.....	19
- Le complexe γ -sécrétase.....	20-21
- Une activité enzymatique vitale.....	20
- Isoformes et génétique du complexe.....	21
II.5 - Le peptide amyloïde-β.....	22-25
- Les espèces critiques de la maladie d'Alzheimer.....	22-23
- Un peptide sécrété et intraneuronal ?.....	23
- Les mécanismes affectant la localisation du peptide amyloïde- β	24-25
II.6 - Le peptide amyloïde-β oligomérique.....	26-28
- Une neurotoxine potente.....	27-28

III - Les mécanismes de la protéostasie cellulaire

III.1 - La physio-pathologie de l'homéostasie protéique	29-31
III.2 - Mécanismes de la néosynthèse protéique.....	31-40
III.2.a - Le réticulum endoplasmique.....	32-33
III.2.b - Les chaperonnes.....	34
- Les lectines du RE.....	34-35
- Les HSP du RE.....	36
III.2.c - Les systèmes EDEM/ERAD.....	36-40
- Reconnaissance par le système EDEM.....	37
- Rétro-translocation hors du RE.....	37-38
- Le système ERAD.....	39
- Les ubiquitines-ligases.....	38-39
- Les complexes ERAD-L/M et C.....	39-40
III.3 - Alzheimer : Une maladie du RE ?.....	41-44
- Les chaperonnes altérées et relocalisées.....	41-42
- Les dysfonctionnements de l'ubiquitination.....	42-44
- L'inhibition du protéasome.....	44
III.4 - Le système UPR.....	45-63
- Trois senseurs complémentaires.....	45
- BiP, modulateur majeur de l'UPR.....	46
III.4.a - Perk.....	47-49
- Une inhibition de la traduction nécessaire à l'activation d'ATF4.....	48
- L'activation pro-apoptotique de CHOP.....	48
- Un senseur aux réponses opposées.....	49
III.4.b - ATF6.....	49-51
- Un régulateur des chaperonnes en association à XBP-1s.....	50
- ATF6 β et d'autres homologues aux rôles indéfinis.....	51
III.4.c - Ire1.....	51-55
- La fonction kinase d'Ire1.....	52-53
- La fonction endoribonucléasique atypique d'Ire1.....	54
- La fonction RIDD.....	55
- Ire1 : Le lien critique entre homéostasie et apoptose ?.....	55

III.4.d - XBP-1	56-58
- XBP-1s, un régulateur majeur de la biogenèse protéique.....	56
- Un facteur indispensable à l'homéostasie des tissus sécrétoires et du métabolisme....	57
- Des rôles dépendants d'associations multiples.....	58
III.4.e - L'UPR dans la maladie d'Alzheimer	59-63
- Les présénilines, un lien génétique avec l'UPR.....	59
- L'inhibition de la synthèse protéique et la formation de la mémoire.....	59-60
- Perk : un acteur indéfini de la maladie d'Alzheimer.....	61
- XBP-1s, stimulateur de la neurogénèse dans des conditions normales.....	61
- XBP-1s également neuroprotecteur en condition de stress.....	62
- Le rôle de XBP-1s dans l'UPR propre à la maladie d'Alzheimer reste à définir.....	63

IV - La régulation de l'expression de BACE1 dépendant de XBP-1s et impliquant HRD1 via le peptide amyloïde- β 1-42 oligomérique

IV.1 - La modulation de l'expression et de l'activité de BACE1 par les oligomères de peptide amyloïde-β 1-42	64
IV.2 - Les oligomères de peptide amyloïde-β 1-42 induisent l'épissage de XBP-1s	65
IV.3 - L'expression de XBP-1s réprime l'expression protéique et l'activité de BACE1	65
IV.4 - L'invalidation génétique de XBP-1 augmente l'expression protéique et l'activité de BACE1	66
IV.5 - Le contrôle de XBP-1s sur BACE1 n'est pas transcriptionnel	66
IV.6 - XBP-1s peut contrôler seul la transcription de l'ubiquitine ligase HRD1	67
IV.7 - Les oligomères de peptide amyloïde-β 1-42 induisent l'expression de HRD1, sous contrôle de XBP-1s	67
IV.8 - HRD1 module BACE1 de façon post-traductionnelle en affectant sa demi-vie	68
IV.9 - L'invalidation de XBP-1 augmente l'expression de BACE1 en présence d'oligomères de peptide amyloïde-β 1-42	69
IV.10 - Conclusion	69
Publication	70

V - La restauration de la plasticité synaptique et de la mémoire hippocampique par XBP-1s via la voie Kalirin-7 dans un modèle Alzheimer	
V.1 - La plasticité et la mémoire hippocampique sont améliorées par XBP-1s dans un modèle de souris Alzheimer.....	71-72
V.2 - XBP-1s et les oligomères de peptide amyloïde- β 1-42 peuvent réguler le récepteur Kalirin-7 de façon opposée.....	72-73
V.3 - La voie Kalirin-7 est diminuée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.....	73
V.4 - L'inhibition de la Kalirin-7 diminue les capacités mémorielles des souris du groupe contrôle.....	73-74
V.5 - XBP-1s active la plasticité synaptique via la signalisation Kalirin-7 dans les souris 3xTgAD.....	74-75
V.6 Conclusion.....	75
Publication.....	76

VI - Discussion

- L'agrégation protéique pathologique et non pathologique.....	77
- Un système UPR submergé et pro-apoptotique.....	78-79
- Ire1 et XBP-1s comme signaux de la protéostasie cellulaire.....	79-80
- Le protéasome : Une interface entre les lésions de la maladie d'Alzheimer.....	80
- XBP-1s, un acteur majeur de la vie neuronale.....	81
- L'UPR comme cible thérapeutique.....	81-84
Index des tables et figures.....	85
Références.....	86-121

Introduction

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative progressive liée à l'âge qui détériore premièrement les fonctions liées aux mémoires de travail et épisodique, avant de s'étendre à l'ensemble des procédures mémorielles dans les stades plus avancés. Les symptômes sont d'abord caractérisés par des confusions quotidiennes, des difficultés à planifier ainsi que des troubles du langage, de la perception du temps et des lieux. Le comportement et le caractère de la personne atteinte sont ensuite altérés, avec une augmentation de l'agressivité, de l'anxiété, ainsi qu'une propension à l'isolement. Dans les stades terminaux de la maladie, la personne perd totalement son autonomie et présente des difficultés sévères d'expression et un comportement apathique prononcé et doit être placée sous surveillance médicale permanente. Bien que rarement mortelle en elle-même, cette maladie rend le traitement d'autres pathologies difficile et réduit significativement l'espérance de vie des personnes touchées. Pour le moment, il n'existe aucun traitement efficace pour cette maladie.

Au niveau histologique, la maladie d'Alzheimer est caractérisée par l'accumulation extra- et intracellulaire de différentes protéines agrégées (appelées amyloïde) dans les tissus cérébraux, entraînant à terme des dysfonctions importantes du circuit neuronal. De fait, la majorité des approches thérapeutiques actuelles en développement consistent à réduire ou supprimer ces agrégats protéiques. Cependant, puisque la maladie d'Alzheimer est étroitement corrélée au vieillissement, certaines de ses caractéristiques biologiques sont parfois confondues avec celles du vieillissement non pathologique. L'une de ces caractéristiques est la diminution des différents mécanismes liés à l'homéostasie protéique (protéostasie). L'hypothèse suivie au cours de mes travaux est que le rétablissement de ces mécanismes diminués par l'âge constituerait une approche thérapeutique crédible, complémentaire aux approches actuelles, à la pathologie complexe qu'est la maladie d'Alzheimer. C'est en suivant cette optique que je me suis intéressé au rôle et à la régulation de l'un des systèmes majeurs du contrôle de la protéostasie : l'UPR (unfolded protein response), et en particulier au facteur de transcription XBP-1s, considéré comme l'une des pièces maîtresses de ce réseau de signalisation cellulaire. Quel rôle peut exercer XBP-1s

dans le contexte pathologique de la maladie d'Alzheimer ? Quel contrôle peut-il avoir sur la production et l'accumulation des différents peptides amyloïdogènes, ou sur la machinerie responsable de leur production ? Afin de saisir le contexte de ces questions, une première partie de ce manuscrit sera dédiée aux généralités de la maladie d'Alzheimer ainsi qu'à l'une des hypothèses initiales avancée pour expliquer l'étiologie moléculaire de la pathologie : la cascade amyloïde. Une seconde partie détaillera le métabolisme et la biologie des peptides amyloïdogènes. Enfin, la troisième partie exposera les mécanismes de la protéostasie et leur modulation dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Les résultats que j'ai obtenus et publiés au cours de ma thèse montrent l'implication du facteur de transcription XBP-1s dans la régulation de l'expression d'une enzyme clé de la pathologie : BACE1, responsable de la production du peptide amyloïde. D'autres travaux auxquels j'ai participé révèlent également XBP-1s comme un modulateur de la plasticité synaptique dans des conditions pathologiques via des voies de signalisations neuronales, palliant certains déficits cognitifs observés dans un modèle animal de la maladie d'Alzheimer. Ces résultats viendront soutenir une discussion autour de l'utilisation possible des membres de l'UPR et principalement de XBP-1s en tant que cibles thérapeutiques potentielles.

I - Généralités sur la maladie d'Alzheimer

I.1 - Épidémiologie et diagnostic

La maladie d'Alzheimer porte le nom de son principal découvreur au cours des années 1900, le neuropathologiste et psychiatre Aloïs Alzheimer. Depuis sa mise en évidence, le nombre de cas de maladie d'Alzheimer en France n'a cessé d'augmenter, atteignant le chiffre de 900,000 cas en 2015, avec 225,000 nouveau cas diagnostiqués chaque année. Au niveau mondial, en 2015, 46,7 millions de personnes sont atteintes d'une démence, les prédictions annonçant un doublement de ce chiffre tous les 20 ans, ce qui porterait le nombre de cas de démence dans le monde à 131 millions en 2050 (**Alzheimer World Report 2015**), 60 à 70% de ces démences sont de type Alzheimer. La maladie d'Alzheimer étant une maladie progressive et incapacitante pouvant dégénérer sur une décennie ou plus, les coûts humains et médicaux de la pathologie sont parmi les plus élevés (Rapport **Alzheimer's Association 2016**). L'absence de traitements définitifs ainsi que l'augmentation toujours plus grande de la prévalence de la maladie appellent à un devoir d'implication fort de la recherche dans ce domaine.

Le diagnostic de la maladie d'Alzheimer est longtemps resté tardif, après une manifestation des principaux symptômes et basé sur des critères d'exclusion. Bien que toujours complexes, les méthodes de diagnostic ont progressé et permettent aujourd'hui un dépistage plus précoce, notamment grâce à des tests neuropsychologiques plus spécifiques et des avancées concernant les différentes techniques d'imagerie médicale. Le diagnostic formel de la pathologie est cependant toujours post-mortem, la recherche de nouveaux marqueurs biologiques de la maladie reste donc cruciale.

I.2 - Les marqueurs histopathologiques

Les analyses post-mortem de cerveaux provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont révélé différentes lésions qui sont devenues caractéristiques de la pathologie. À l'échelle macroscopique, une atrophie cérébrale plus rapide peut être observée

si on compare des cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer à différents âges relativement à des cerveaux contrôles (**Fotenos A. F. et al., 2005**). Cependant, l'atrophie cérébrale n'est pas unique à la pathologie et peut se produire dans d'autres maladies neurodégénératives. Ce critère de diagnostic n'est pas abandonné puisque les techniques d'imagerie récentes montrent que certaines altérations du volume cérébral sont beaucoup plus spécifiques à la maladie d'Alzheimer, notamment au niveau de l'hippocampe, du cortex enthorinal et du lobe temporal médian (**Adlar P. A. et al., 2014**).

D'autres lésions, considérées comme canoniques de la pathologie, sont révélées par des examens plus poussés. Elles peuvent être extra-cellulaires : Les plaques bêta-amyloïdes (appelées aussi plaques séniles), ou intracellulaires : les dégénérescences neurofibrillaires. Enfin, on observe également des déficits synaptiques plus importants chez les personnes atteintes de maladie d'Alzheimer (**Terry R. D. et al., 1991**). Il est essentiel de souligner que ces lésions peuvent être présentes chez des personnes qui ne montrent pas les altérations cognitives associées à la maladie d'Alzheimer, notamment dans la population âgée de plus de 85 ans (**Arriagada P. V. et al., 1992**). C'est donc la mise en évidence de ces lésions par différentes techniques combinées à des examens psychologiques qui permettent de diagnostiquer la pathologie.

Les déficits synaptiques

Le phénotype neurodégénératif des cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer est caractérisé par une diminution importante du nombre de terminaisons synaptiques entre les neurones, notamment dans la région du cortex frontal, avec une réduction de 40 à 50% de la quantité de boutons pré-synaptiques observés par immuno-marquage ou par microscopie électronique quantitative (**Scheff S. W. et al., 2001 ; Terry R. D. et al., 1991**). Ces diminutions sont également accompagnées d'un remodelage pathologique du réseau synaptique, traduit principalement par une augmentation du nombre de neurites dystrophiques. Les déficits cognitifs associés à la maladie d'Alzheimer sont fortement corrélés à ces perturbations du réseau synaptique.

Les dégénérescences neurofibrillaires

Cette lésion est considérée comme la plus précoce de la maladie d'Alzheimer et fut l'une des premières à y être associée. Sa présence seule n'est cependant pas spécifique à cette pathologie, les dégénérescences neurofibrillaires (NFT) pouvant être observées dans d'autres maladies plus généralement appelées taupathies (**Wisniewski K. et al., 1979 ; Iwatsubo T. et al., 1994**). C'est la distribution particulière des NFT dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, notamment dans le cortex entorhinal et l'hippocampe, qui rend cette lésion caractéristique (**Haroutunian V. et al., 2007**).

Les NFT sont provoquées par l'hyperphosphorylation de la protéine tau entraînant son agrégation (**Goedert M., 1996**). Normalement associée aux microtubules des cellules nerveuses, tau contribue à leur polymérisation et à la formation des dendrites et axones neuronaux ainsi qu'au trafic cellulaire. Lorsqu'elle n'est plus liée aux microtubules, la protéine tau libre et hyperphosphorylée va former de longs filaments appelés PHF (Paired Helical Filament). Ces filaments intracellulaires, combinés à la perte de fonction de la protéine tau sont corrélés à une augmentation de la mort neuronale (**Gendron T. F. et al., 2009**).

Les plaques séniles

Les plaques séniles sont majoritairement formées par l'accumulation et l'agrégation du peptide bêta-amyloïde ($A\beta$) en feuillets bêta insolubles (**Masters C. L. et al., 1985**). Ces feuillets constituent le cœur de la plaque sénile et réagissent à la coloration au rouge Congo devenue caractéristique de leur identification en histopathologie. Classiquement, une couronne d'axones ou dendrites (neurites) malformés ou immatures viennent entourer les plaques, ces dysfonctions de la structure neuronale pouvant contribuer de façon importante aux symptômes de la pathologie (**Marin M. A. et al., 2016**).

Le peptide A β lui-même est le produit du clivage séquentiel de son précurseur, la protéine APP (Amyloid precursor protein), par deux enzymes, les bêta- et gamma- sécrétases (**Zhang H. et al., 2012**). Le fragment final obtenu peut varier de façon importante en taille, de par la nature des différents types de clivages enzymatiques impliqués (Voir Chapitre II). Les formes les plus longues, en particulier le peptide A β 1-42, sont sensibles à l'agrégation et sont supposées entraîner les autres peptides amyloïdes monomériques solubles à former des oligomères, puis des fibrilles, et enfin, les plaques séniles (**Seeman P. et al., 2011**).

L'augmentation de la formation des plaques extra-cellulaires peut déclencher une réaction inflammatoire localisée, caractérisée par la présence de cellules microgliales activées et d'astrocytes aux abords des plaques séniles (**Dickson D. W. et al., 1988**). Ce profil cellulaire pro-inflammatoire peut contribuer aux neurodégénérescences observées dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Outre ces dépôts inter-neuronaux, d'autres amas insolubles de peptide amyloïde peuvent s'accumuler dans les parois des vaisseaux sanguins périphériques du cortex, entraînant alors une rupture des artérioles ainsi que des micro-angiopathies (ou Angiopathies Congophiles), qui peuvent s'avérer mortelles dans les stades avancés de la maladie (**Pearl D. P., 2010**).

I.3 - L'hypothèse amyloïde

Malgré l'accumulation de connaissances toujours plus importante à propos de la maladie d'Alzheimer, la recherche d'une étiologie claire est toujours en cours. L'une des premières théories à avoir été construite fut l'hypothèse de la cascade amyloïde, par Hardy et Higgins au début des années 1990 (**Hardy J. A., 1992**). Ce modèle considère le peptide A β , son accumulation et son agrégation en plaques séniles comme déclencheur de la pathologie, entraînant ensuite l'ensemble des perturbations observées (NFT, déficits synaptiques, inflammation, perturbation de l'homéostasie calcique, stress oxydatif et métabolique).

Les bases de l'hypothèse de la cascade amyloïde reposent sur des arguments génétiques forts. En effet, les cas familiaux très agressifs et précoces de maladie d'Alzheimer impliquent des mutations sur des gènes associées à la production de peptide A β , comme

l'APP ou les présénilines, protéines porteuses du site catalytique responsable du clivage amyloïdogène de l'APP (**Price D. L. et al., 1998**). Au niveau moléculaire, un corpus d'évidences conséquent soutient le rôle toxique des agrégats de peptide A β , autant *in vitro* que *in vivo* (**Walsh D. M. et al., 2002 ; Walsh D. M. et al., 2007**). La puissance de cette hypothèse a donc dirigé une vaste partie des efforts de recherche autour du peptide A β et au développement de moyens pharmaceutiques visant à réduire sa production ou à stimuler sa dégradation.

Cependant, au cours des décennies qui ont suivi, plusieurs critiques se sont levées contre l'hypothèse amyloïde. Des études plus récentes utilisant des techniques d'imagerie *in vivo* ont révélé une corrélation finalement incomplète entre la quantité de plaques séniles et la sévérité des symptômes de la pathologie, avec des patients asymptomatiques possédant également des plaques et représentant une fraction non négligeable de la population âgée (**Nordberg A. et al., 2008 ; Villemagne V. L. et al., 2008**).

D'autre part, bien que les modèles murins de la maladie surexprimant des formes mutées de la protéine APP et/ou des présénilines accumulent du peptide amyloïde et des plaques séniles dans leur cerveau, ils apparaissent incomplets pour plusieurs raisons :

- Ils ne développent pas de NFT comme suggéré par l'hypothèse amyloïde, des mutations supplémentaires sur le gène tau ou sur des gènes associés à tau comme p73 doivent être introduites pour reproduire cette lésion (**Phinney A. L. et al., 2003 ; Wetzke M. K. et al., 2008**).
- Ces modèles présentent bien des déficits cognitifs, qui sont réversibles via la diminution ou la suppression de la quantité de peptide amyloïde (par pharmacologie ou génétique) mais ces déficits ne sont pas toujours comparables à ceux identifiés chez l'humain (**Webster S. J. et al., 2013**). De plus, l'utilisation de fonds génétiques différents pour la mise au point des modèles murins introduit des biais supplémentaires sur les critères comportementaux étudiés (**Brown R. E. et al., 2007**). D'autres essais sur des modèles murins surexprimant uniquement le peptide A β 1-42, considéré comme l'espèce la plus toxique de peptide A β , et non son précurseur, ne montrent aucun signe de neurodégénération ou de déficits cognitifs (**Jungsu K. et al., 2013**).

Un autre coup porté à l'idée que le peptide A β est seul déclencheur de la maladie d'Alzheimer fut l'échec relatif des thérapies visant à réduire la quantité de peptide A β dans les cerveaux des patients affectés. Les molécules pharmacologiques ou les immunothérapies anti-peptide A β arrivées au stade d'essai clinique III ont bien réussi à réduire la quantité de plaques séniles et d'amyloïde dans les cerveaux des patients, mais les améliorations cognitives étaient légères et au mieux temporaires. Des effets secondaires parfois graves se sont ajoutés aux résultats mitigés (**Karran E. et al., 2011**).

En conséquence, l'hypothèse amyloïde s'est donc adaptée. Les plaques séniles elles-mêmes ne sont plus considérées comme l'élément toxique de la pathologie, ce sont les oligomères de peptides A β 1-42, capables de s'accumuler au niveau intracellulaire et à la surface des neurones qui engagent une série de cascades moléculaires conduisant à la dégénérescence des cellules (**Laferla F. M. et al., 2007 ; Selkoe D. J., 2006 ; Naslund J. et al., 2000**). Il est également suggéré que ces oligomères configurent des réponses cellulaires délétères capables de s'auto-alimenter, expliquant l'échec des thérapies anti-peptide A β qui seraient alors administrées trop tardivement, lorsque les symptômes de la pathologie sont déjà présents (**Montoliu-Gaya et al., 2016 ; Guëll-Bosch et al., 2016**). Si la toxicité des oligomères de peptide A β n'est pas contestée, leur rôle comme unique déclencheur de la pathologie ne fait plus l'unanimité. L'étiologie de la forme sporadique de la maladie d'Alzheimer devient alors complexe et multifactorielle, avec une part génétique révélée par les études génomiques globales (GWAS) combinée à une collection de facteurs environnementaux (traumas, ischémie cérébrale, diabète...) dont le plus important reste l'âge de l'individu (**Cacabelos R. et al., 2005 ; Querfurth H. W. et al., 2010 ; Swerdlow R. H., 2007**). Il paraît alors logique de s'intéresser aux mécanismes cellulaires affectés par le vieillissement, dont la perturbation pourrait précéder l'apparition des stigmates déjà connus de la maladie d'Alzheimer. En parallèle, il ne s'agit pas d'abandonner les hypothèses émises précédemment, mais plutôt d'essayer un nouvel angle de recherche plus large et fondamental. Les sécrétases et le peptide A β occupent toujours une place de premier plan, mais les mécanismes sous-jacents permettant de maintenir la pathologie malgré les traitements pharmacologiques doivent être élucidés.

II - Le métabolisme du peptide amyloïde- β

II.1 - Le précurseur APP

Le gène codant l'APP a été identifié au cours des années 1980 en isolant la séquence d'acides aminés constituant le peptide amyloïde, purifié à partir des plaques séniles, puis en clonant l'ADN complémentaire correspondant à cette séquence (**Glenner G., et al., 1984 ; Tanzi R. E., et al., 1987**). Il s'est finalement avéré que le peptide amyloïde provenait du clivage d'un précurseur transmembranaire présent à la surface des cellules : l'APP.

Expression, structure et génétique

L'expression de l'APP dans les différents types cellulaires varie en fonction de ses isoformes mais se trouve très enrichie dans le cerveau. Son gène est localisé sur le chromosome 21 et sa séquence codante contient 18 exons. Les trois isoformes les plus exprimés sont : l'APP 770, qui possède l'ensemble des exons, l'APP 751 auquel l'exon 8 est manquant et l'APP 695 dont les exons 7 et 8 sont manquants (Voir **Figure 1**). Les deux premiers sont ubiquitaires (**Yoshikai S., et al., 1990**) et le dernier préférentiellement exprimé dans les neurones, où il constitue la source majeure de production de peptide amyloïde dans le cerveau (**Sandbrink R., et al., 1993**). D'autres isoformes sont exprimés dans certaines cellules de l'immunité (Macrophages, microglies, lymphocytes, astrocytes), ils dépendent de l'épissage de l'exon 15 et sont appelés L-APP (**Pangalos M. N. et al., 1995**).

L'APP est une glycoprotéine transmembranaire constituée d'un domaine C-terminal hydrophobe AICD (APP IntraCellular Domain) ancré dans la membrane cellulaire, ainsi que de trois parties extra-cellulaires, les domaines E1, E2 et le domaine inhibiteur de protéase de Kunitz (Kunitz Protease Inhibitor KPI) présent uniquement dans les formes 770 et 751. Les domaines E1 et E2 sont impliqués dans des interactions avec la matrice extracellulaire et l'adhésion cellulaire, ainsi que dans la dimérisation de l'APP avec ses différents isoformes ou paralogues (**Dahms S. O., et al., 2010 ; Soba P., et al., 2005**). Plusieurs études ont pointé des variations d'épissages des différents isoformes en fonction des conditions

physiologiques de l'individu. Les KPI-APP 770 et 751 s'accumulent dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer (**Menendez-Gonzales M., et al., 2005**). Leur expression est également augmentée à la suite d'activations extra-synaptiques des récepteurs au NMDA (acide N-Méthyl-D-Aspartique) qui est corrélée à une augmentation de la production de peptide amyloïde (**Bordji K., et al., 2010**).

En plus de ses isoformes l'APP a deux paralogues, l'APLP1 et 2 (Amyloid Precursor Like Protein (Voir **Figure 1**) (**Wasco W. et al., 1992 ; Wasco W. et al., 1993**). Ce sont également des glycoprotéines transmembranaires, avec une caractéristique importante : leur séquence intramembranaire C-terminale diffère de l'APP, ce qui implique l'absence de la séquence correspondant au peptide amyloïde (**Zhang H. et al., 2012**). APLP1 est exprimé majoritairement dans le cerveau humain alors que APLP2 est ubiquitaire. Leur rôle semble lié à une redondance fonctionnelle puisque la délétion génétique de l'un ou l'autre des APLP ou de l'APP seul n'est pas létale chez la souris et n'entraîne pas de stérilité, alors qu'une double délétion APLP1/APP ou APLP1/2 ou une triple délétion provoque une mort post-natale très précoce (**Heber S. et al., 2000**). La double délétion APLP2/APP permet un développement normal de la souris, suggérant un rôle de compensation important de APLP1 lorsque les autres gènes sont invalidés (**Koch C. S. et al., 1997**).

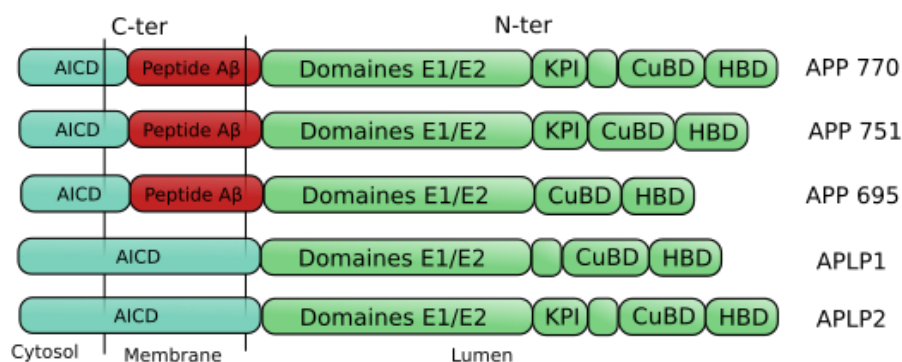


Figure 1 : Les isoformes et paralogues de l'APP. L'APP 770 complet (18 exons), possède les domaines d'interaction E1 et E2, le domaine d'inhibition des protéases de Kunitz (exon 7), ainsi qu'un domaine de liaison au cuivre (CuBD) et un domaine de liaison à l'héparine (HBD). L'APP 695 ne possède pas l'exon 7 et 8, donc aucun domaine KPI. La présence ou absence de ce domaine module l'activité de certaines protéases, comme la γ -sécrétase. Le domaine HBD permet la stimulation du rôle de l'APP dans la synaptogénèse en liant des protéoglycans ayant une structure semblable à l'héparine. Les deux paralogues APLP1 et APLP2 ont comme caractéristique majeure l'absence de la séquence du peptide amyloïde- β .

Dans le cadre de la maladie Alzheimer, les analyses génétiques du gène de l'APP ont révélé 54 mutations pouvant affecter la production du peptide amyloïde, localisées dans la séquence ou autour de la séquence codant pour le peptide amyloïde (**Cacace R. et al., 2016**). La majorité de ces mutations sont faux-sens et possèdent une forte pénétrance d'une génération à l'autre, et sont corrélées à un âge d'apparition plus précoce de la maladie. Vingt-cinq de ces mutations sont des duplications partielles du gène de l'APP et modifient également l'âge d'apparition de la pathologie en fonction du nombre de duplications (**Hooli B. V. et al., 2012**). Parmi ces 54 mutations, 2 seulement sont considérées comme non pathologiques et réduisent la production d'amyloïde ou l'agrégation du peptide : la mutation A673T APP 'Islandaise' et la mutation A673V lorsque non homozygote, respectivement (**Di Fede G. et al., 2009 ; Jonsson T. et al., 2012**).

Un rôle physiologique et neuronal majeur

L'un des rôles physiologiques de l'APP totale est lié à l'adhésion extra- et intercellulaire via la présence de ses régions E1 et E2. Notamment, l'activation de l'expression de l'APP et ses interactions avec la matrice extra-cellulaire augmentent significativement la synaptogénèse des neurones (**Small D. H. et al., 1999**). Mais de par sa similarité structurelle avec d'autres récepteurs de surface comme la protéine Notch-1, l'implication de l'APP dans des processus de signalisation cellulaire a également été révélé. L'ectodomaine de l'APP peut interagir avec différents ligands, dont le peptide A β lui-même, qui peut alors moduler sa propre production (**Lorenzo A. et al., 2000**). Parmi ces ligands, la F-Spondine, une glycoprotéine neuronale sécrétée en réponse à certains stress, peut inhiber le catabolisme de l'APP en liant son ectodomaine extra-cellulaire (**Ho A. et al., 2004**). D'autres ligands comme la Nétrine-1 ou encore le récepteur Nogo-66 peuvent interagir avec l'APP, avec comme point commun la modulation de la production des catabolites de l'APP et donc de sa capacité de signalisation (**Lourenço F. C. et al., 2009 ; Park J. H. et al., 2006**). L'étude de la protéolyse de la protéine APP représente un pan entier de la recherche en rapport avec la maladie d'Alzheimer.

II.2 Le clivage alpha-sécrétase

Le métabolisme neuronal de l'APP peut suivre deux voies majeures distinctes : la voie non-amyloïdogène, inhibant la production de peptide amyloïde, et la voie amyloïdogène productrice de peptide amyloïde (Voir **Figure 2**). La première engage le clivage du précurseur APP par les alpha-sécrétases, à l'acide aminé 17 de la séquence du peptide amyloïde. Cette coupure libère un fragment extra-cellulaire sAPP α (secreted amyloid protein precursor alpha) ainsi qu'un fragment transmembranaire C83. Un second clivage intramembranaire par la gamma-sécrétase produit les peptides P3 et AICD à partir du C83. De par la position du site de clivage de l'alpha-sécrétase, la formation des espèces du peptide amyloïde- β considérées comme les plus agrégantes et toxiques (A β 1-42 et A β 11-42) est prévenue (Voir **Figure 1**) (Esch F. S. et al., 1990).

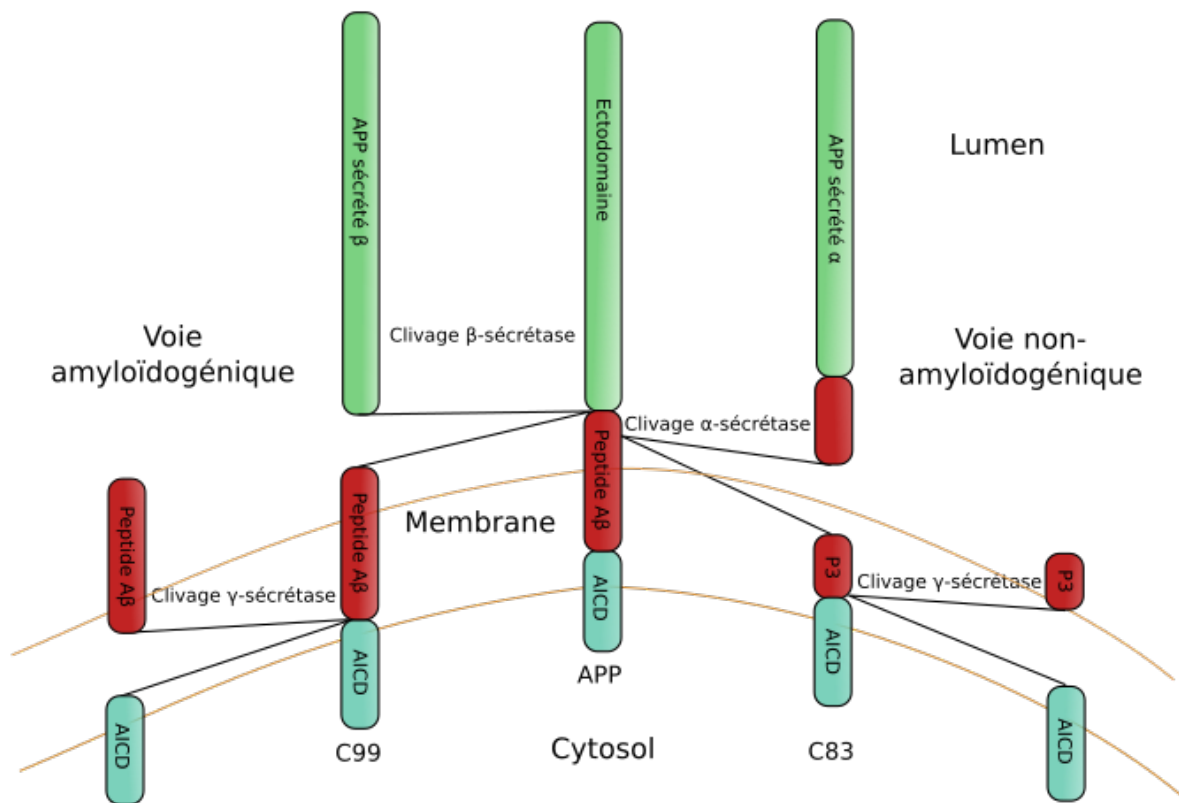


Figure 2 : Les différentes voies de catabolisme de l'APP. La voie non-amyloïdogénique du catabolisme de l'APP est initiée par le clivage α -sécrétase (voir texte). La voie dite amyloïdogénique engage le clivage β -sécrétase, situé au début de la séquence du peptide amyloïde- β . Une partie sécrétée APP β N-terminale est produite, ainsi qu'un fragment C-terminal membranaire. Le C99 subit un ultime clivage γ -sécrétase responsable de la production du peptide amyloïde- β 1-42 total. En miroir à la voie non-amyloïdogénique, un peptide AICD est produit lors de la coupure.

Une coupure dépendante des ADAM

Le clivage alpha-sécrétase de l'APP est attribué à la famille des protéases transmembranaires ADAM (A disintegrin and metalloprotease), impliquée dans le clivage et la sécrétion de nombreux domaines extra-cellulaires régulant la production de facteurs de croissance ou de cytokines. Trois membres de cette famille ont été associés au métabolisme de l'APP : ADAM9, ADAM10 et ADAM17 (**Koike H. et al., 1999 ; Lammich S. et al., 1999 ; Buxbaum J. D. et al., 1998**). L'invalidation génétique des ADAM10 et 17 est létale au stade embryonnaire, la première participant à la régulation de la voie de signalisation Notch et à la maturation des cadhérines, la seconde au clivage de l'EGF (Epidermal Growth Factor) (**Deuss M., 2016**). L'invalidation conditionnelle *in vivo* de ADAM10 affecte de façon très variable la formation des fragments sAPP α à partir de l'APP, alors que l'invalidation de ADAM9 et ADAM17 paraît sans effets sur cette voie métabolique (**Kuhn P. H. et al., 2010**). Ces résultats ont placé ADAM10 comme responsable du clivage constitutif alpha-sécrétase, d'autant que sa surexpression *in vivo* réduit aussi la quantité de plaques amyloïdes dans les cerveaux des modèles murins de la maladie d'Alzheimer (**Postina R. et al., 2004**). L'activité enzymatique d'ADAM10 dans le clivage d'autres substrats neuronaux (N-cadherine, Ephrine A1 et A5, Neuroligine-1) suggère également son rôle important dans l'apparition des déficits synaptiques associés à la pathologie (**Saftig et al., 2015**).

Un clivage neurotrophique

Le fragment sAPP α lui-même est considéré comme neuroprotecteur, favorisant la formation des synapses et l'adhésion cellulaire, également facteur de croissance neuronal aux stades embryonnaires et à l'âge adulte (**Mattson M. P. et al., 1993 ; Gakhar K. N., et al., 2008 ; Ohsawa I. et al., 2008**). La surexpression seule de ce fragment peut inverser la plupart des déficits anatomiques et cognitifs observés chez les souris dont le gène de l'APP a été invalidé de façon conditionnelle, suggérant la dépendance physiologique des neurones au sAPP α plutôt qu'à son précurseur complet (**Ring S. et al., 2007**).

II.3 - Le clivage bêta-sécrétase

La voie amyloïdogénique du métabolisme de l'APP est initiée par la coupure β -sécrétase du précurseur APP. Deux sites de clivages ont été identifiés, le site β et β' , l'un situé au début de la séquence du peptide amyloïde et l'autre à 11 acides aminés dans la séquence (**Vassar R., et al., 1999**). Un fragment sAPP β (secreted amyloid precursor protein beta) extra-cellulaire est libéré suite à cette coupure, ainsi qu'un fragment intramembranaire C99 (site β) ou C89 (site β'). Dans ces conditions, le second clivage gamma-sécrétase du fragment intramembranaire C99 peut produire le peptide amyloïde- β 1-42 complet ainsi que le peptide AICD. Un peptide amyloïde tronqué (11-42) est produit par le clivage gamma-sécrétase du C89 avec son fragment AICD correspondant. Si les deux sites β et β' existent, l'une ou l'autre coupure est favorisée en fonction de la localisation cellulaire de l'APP et de la β -sécrétase. Le clivage β prédominant dans le réticulum endoplasmique et le clivage β' dans les compartiments trans-golgiens (**Huse J. T. et al., 2002**). L'augmentation des produits des deux types de clivages peut être observée dans les cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer, et les peptides amyloïdes A β 1-42 et 11-42 sont tout les deux retrouvés dans les plaques séniles. Cependant, les mutations familiales de l'APP comme la double mutation suédoise tendent à favoriser le clivage β et donc l'accumulation de peptide amyloïde 1-42 (**Quahwash I. et al., 2004 ; Tomasselli et al., 2003**).

La protéase acide BACE1

L'enzyme responsable du clivage β -sécrétase a été identifiée, clonée en 1999 et nommée BACE1 (β amyloid cleaving enzyme 1) (**Vassar et al., 1999**). La forme mature de BACE1 est une glycoprotéine caractérisée comme une protéase aspartique transmembranaire, assimilée à la famille des protéases aspartiques rétrovirales. BACE1 est composée de deux domaines et porte les résidus responsables de son activité catalytique sur son ectodomaine (**Hong L. et al., 2000**). L'ADNc de BACE1 code une pré-pro-enzyme de 501 acides aminés, possédant un peptide signal de 21 acides aminés, clivé pour produire proBACE1, possédant un pro domaine de 24 acides aminés (Voir **Figure 3**) (**Sinha S. et al., 1999**).

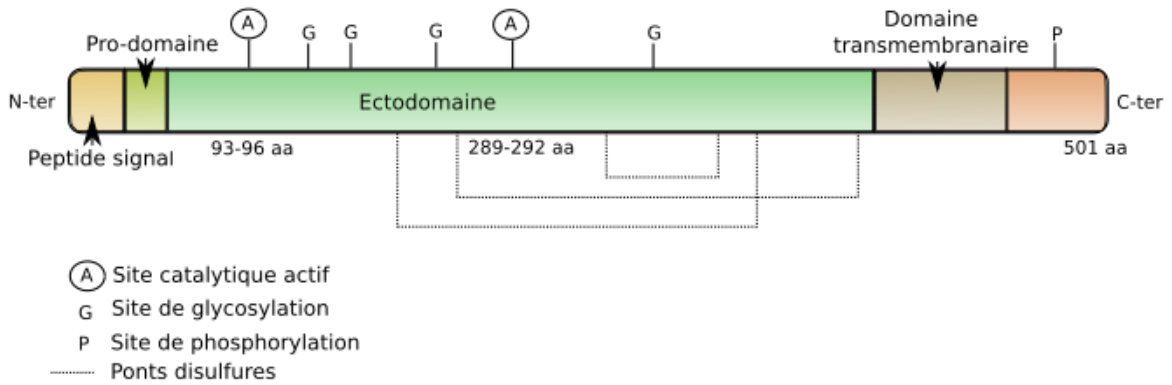


Figure 3 : Structure de BACE1. BACE1 possède un long ectodomaine ainsi qu'une partie transmembranaire courte et une queue cytosolique de 24 acides aminés. Plusieurs sites de glycosylation sont localisés aux alentours des deux sites catalytiques. Six résidus cystéines de l'ectodomaine permettent la formation de ponts disulfures et sont indispensables à la maturation ainsi qu'à l'inclusion de la protéine dans la membrane, mais n'affectent que peu son activité enzymatique. Les résidus cystéines sont également cibles des réactions de nitrosylation ou de palmytoylation, un haut niveau de nitrosylation étant associé à une diminution de l'activité β -sécrétase, sans affecter la stabilité de la protéine. (Figure reprise de Kwak Y. D. et al., 2011)

Il est notable que proBACE1 conserve une activité enzymatique, bien que sous-optimale, et que l'inhibition de sa conversion vers sa forme mature *in vivo* n'est pas suffisante pour supprimer son activité (Ermolieff et al., 2000). Différentes modifications post-traductionnelles de BACE1 peuvent réguler sa stabilité, son adressage ou son activité, comme la phosphorylation, la palmitoylation, la sulfatation et notamment la glycosylation des résidus proches de ses sites catalytiques (Walter J. et al., 2001 ; Benjannet S. et al., 2001 ; Haniu M. et al., 2000). BACE1 est adressée à la membrane cellulaire, via le réticulum endoplasmique ainsi que le réseau de Golgi, puis subit un processus d'endocytose. Le pH optimal d'activité de BACE1 étant bas (3,5 - 4,4), les endosomes et les lysosomes sont décrits comme les compartiments possédant la plus forte activité β -sécrétase (Venugopal., 2008). Cependant, l'inhibition de l'endocytose n'est pas suffisante pour éliminer toute l'activité β -sécrétase cellulaire, confirmant la présence de BACE1 actif dans d'autres compartiments ou à la membrane plasmique (Chyung J. H. et al., 2003).

Des isoformes aux rôles indéfinis

BACE1, comme l'APP, est une protéine dont la présence est très enrichie dans les neurones. Cinq isoformes issus d'épissages alternatifs ont également été identifiés (nommés, 476, 457, 455, 432 et 127) leur expression dans le cerveau et leur affinité pour l'APP étant très variable d'un isoforme à un autre (**Holsinger D. R. M. et al., 2012**). Le rôle de ces isoformes dans la régulation du métabolisme de l'APP ainsi que dans la production du peptide amyloïde reste à élucider. Un homologue de BACE1, BACE2, partage 71% d'homologie avec BACE1 (**Xi H. et al., 2000**). BACE2 possède un mode d'expression similaire à BACE1, avec une présence accrue dans les structures Golgiennes et à la membrane cellulaire (**Ehehalt R. et al., 2002**). Cependant, son niveau d'expression est beaucoup plus faible dans le cerveau et restreint aux cellules gliales plutôt qu'aux neurones (**Laird F. M. et al., 2005**). De plus, si BACE2 peut cliver l'APP, sa coupure est plus proche du site α -sécrétase que β -sécrétase, aux acides aminés 19 et 20 de la séquence du peptide amyloïde, initiant une voie non-amyloïdogène du métabolisme de l'APP (**Farzan M. et al., 2000**). L'invalidation génétique de BACE1 seule est d'ailleurs suffisante pour abolir totalement la production de fragments C-terminaux issus de la coupure β -sécrétase de l'APP ainsi que de peptide d'amyloïde- β (**Luo Y. et al., 2001**).

L'activité enzymatique neuronale de BACE1

Les produits directs du clivage de l'APP par BACE1 possèdent des rôles physiologiques encore mal définis. À l'inverse du fragment sAPP α , le fragment sAPP β est dépourvu de fonction neuroprotectrice et peut agir comme un activateur de la caspase 6 et régulateur de la mort neuronale (**Furukawa K. et al., 2002 ; Nikolaev A. et al., 2009**). D'autre part, de nombreuses preuves associent les fragments C-terminaux transmembranaires (C99, C89), accumulés dans les endosomes et les structures lysosomiales, à des dysfonctionnements majeurs de ces processus, notamment via la sur-activation de la protéine endosomale Rab5 (**Laifendeld D. et al., 2007 ; Lauritzen I. et al., 2016**). Ces déficits peuvent entraîner la mort neuronale et sont corrélés à l'insuffisance de sécrétion cholinergique observée dans les modèles *in vivo* de la pathologie d'Alzheimer (**Jiang Y. et al., 2016 ; Kim S. et al., 2015**).

L'invalidation génétique de BACE1 dans un modèle murin d'Alzheimer est suffisante pour inverser la majorité des lésions associées à la cascade amyloïde. Cependant, l'APP n'est pas le plus affin ni le seul substrat de BACE1 (**Gruninger-Leitch F. et al., 2002**). En conséquence, les souris déficientes en BACE1 ont une durée de vie plus courte et développent d'autres types de désordres neurologiques (**Dominguez D. et al., 2005 ; Hitt B. D. et al., 2010**). Parmi les autres cibles connues de BACE1, qui sont toutes des protéines transmembranaires, on retrouve : LDLR-LRP (low density lipoprotein receptor-related protein), les sous-unités β des canaux sodium VGSC β et SCN2B, PSLG-1 (P-selectine glycoprotein-ligand) et les NRG 1 et 3 (Neurégulines 1 et 3) (**Vassar R. et al., 2009**). Certaines de ces cibles, comme LDLR-LRP (transporteur de l'APP et l'ApoE, pouvant aussi réguler la production et la clairance du peptide amyloïde) sont directement impliquées dans la biologie de la maladie d'Alzheimer (**Yoon I. S. et al., 2005**).

Bien qu'aucune forme héréditaire de la maladie d'Alzheimer n'implique une mutation génétique de BACE1, de nombreux types de stress corrélés à la pathologie sont activateurs de l'expression ou de l'activité β -sécrétase (Inflammation, hypoxie, ischémie, perturbation de l'homeostasie calcique, stress oxydatif, stress réticulaire...) (**Chami L. et al., 2012**). L'activité de BACE1 peut-être augmentée dans les cerveaux des patients atteints de formes sporadiques et familiales de maladie d'Alzheimer, elle est ainsi considérée comme un fort contributeur à la neurodégénération (**Yang L. B. et al., 2003**). De fait, BACE1 est également une cible thérapeutique actuelle d'importance.

II.4 - La coupure gamma-sécrétase

L'activité γ -sécrétase est nécessaire aux voies non-amyloïdogéniques et amyloïdogéniques du métabolisme de l'APP. Elle implique plusieurs coupures séquentielles de son substrat, le premier clivage est appelé ζ - (zêta) suivi de ϵ - (epsilon) et γ - (gamma) (Voir **Figure 4**) (Zhao G. et al., 2005 ; Weidemman A. et al., 2000). Cette variabilité est dépendante de l'affinité γ -sécrétase qui reconnaît une conformation particulière de son substrat dans la membrane plutôt qu'une séquence d'acides aminés spécifiques (Ren Z. et al., 2007). Les clivages produisent donc des fragments peptidiques de tailles différentes (Voir **Figure 4**), les AICDs en C-terminal et le peptide amyloïde- β en N-Terminal (ou le peptide P3 pour la voie non-amyloïdogénique).

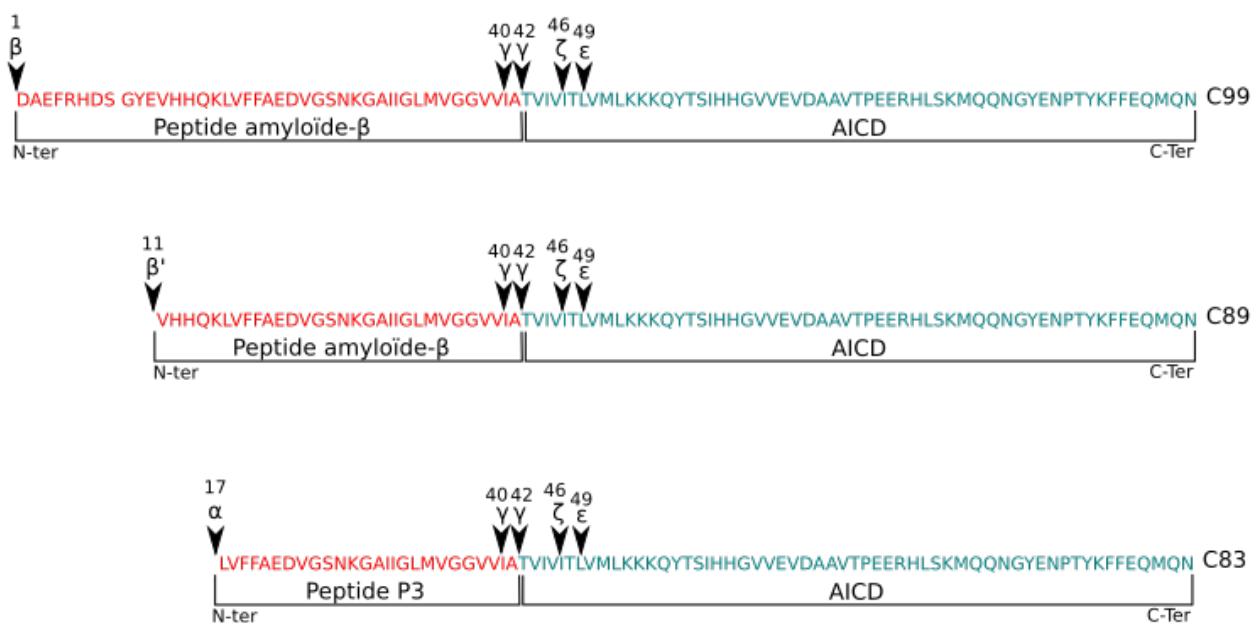


Figure 4 : Les différentes coupures de la partie intramembranaire de l'APP. Les premières étapes du métabolisme de l'APP génèrent différents fragments C-terminaux transmembranaires, C99 et C89 issus de la coupure β - ou β' - de la β -sécrétase, ou C83 issu de la coupure α -sécrétase. La digestion enzymatique des différents sites de clivages de la γ -sécrétase est exclusivement intramembranaire. Plusieurs clivages séquentiels vont produire des fragments cytosoliques ou sécrétés de taille variable. Le catabolisme du C99 et du C89 par la γ -sécrétase peut libérer les peptides amyloïde- β 1-40 et 1-42 ou 11-40 et 11-42 en N-terminal. Des fragments cytosoliques AICD sont relâchés dans le cytoplasme. Le clivage du C83 ne peut produire de peptide amyloïde- β et sa digestion enzymatique mène au peptide P3 ainsi qu'à la formation d'AICD.

Une fonction pour les fragments cytosoliques de l'APP

Outre les effets potentiellement cytotoxiques des différentes espèces de peptide amyloïde- β (qui seront abordés plus loin), l'accumulation des AICDs a aussi été connectée à des processus cellulaires délétères (Lu D. C. et al., 2000). Difficile à étudier *in vivo* car rapidement dégradés, l'une des voies d'action proposée des AICDs est via le recrutement de partenaires, les plus caractérisés étant Tip60 et Fe65 (Cao X. et al., 2001), permettant la formation de complexes transcriptionnellement actifs. Ces complexes peuvent réguler la transactivation de différents gènes (non-exhaustif : p53, GSK-3 β , Neprilysine), et favoriser certaines voies cytotoxiques pro-apoptotiques (Alves da Costa et al., 2006 ; Kim H. S. et al., 2003) ou encore contrôler la dégradation du peptide amyloïde- β (Pardossi-Piquard et al., 2005). La contribution exacte des AICDs dans le développement de la pathologie Alzheimer reste encore à préciser.

Le complexe γ -sécrétase

L'activité γ -sécrétase est associée à un complexe protéique de haut poids moléculaire, composé de quatre sous-unités, suivant une maturation, un assemblage et un adressage précis. La formation du complexe débute dans le réticulum endoplasmique où les deux premières sous unités sont assemblées : l'APH1 (anterior pharynx defective 1) et la nicastrine immature. La préséniline-1, porteuse de l'activité catalytique γ -sécrétase, se lie ensuite au sous-complexe. Le dernier membre, PEN-2, s'incorpore et stabilise l'assemblage (Voir Figure 5) (Dries D. R. et al., 2008). La préséniline-1 subit ensuite une endoprotéolyse et le complexe hétérotétramérique peut-être exporté jusqu'à la membrane plasmique, son activité étant majoritairement détectée à la membrane cellulaire et dans les endosomes précoces (Kaether C. et al., 2006).

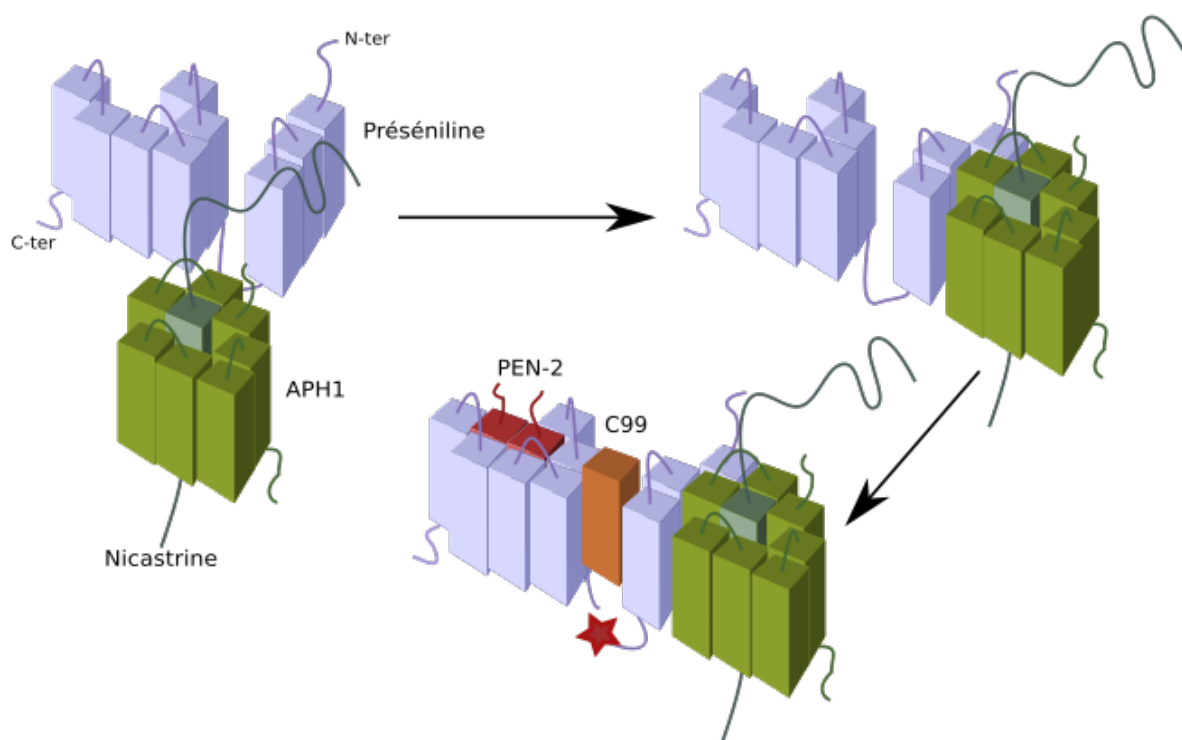


Figure 5 : Assemblage du complexe γ -sécrétase. L'assemblage débute avec la glycosylation de la nicastrine dans le réticulum endoplasmique, qui permet son association avec Apha1 selon un ratio 1:1, formant un hétérodimère stable. Le sous-complexe intègre ensuite la préséniline, puis la protéine PEN-2. Sous cette forme, la préséniline subit une endoprotéolyse (étoile sur la figure). Ces étapes de maturation permettent le masquage des signaux de rétention au RE, portés par la préséniline, la nicastrine et PEN-2. Le site catalytique actif du complexe est porté par la préséniline, et interagit avec son substrat au coeur de la membrane.

Une activité enzymatique vitale

Le principal rôle physiologique du complexe γ -sécrétase est associé à la fonction de protéolyse intramembranaire régulée ou RIP (Regulated Intramembrane Proteolysis), modulant la signalisation inter- et intracellulaire ainsi que l'endoprotéolyse des récepteurs de surface (**Brown M. S. et al., 2000**). L'une des cibles les plus étudiées de l'activité γ -sécrétase est Notch-1, métabolisée d'une façon similaire à l'APP, et impliquée dans la différenciation cellulaire à l'âge embryonnaire et adulte (**Nichols J. T., 2007**). D'autres récepteurs, comme l'EGFR (Epidermal growth factor receptor), lié à la croissance et à la signalisation cellulaire sont aussi des cibles du complexe (**Repetto E. et al., 2007**). Du fait de ces rôles physiologiques importants, l'invalidation génétique de l'activité γ -sécrétase dans un modèle murin est létale dès le stade embryonnaire (**Shen J. et al., 1997**).

Isoformes et génétique du complexe

Plusieurs facteurs peuvent moduler l'affinité et l'activité du complexe γ -sécrétase. La préséniline-2, isoforme avec 67% d'homologie à la préséniline-1, peut être incorporée au complexe et porte également une activité de type γ -sécrétase (**Hébert S. S. et al., 2004**). Ces deux isoformes ont une localisation neuronale et possèdent des taux d'expression similaires (**Lee M. K. et al., 1996**). Cependant, si les deux protéines partagent certains de leurs substrats, comme l'APP ou Notch-1, d'autres diffèrent, comme les cadhérines (**Steiner H et al., 1999 ; Kouchi et al., 2009**). L'invalidation génétique de ces isoformes dans un modèle murin provoque des phénotypes distincts, la déficience en PS1 est létale à l'âge embryonnaire et la déficience en PS2 provoque une forme de fibrose pulmonaire, ce qui suppose des rôles partiellement non-redondants (**Herreman A. et al., 1999**). D'autre part, la protéine APL1 possède trois formes : APL1aL (long) épissé en APL1aS (short) ainsi que APL1b. L'intégration de ces protéines dans le complexe γ -sécrétase porte le nombre total de combinaison possible d'hétérotétramères à six avec les PS 1 et 2 (**Shirotani K. et al., 2004**). Le rôle et les activités de ces complexes diffèrent mais leur implication dans la biologie de la maladie d'Alzheimer n'est pas élucidée (**Serneels L et al., 2005**).

Au niveau génétique, plus de 200 mutations (PS1) et 40 mutations (PS2) associées à la pathologie ont été reportées (**Cai Y. et al., 2015**). L'activité du complexe γ -sécrétase peut-être affectée de deux façons par ces mutations : par une augmentation de la production du peptide amyloïde- β 1-40 et 1-42/43 *in vitro* et *in vivo*, et par une diminution de l'affinité pour la coupure ϵ - catalysée par la γ -sécrétase sur ses autres substrats (Notch-1, Cadhérines...) (**Kaneko H. et al., 2007 ; Borchelt D. R., 1996 ; Song W. et al., 1999 ; Marambaud P. et al., 2003**). Les deux types de mutations pouvant être exclusifs (**Robakis N. K., 2011**). Ceci amène à une double pathogénicité potentielle, ainsi qu'à des symptômes cliniques et un âge d'apparition variable (30 à 60 ans) chez les individus atteints de ces formes génétiques familiales de maladie d'Alzheimer (**Vilatela M. E. A., et al., 2012**). L'activité γ -sécrétase a donc été une cible pharmacologique d'importance, mais la faible spécificité de son activité a rendu la plupart des essais cliniques difficiles avec de trop nombreux effets secondaires délétères (**Cummings J. 2010**).

II.5 Le peptide amyloïde- β

Constituant l'élément majeur des plaques séniles, le peptide amyloïde- β est l'un des produits finals du métabolisme amyloïdogénique de l'APP. Depuis la mise en évidence de la corrélation assez faible entre la quantité de plaques amyloïdes et l'état de démence des patients atteints de maladie d'Alzheimer, les études se sont dirigées vers l'accumulation de peptide amyloïde- β intra-cellulaire ou sous forme oligomérique soluble (**Dickson D. W. et al., 1995 ; Selkoe D. J., 2006**). Bien qu'associé à des processus délétères, il a été démontré que le peptide amyloïde- β est naturellement présent dans le liquide cérébro-spinal (LCS) humain, suggérant un rôle physiologique dans des conditions homéostatiques normales (**Vigo-Pelfrey C. et al., 1993 ; Ida N. et al., 1996**). Certains travaux étudiant cette hypothèse ont révélé qu'à des doses faibles, le peptide amyloïde- β peut améliorer la plasticité synaptique dans un modèle murin *in vivo* (**Puzzo D. et al., 2008**). Le traitement de neurones avec certaines espèces de peptide amyloïde- β , en particulier le peptide amyloïde 1-40, atténue les effets délétères des inhibiteurs d'activité γ -sécrétase, suggérant une dépendance physiologique de ces cellules au peptide (**Plant L. D. et al., 2003**).

Les espèces critiques de la maladie d'Alzheimer

Chaque espèce de peptide amyloïde- β peut posséder des propriétés physico-chimiques différentes de par la présence ou l'absence de certains résidus aminés dans sa séquence, en particulier à son extrémité carboxy-terminale qui influence sa capacité d'agrégation (**Jarret J. T. et al., 1993**). Bien que de nombreuses espèces de peptides soient retrouvées dans le LCR (liquide céphalo-rachidien) humain ainsi que dans les plaques séniles, ce sont les peptides amyloïde- β 1-40 et 1-42 qui sont principalement étudiés. Ceci pour plusieurs raisons :

- Dans des conditions physiologiques, le peptide 1-40 est l'espèce majoritaire dans le LCR (90% du total) et retrouvé dans les formes oligomériques (**Meththa P. D. et al., 2001 ; Funato H. et al., 1999**).
- Dans des conditions physiologiques, le peptide 1-42 est une espèce plus mineure du LCS (10% du total) mais possède les propriétés physico-chimiques les plus agrégantes et

toxiques *in vitro*. Il est aussi majoritaire dans les plaques séniles et également retrouvé dans les assemblages oligomériques (**Iwatsubo T. et al., 1994 ; Roher A. E 1996**).

- Les formes familiales génétiques de maladie d'Alzheimer impliquent toutes une augmentation de la quantité de peptide amyloïde- β 1-42 dans le cerveau (**Scheuner D. et al., 1996**).

- La proportion d'amyloïde- β 1-40 / 1-42 est modifiée dans les formes sporadiques de maladie d'Alzheimer, passant d'un ratio d'environ 90 / 10 à 50 / 50 avec une augmentation de la quantité totale de ces peptides dans le cerveau (**Meththa P. D. et al., 2001 ; Kuo Y. M. et al., 1996 ; Roher A. E. et al., 1996 ; Wang J. et al., 1999**).

Un peptide sécrété et intraneuronal ?

Les plaques séniles n'étant plus considérées comme l'un des événements précurseurs mais plutôt comme une éventuelle conséquence de la maladie d'Alzheimer, la question de la provenance et du moment d'apparition des peptides amyloïde- β s'est posée, ainsi que le degré de corrélation entre ces peptides et les déficits neuronaux observés chez les patients atteints de la pathologie. Les premières réponses à ces interrogations ont été données par d'anciennes études préliminaires, qui avaient relevé la présence du peptide amyloïde- β intraneuronal coexistant avec les NFTs présentes dans la maladie d'Alzheimer (**Grundke-Igbal I. et al., 1989**), amenant à supposer des liens possibles entre les deux lésions (**Blurton-Jones M. et al., 2006**). L'idée de peptide amyloïde- β intracellulaire n'a pas été immédiatement acceptée, du fait des immuno-réactivités potentiellement non-spécifiques des anticorps utilisés contre l'APP ou ses autres métabolites, mais plusieurs études ont confirmé la présence et la nature du peptide amyloïde- β dans les neurones, identifiant de façon très majoritaire le peptide 1-42, chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer ou du syndrome de Down (**Gouras G. K. et al., 2000 ; Gyure K. A., 2001**). De plus, la localisation intraneuronale post-synaptique du peptide amyloïde- β 1-42 a pu être corrélée aux morphologies aberrantes des synapses occurrentes dans la maladie d'Alzheimer (**Takahashi R. H. et al., 2002**).

Les mécanismes affectant la localisation du peptide amyloïde- β

Cependant, puisque l'APP et la machinerie enzymatique responsable de son catabolisme sont localisés dans les réseaux sécrétoires ou à la membrane cellulaire, le peptide amyloïde- β se retrouve majoritairement dans le milieu extra-cellulaire (**Haass C. et al., 2006 ; Busciglio J. et al., 1993**). Mais plusieurs facteurs peuvent affecter la compartimentation de la production du peptide. D'abord, les mutations génétiques présentes dans les cas familiaux de maladie d'Alzheimer, comme la mutation suédoise de l'APP, augmentent de façon importante la quantité de peptide amyloïde- β intracellulaire (**Martin B. L. et al., 1995**). La nature de l'APP (APP695, 751 ou 770) affecte aussi la production, avec une augmentation de la quantité de peptide intracellulaire en présence d'APP 695, forme dominante dans les neurones (**Wertkin A. M. et al., 1993**). Au niveau environnemental, le stress oxydatif, les modulations du métabolisme énergétique et l'activation d'hormones glucocorticoïdes altèrent le métabolisme de l'APP et favorisent l'accumulation de peptide intracellulaire dans des modèles *in vivo* murins ou *in vitro* de la maladie Alzheimer (**Misonou H. et al., 2000 ; Gabuzda D. et al., 1994 ; Hasegawa T. et al., 2005 ; Green K. N. et al., 2006**). En plus de la production intracellulaire du peptide amyloïde- β , de nombreux mécanismes de transport et de recapture du peptide sécrété ont été mis en évidence. Plusieurs récepteurs ou transporteurs membranaires peuvent lier le peptide amyloïde- β 1-42, provoquant leur internalisation dans la cellule et l'accumulation intracellulaire du peptide (Voir **Table 1**).

Table 1 : Liste des récepteurs et transporteurs pouvant interagir avec le peptide amyloïde- β

Recepteur	Publication	Notes
$\alpha 7$ nAChR	Nagele R. G. et al., 2004 Wang H. Y. et al., 2000	Études réalisées dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, monitorant l'internalisation des récepteurs corrélé à l'accumulation de peptide amyloïde- β 1-42 dans les neurones.
ApoE	Bu G. et al., 2006 Zerbinatti C. V. et al., 2006	Études réalisées dans un autre modèle murin de la maladie d'Alzheimer, avec une surexpression ou une invalidation de ce transporteur conduisant à une augmentation ou une diminution de la quantité de peptide amyloïde- β 1-42 intraneuronal. Certains allèles de l'ApoE, comme l'ApoE ϵ 4 sont des facteurs de risques associés à la maladie d'Alzheimer.

RAGE	Deane R. et al., 2003 Du Yan S. et al., 1997 Sasaki N. et al., 2001	En plus de promouvoir l'accumulation du peptide amyloïde- β 1-42 intracellulaire, l'activation du récepteur déclenche une réponse pro-inflammatoire via NF- κ B et active les cellules microgliales et astrocytaires du cerveau.
FPRL1	Iribarren P. et al., 2005	Active l'internalisation du récepteur et donc l'accumulation du peptide amyloïde- β 1-42 au niveau intracellulaire, principalement associé aux cellules immunitaires, les microgliales et les astrocytes.
NMDA	Snyder E. M. et al., 2005 Bi X. et al., 2002	L'utilisation d'antagonistes au récepteur diminue l'effet de son internalisation en présence de peptide amyloïde- β 1-42, qui entraîne autrement l'accumulation du peptide, ainsi que l'activation des microglies et d'autres perturbations cellulaires au niveau de l'homéostasie calcique provoquant une excitotoxicité neuronale.

L'accumulation intracellulaire de peptide amyloïde- β a été reportée comme un événement précoce de la maladie Alzheimer, précédant l'apparition des éventuelles plaques séniles (**Oddo S. et al., 2006 ; Gouras G. K. et al., 2000**). Cependant, la corrélation temporelle et spatiale entre la quantité intracellulaire du peptide amyloïde- β et les autres lésions de la maladie (comme les NFTs) n'est pas toujours forte, remettant en question la relevance de ces phénomènes en tant que précurseur de la cascade biologique délétère associée à la pathologie (**Wegiel J. et al., 2007**). Ces résultats soulèvent un autre point important concernant le peptide amyloïde- β : ce n'est pas la quantité mais l'état d'oligomérisation du peptide qui semble affecter de façon critique son pouvoir toxique (**Hayden E Y. et al., 2013**).

II.6 - Le peptide amyloïde- β oligomérique

Structurellement, le peptide amyloïde- β est amphiphathique, possédant des groupes hydrophobes et hydrophiles sur les 28 premiers résidus de sa séquence, les autres résidus étant non-chargés et apolaires **(Soreghan B. et al., 1994)**. Ces caractéristiques physico-chimiques permettent au peptide de lier une grande quantité de partenaires différents, sans disposer de la conformation native nécessaire à ces interactions, ce qui correspond aux caractéristiques d'une protéine intrinsèquement désordonnée (IDP Intrinsically Disordered Protein) **(Uversky et al., 2013)**. Du fait de cette flexibilité structurelle importante, le peptide amyloïde- β peut également former des oligomères de différentes formes et tailles, de façon non-covalente et très dynamique en fonction des conditions environnementales **(Bemporad F. et al., 2012)**.

Ces phénomènes, appelés polymorphismes oligomériques, ont rendu l'isolation et la caractérisation des espèces d'oligomères *in vivo* chez l'homme très récente et encore incomplète **(Kodali R. et al 2007 ; Stefani M., 2016)**. Si la nature des oligomères identifiés peut-être parfois remise en question de par les méthodes utilisées **(Bitan G. et al., 2005 ; Watt A. D. et al., 2013)**, plusieurs points ont pu être établis :

- La présence d'oligomères de peptide amyloïde- β dans le cerveau humain corrèle de façon beaucoup plus forte avec le degré de sévérité des symptômes de la maladie d'Alzheimer, contrairement aux plaques séniles **(Donald J. M. M. et al., 2010)**.
- Certaines espèces d'oligomères sont formées au cours du vieillissement de l'individu et sont présentes dans le cerveau de patients sains, mais la transition vers d'autres formes oligomériques peut corrélérer avec les patients touchés par une MCI (Mild Cognitive Impairment) et prédire une conversion vers la maladie d'Alzheimer **(Lesné S. E. et al., 2013 ; Fukumoto H. et al., 2010)**.
- Le peptide amyloïde- β oligomérique est détecté dans le LCR des patients touchés par la maladie d'Alzheimer, ainsi que dans le plasma, mais son utilisation en tant que biomarqueur sanguin de la pathologie reste sujet à controverse **(Savage M. J. et al., 2014 ; Xia W. et al., 2009 ; Koyama A. et al., 2012)**.

Une neurotoxine puissante

Une grande quantité de données sur le rôle des oligomères de peptide amyloïde- β ont pu être obtenues dans des modèles murins ou cellulaires, venant soutenir l'implication cruciale de ces structures dans la pathologie. Les oligomères agissent comme des neurotoxines capables de réduire la potentialisation synaptique à long terme au niveau de l'hippocampe, après avoir été micro-injectés dans des cerveaux de souris (**Walsh D. M. et al., 2002**). *In vitro*, les oligomères peuvent induire la mort neuronale (**Lambert M. P. et al., 1998**). Corrélant les résultats obtenus chez l'homme, les oligomères sont capables d'induire une toxicité synaptique indépendamment de la présence des plaques séniles dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer (**Mucke E. et al., 2000 ; Hsia A. Y. et al., 1999**). De façon intéressante, l'inhibition de la formation des plaques séniles ne diminue pas les déficits cognitifs observés dans le cerveau des souris modèles de la pathologie, suggérant un rôle possible de séquestration des oligomères par les plaques sous des formes moins diffuses et moins toxiques (**Meilandt W. J., 2009**).

Le peptide amyloïde- β 1-42 est l'espèce la plus neurotoxique sous forme oligomérique, mais d'autres espèces, comme le peptide amyloïde- β 1-40, peuvent également former des oligomères avec un pouvoir toxique inférieur, suggérant des voies d'assemblages et des structures différentes (**Dahlgren K. N. et al., 2002 ; Bitan G. et al., 2002**). Par ailleurs, les oligomères formés naturellement (produits par des cellules ou extraits de cerveaux) sont beaucoup plus puissants que ceux préparés à partir de peptide amyloïde- β 1-42 via synthèse chimique, avec une concentration toxique pouvant être mille fois inférieure (**Finder V. H. et al., 2010**). Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'absence de modifications post-traductionnelles ou par l'action de l'environnement cellulaire (autres partenaires protéiques) (**Hayden E. Y et al., 2013**). En exemple, le glycosphingolipide GM1 présent dans les membranes lipidiques peut interagir et complexer avec le peptide amyloïde- β , agissant comme un catalyseur de la formation d'espèces oligomériques pouvant déclencher la mort neuronale via le récepteur NGF (Nerve Growth Factor) (**Yamamoto N. et al., 2007 ; Yanagisawa K., 2007**).

La toxicité des oligomères d'amyloïde- β a été associée à de nombreux dysfonctionnements cellulaires : Excitotoxicité, stress réticulaire, perturbation de la chaîne respiratoire des mitochondries, déficits synaptiques, activation de l'inflammation et enfin, la production de stress oxydatif (**Benilova I. et al., 2012**). En effet, de par la structure du peptide amyloïde- β et la présence de métaux de transition dans le cerveau (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}), les oligomères peuvent catalyser des réactions de réduction de ces ions et générer des radicaux libres oxygénés (**Deibel M. A. et al., 1996 ; Meraz-Rios M. A. et al., 2014**). Les traces de stress oxydatif, lipides et protéines peroxydés, sont accumulées dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (**Lahiri D. K. et al., 2004**).

L'accumulation intracellulaire de peptide amyloïde- β et de protéines déstabilisées par l'oxydation entraîne l'activation des chaperonnes cytoplasmiques cellulaires, impliquées dans la reformation des protéines endommagées, plusieurs études ayant montré qu'elles peuvent colocaliser avec les inclusions et les fibrilles de peptide amyloïde- β (**Muchowski P. J. et al., 2005**). De façon intéressante, l'action des chaperonnes, visant à bloquer l'agrégation avancée des protéines, pourrait maintenir le peptide amyloïde- β sous une forme oligomérique toxique. Cette hypothèse est soutenue par différents travaux montrant une augmentation de la toxicité du peptide amyloïde- β en présence de certaines chaperonnes cytoplasmiques ou membranaires (αB -crystallin et la clusterin) (**Stege G. J. et al., 1999 ; Oda T. et al., 1995**). En parallèle, les oligomères ont également été montrés comme capables d'inhiber le protéasome *in vivo* et *in vitro*, ce fait combiné à l'incapacité des chaperonnes cytoplasmiques à juguler la toxicité des oligomères pourrait précipiter la mort cellulaire via l'activation de p53 (**Tseng B. P et al., 2008 ; Chui D. H. et al., 2001**).

III - Les mécanismes de la protéostasie cellulaire

III.1 - Physio-pathologie de l'homéostasie protéique

L'accumulation de protéines malformées et agrégées est une signature courante des maladies neurodégénératives (**Selkoe D. J., 2003**). En effet, la pathologie Alzheimer n'est pas la seule à montrer ce type de lésions : Des agrégats de la protéine neuronale α -synucléine sont retrouvés dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Parkinson. Dans la maladie de Huntington, c'est la protéine mutante huntingtine présentant des répétitions aberrantes de glutamines qui s'agrège pour former des inclusions insolubles à l'origine de la dégénérescence. La maladie de Creutzfeldt Jakob partage également ces mécanismes d'accumulation et d'agrégation protéique incontrôlée, avec la présence d'une protéine Prion mutée entraînant l'agrégation de sa contrepartie sauvage. Ces pathologies, appelées de façon générale 'amyloïdoses', partagent plusieurs aspects :

- Les protéines impliquées sont retrouvées à l'état soluble et non-agrégées dans des conditions cellulaires physiologiques.
- Le phénomène d'accumulation et d'agrégation précède, souvent de plusieurs années, voire de décennies, l'apparition de symptômes décelables par examen.

Sur ce dernier point, on remarque que les cas génétiques familiaux de maladie d'Alzheimer impliquant des mutations favorisant l'accumulation de peptide A β , comme les mutations de l'APP ou des présénilines, peuvent développer les symptômes de la maladie beaucoup plus tôt, entre 35 et 50 ans (**Cacace R., 2016**). Les personnes affectées par un syndrome de Down et possédant trois copies du chromosome 21, porteur de l'allèle de l'APP, déclarent aussi la maladie d'Alzheimer de façon précoce (**Lott I. T., 2001**). Tout facteur favorisant massivement l'accumulation de protéines amyloïdogéniques semble donc critique à l'installation de la pathologie.

Ce point soulève aussi l'importance du temps et a fortiori, de l'âge, dans le développement de ces maladies. Le vieillissement cérébral normal engage de nombreux changements structurels du cerveau traduits par des baisses de certaines capacités mémorielles, très variables en fonction des individus (**Heden T., 2004 ; Park D. C., 1996**). Dans certains cas,

ces altérations mnésiques légères s'aggravent et conduisent à l'apparition d'un vieillissement cérébral pathologique, caractérisé par des performances mémorielles inférieures à celles attendues pour une personne du même âge. Ces diminutions modérées des capacités cognitives (MCI) peuvent être confondues avec les premiers symptômes associés à la maladie d'Alzheimer et augmentent également le risque de développer la pathologie (**Morris J. C., 2005 ; Petersen R. C., 2000**). Les événements à l'origine de la transition entre le vieillissement physiologique et pathologique restent obscurs et difficiles à déterminer. Cependant, on sait que les mécanismes cellulaires liés à la production et à l'élimination des radicaux d'oxygène libre (ROS) sont affectés par le vieillissement cellulaire, et de façon générale amènent à une augmentation de la quantité de marqueurs propres au stress oxydatif (**Harman D., 1956 ; Dongping L., 2011**). Ces modifications normalement tolérées s'accumulent de façon plus importante dans les cerveaux des patients atteints de maladie d'Alzheimer (**Smith M.A, 1994 ; Smith C. D., 1991 ; Montine T. J., 1996**). Le stress oxydatif qui en résulte pourrait précipiter le déclin de certaines fonctions cellulaires, contribuant à l'augmentation du nombre de protéines malformées par oxydation des liaisons peptidiques.

D'autre part, les fonctions liées à la dégradation des protéines et à leur maintien dans une conformation correcte (protéasome et chaperonnes) voient leurs activités naturellement diminuer avec l'âge (**Naidoo N., 2009 ; Douglas P. M. et al., 2010**). La surcharge de protéines malformées, combinée à la diminution des fonctions de dégradation, entraîne alors un cycle où le stress cellulaire est exacerbé par une quantité toujours plus importante de déchets protéiques accumulés dans les différents compartiments de la cellule (**Taylor R. C. et al., 2011**). On comprend alors que tout autre stress extérieur mettant à l'épreuve les fonctions d'homéostasie cellulaires (ischémie, hypoxie, inflammation, stress calcique), provoqué par un terrain génétique particulier ou par le cours de vie de l'individu, peut faire pencher la balance en faveur d'un vieillissement cérébral pathologique. En réponse à un stress modéré pouvant affecter l'homéostasie protéique, la cellule engage une phase adaptative via l'UPR (Unfolded Protein Response) qui contrôle l'activation d'un ensemble de gènes impliqués dans la production, la formation, l'adressage et la dégradation des protéines (**Shen X. et al., 2004**).

Cependant, dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, les dysfonctionnements du protéasome sont exacerbés par l'accumulation du peptide amyloïde- β intra-cellulaire, qui vient aussi perturber les autres voies de dégradation protéique : l'autophagie et la dégradation lysosomiale (**Tseng B. P. et al., 2007 ; Nixon R. A., 2007**). Cette aggravation du stress protéique chronique par le peptide amyloïde- β peut forcer la cellule à abandonner les réponses adaptatives et protectrices pour emprunter une route pro-apoptotique également générée par l'UPR dans ces conditions pathologiques (**Cornejo V. H. et al., 2013**).

Dès lors, la suppression directe du peptide A β n'est pas suffisante pour restaurer les fonctions cellulaires normales, déjà engagées dans des processus délétères entamés depuis une longue période avant l'apparition des symptômes de la maladie. L'étude des liens entre cette mécanique de l'UPR et les principaux acteurs de la pathologie (APP, β -sécrétase, γ -sécrétase, peptide amyloïde- β , Tau) semble donc cruciale à la compréhension de l'installation et du développement de la maladie.

III.2 - La néosynthèse protéique

Les mécanismes associés à la protéostasie sont indissociables de ceux impliqués dans la néosynthèse, le repliement et la conformation correcte des protéines commençant dès leur traduction (**Hebert D. N. et al., 2007**). La néosynthèse protéique se déroule dans deux compartiments cellulaires : Le cytosol ou le réticulum endoplasmique (RE), qui concerne les protéines membranaires et sécrétées. Dans les deux cas, le système ribosomal est employé, formant des complexes libres dans le cytosol ou des complexes attachés à la membrane du RE (**Ganoza M. C. et al., 1969**). Néanmoins, pendant et après la néosynthèse, les conditions physico-chimiques de repliement des protéines cytosoliques et réticulaires ne sont pas les mêmes, et font appel à des machineries moléculaires différentes (**Hebert D. N. et al., 2007**). Les régulations engagées par l'UPR en condition de stress visent à rétablir l'homéostasie protéique du RE, mais leurs répercussions peuvent aller bien au-delà de ce compartiment (exposé plus loin). Les prochaines sections se concentreront sur les mécanismes de maintien de la protéostasie réticulaire, les protéines membranaires et sécrétées (β -, γ -sécrétases, APP, peptide amyloïde- β) étant notre premier intérêt ici.

III.2.a - Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est l'organelle cellulaire qui permet la production, le repliement ainsi que la majorité des modifications post-traductionnelles des protéines membranaires et sécrétées. Localisée dans le cytoplasme, la membrane du RE s'étend de façon continue jusqu'à l'enveloppe nucléaire (**Kaufman R. J., 1999**). Deux autres rôles essentiels à la vie cellulaire sont aussi dépendants du RE : la biosynthèse des lipides et des cholestérols ainsi que le stockage du calcium. Le RE exprime également de nombreuses oxydases nécessaires à la formation des ponts disulfures, ainsi qu'une machinerie complexe de glycosylation des protéines (**Hwang C. et al., 1992 ; Hebert D. N. et al., 2007**).

La formation correcte des protéines natives est contrôlée par les chaperonnes résidentes du RE, pour être ensuite exportées jusqu'à la membrane cellulaire via le réseau Golgien. Celles qui ne répondent pas aux critères de repliement correct sont retenues dans le RE, retro-transloquées au cytoplasme et dégradées par le protéasome via le système ERAD (ER Associated Degradation) (**Ellgaard et al., 2003**) (Voir **Figure 6**). Du fait de la haute concentration protéique dans le RE (100 mg/ml), les chaperonnes et les membres de l'ERAD sont constitutivement exprimées pour juguler l'agrégation protéique qui se produit dans les conditions physiologiques normales (**Stevens F. J., et al., 1999**).

Au cours de la vie cellulaire, des fluctuations de la biosynthèse protéique sont courantes (division cellulaire, différenciation, sécrétion), ce qui mène irrémédiablement à un stress des fonctions du RE. La cellule engage alors ladite réponse UPR (Unfolded Protein Response) pour rétablir l'homéostasie protéique selon 4 phases : L'atténuation de la traduction, l'induction transcriptionnelle des chaperonnes, l'induction transcriptionnelle de l'ERAD et enfin, si le stress est trop important, l'apoptose cellulaire (**Schröder M. et al., 2004**). D'autres signaux sont également capables d'activer l'UPR, comme le blocage de la glycosylation des protéines, l'altération des fonctions des chaperonnes, la diminution du calcium réticulaire, la déprivation peptidique, les perturbations de l'équilibre Red-Ox ainsi que la surexpression de certaines protéines (virales, mutantes) (**Malhotra J. D. et al., 2007**).

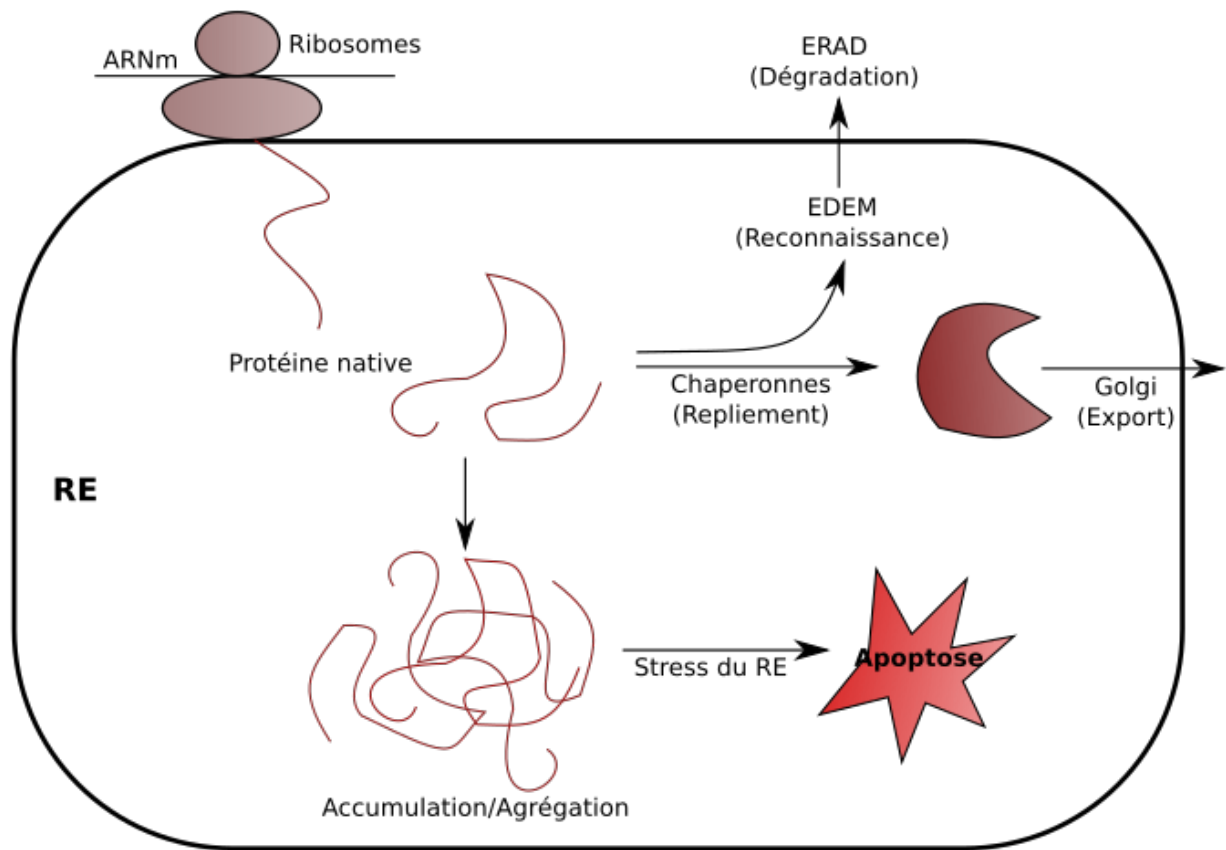


Figure 6 : Les étapes de contrôle de la traduction protéique du RE. Les ARNs messagers des protéines réticulaires sont adressés aux ribosomes associés à la membrane du RE, leur traduction est simultanée à leur export et à leur repliement. Le repliement lui-même est pris en charge par les chaperonnes qui catalysent cette opération en reconnaissant les sites hydrophobes exposés des protéines natives où certains oses servant de signal (voir chapitre suivant : Les chaperonnes). Les protéines correctement repliées sont exportées hors du RE via le réseau golgien. Si les chaperonnes ne parviennent pas à replier leurs cibles, elles adressent les protéines pseudo-formées ou malformées à l'EDEM, qui dirigera la rétro-translocation de ces protéines hors du RE via l'ERAD pour être dégradées dans le cytosol par le protéasome. Si l'afflux de protéines natives est trop important, ou si les conditions homéostatiques du RE sont perturbées (altérations des réserves calciques, de l'environnement oxydatif, perte de fonction des chaperonnes, inhibition du protéasome), une accumulation de protéines non repliées ou mal repliées conduisant à l'agrégation va encombrer le RE. Si la cellule ne parvient pas à rétablir l'homéostasie de ce compartiment, un processus d'apoptose est enclenché. (Schéma adapté de Yoshida H. 2007)

III.2.b - Les chaperonnes

Les chaperonnes résidentes du RE sont les premiers éléments employés par la cellule pour catalyser le repliement des protéines néosynthétisées. Elles reconnaissent les éléments non formés ou malformés selon différents signaux et peuvent commander leur rétention dans le RE jusqu'à la formation normale des protéines ou leur adressage potentiel à l'ERAD (**Hammond C. et al., 1994a**). Ces chaperonnes sont divisées en deux systèmes distincts créant des complexes composés de membres différents, mais pouvant occasionnellement interagir selon les conditions.

Les lectines du RE

Le premier système de chaperonnes du RE repose principalement sur la présence de deux lectines, la calnexine et la calréticuline, capables de lier les carbohydrates (**Ou W. J. et al., 1993 ; Kapoor M. et al., 2002**). En effet, des groupements N-Glycans complexes sont ajoutés sur une portion importante des protéines néosynthétisées, et servent d'indicateur à l'avancement de leur repliement (Voir **Figure 7**) (**Hebert D. N. et al., 2007**). Ces groupes N-Glycans exposent trois résidus glucoses, dont les deux premiers sont hydrolysés par les glucosidases I et II pour ne laisser qu'un mono-glucose servant de signal de reconnaissance et de fixation à la calnexine-calréticuline (**Hammond C. et al., 1994b**). Le repliement correct de la protéine est ensuite catalysé par ce système. Si l'opération réussit le dernier groupement glucose est retiré par la glucosidase II et la protéine cible libérée, exposant alors une chaîne de résidus mannoses. Dans le cas d'un repliement imparfait, un nouveau glucose est ajouté à la chaîne par l'UDP-Glucose-Glyprotéine-Glucotransférase et l'opération recommence jusqu'à la réussite ou l'élimination du substrat (**Sousa M. C. et al., 1992**). Ce système de recyclage n'affecte que les protéines presque correctement repliées, celles dont la structure est trop malformée sont ignorées et adressées au protéasome (**Caramelo J. J. et al., 2004**).

Bien qu'à priori redondantes, la calnécine et la calréticuline sont en réalité complémentaires dans leur rôle de repliement des glycoprotéines. La calnécine étant transmembranaire elle reconnaît les N-Glycans liés aux protéines membranaires, alors que la calréticuline soluble va interagir préférentiellement avec les protéines luminales (**Hebert D. N. et al., 1997**). Par ailleurs, la délétion de la calnécine chez la souris provoque une mortalité post-natale très augmentée mais certains individus survivent plusieurs mois (**Denzel A. et al., 2002**). À l'inverse, la délétion de la calréticuline est létale au niveau embryonnaire, soulignant un rôle ou une expression dominante au cours des premières étapes du développement (**Mesaeli N. et al., 1999**). De façon intéressante, ces deux chaperonnes peuvent être exportées du RE jusqu'aux membranes cellulaires (**Cunningham T. J. et al., 1998 ; Okazaki Y. et al., 2000**). Bien que luminale, la calréticuline néosynthétisée peut s'associer à des protéines membranaires et se retrouver à la surface de certains types cellulaires, en particulier les neurones ou elle contrôle différents processus d'homéostasie calcique ou inflammatoires (**Cunningham T. J. et al., 1998 ; Cunningham T. J. et al., 2000**). Elle est également capable de lier différents peptides hydrophobes (**Sandhu N. 2007**).

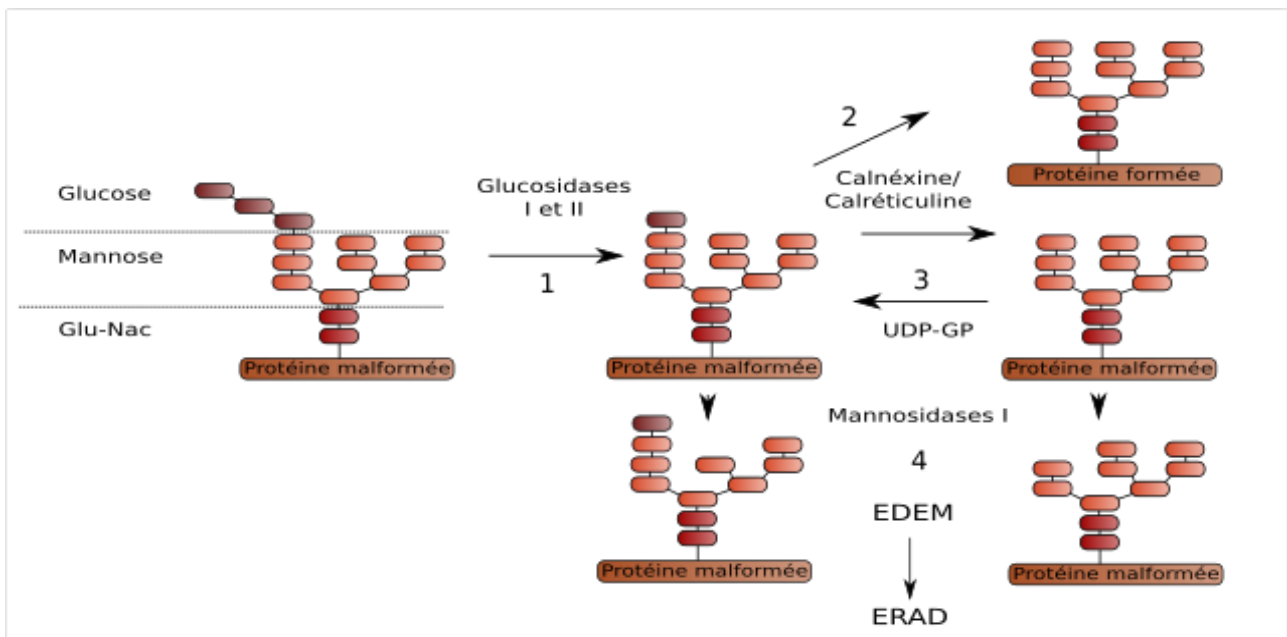


Figure 7 : La glycosylation dirige l'export des protéines du RE. Un groupement N-Glycan est ajouté aux protéines natives. **1.** Les glucosidases I et II retirent les deux résidus glucoses les plus exposés, permettant l'introduction de la protéine cible au cycle Calnécine/Calréticuline. **2.** Si le repliement mené par les chaperonnes est correct, la protéine est exclue du cycle via le retrait du dernier résidu glucose par la glucosidase II. **3.** Dans le cas contraire, un nouveau résidu glucose est ajouté par l'UDP-GP sur les protéines quasi-formées pour réaliser un nouveau cycle de repliement. **4.** Si le repliement échoue, les résidus mannoses les plus exposés sont retirés par les mannosidases I, commandant la reconnaissance par l'EDEM et l'export des protéines à l'ERAD.

Les HSP du RE

Le second système de chaperonnes du RE reconnaît les régions mal repliées de protéines exhibant des résidus hydrophobes (**Flynn G. C. et al., 1991**). Il est principalement caractérisé par la présence de BiP (Binding Immunoglobulin Protein ou aussi appelé Grp78 - Glucose Regulated Protein 78), une protéine homologue aux chaperonnes cytoplasmiques de type HSP70 (Heat shock protein 70), qui peut s'associer à différents partenaires pour former correctement ses cibles. Le fonctionnement de BiP est dépendant de son activité ATPase, l'hydrolyse de l'ATP en ADP permettant la liaison de BiP à son substrat (**Munro S. et al., 1986 ; Kassenbrock C. K. et al., 1989**). La déplétion en ATP cellulaire est donc inhibitrice du repliement des protéines membranaires et sécrétées (**Dorner A. J. et al., 1990**). Comme les autres protéines de la famille HSP70, BiP nécessite la présence d'une protéine DnaJ (DnaJ-like protein, appartenant à la famille des HSP40) pour catalyser l'hydrolyse de l'ATP (**Bukau B. et al., 1998**). Un autre cofacteur aide au fonctionnement du système BiP : BAP (BiP Associated Protein), qui régule le relargage de l'ADP pour permettre l'arrivée d'un nouvel ATP (**Chung K. T. et al., 2002**). D'autres chaperonnes homologues à la famille HSP70 résidentes du RE peuvent former des complexes similaires à BiP, et catalyser différents intermédiaires de repliement (**Argon Y. et al., 1999**). L'une des plus abondantes est Grp94, qui régule les repliements plus avancés, au contraire de BiP qui est l'une des premières chaperonnes rencontrées par les protéines natives non glycosylées (**Melnick J. et al., 1994**).

III.2.c - Les systèmes EDEM/ERAD

Si les chaperonnes échouent dans leur rôle de repliement et de reformation des protéines néosynthétisées ou endommagées, elles adressent leurs cibles au protéasome pour déclencher leur dégradation (**Ahner A. et al., 2004**). Le protéasome étant cytosolique ou nucléaire, le système ERAD assure la rétro-translocation des protéines endommagées du RE vers le cytosol, ceci en quatre étapes : la reconnaissance de la cible, la rétro-translocation, l'ubiquitination et enfin, la dégradation (**Yoshida H., 2007**).

Reconnaissance par le système EDEM

La première étape de l'ERAD implique le système l'EDEM (ER degradation-enhancing α -mannosidase-like protein). Les glycoprotéines interagissant avec la calnexine n'étant pas correctement reformées sont exclues de leur cycle de repliement et exhibent plusieurs résidus mannoses via leur chaîne N-Glycan (Voir **Figure 7** précédente) (**Frenkel Z. et al., 2003**). Le retrait progressif de ces résidus mannoses, catalysé par les α -mannosidases I résidentes du RE, bloque la re-glucosylation et le retour au cycle calnexine-calréticuline des protéines malformées (**Oda Y. et al., 2003 ; Eriksson K. K. et al., 2004**). L'EDEM reconnaît ensuite ces glycoprotéines malformées en détectant les résidus mannoses restants. À ce jour, trois gènes codants trois protéines (EDEM1, EDEM2 et EDEM3) ont été clonés et caractérisés (**Hosokawa N. et al., 2001 ; Olivari S. et al., 2004 ; Hirao K et al., 2006**). Les trois EDEMs ont un rôle similaire et sont impliquées dans l'accélération de la dégradation des glycoprotéines malformées. EDEM1 est membranaire alors que EDEM2 et EDEM3 sont luminales et solubles. Elles portent toutes un site de reconnaissance des résidus mannoses mais EDEM1 et EDEM2 sont dépourvues d'une activité mannosidase, au contraire de EDEM3 qui peut fonctionner indépendamment des mannosidases I (**Hirao K et al., 2006**). Associées à l'ERAD, d'autres protéines comme OS9 (Osteosarcoma 9) sont également capables de reconnaître des séries de résidus mannoses pour commander la rétro-translocation des glycoprotéines malformées (**Szathmary R. et al., 2005**). En parallèle, la chaperonne BiP peut agir comme un senseur de l'ERAD non dépendant de la glycosylation en interagissant avec les chaînes hydrophobes (**Cabral C. M. et al., 2002**).

Rétro-translocation hors du RE

Une fois reconnues par l'EDEM ou ses mécanismes associés, les glycoprotéines doivent être transloquées du RE vers le cytoplasme, le candidat principal à cette fonction est Sec61p (**Pilon M. et al., 1997 ; Dudek J. et al., 2015**). Sec61p est un canal passif bidirectionnel entre les deux compartiments cellulaires, nécessitant d'autres protéines pour transporter ses cibles de façon active. La chaperonne cytosolique p97, qui possède également une activité ATPase, recrute les protéines à transporter en formant un complexe composé de plusieurs

adaptateurs et cofacteurs : Derline-1, Vimp1 (Valocin-containing protein interacting membrane protein 1), Ufd1 (Ubiquitin fusion degradation protein 1) et Npl4 (nuclear protein localization 4) qui activent la fonction ATPase de p97 (**Rabinovich E. et al., 2002 ; Ye Y. et al., 2004**). La chaperonne BiP a également été montrée comme verrou du canal, bloquant physiquement l'entrée de Sec61p en absence de stress réticulaire et empêchant une fuite du calcium du RE (**Schauble N. et al., 2012**).

Le système ERAD

Le complexe de rétro-translocation (Derline-1/Vimp1/p97/Npl4/Ufd1) est directement couplé au système ERAD qui va diriger l'ubiquitination des protéines exportées du RE, signalant leur adressage au protéasome cytosolique (Voir **Figure 9**) (**Schulze A. et al., 2005**). L'ubiquitination est médiée par trois catégories d'enzymes qui agissent en coopération, appelées système ubiquitine E1-E2-E3 (Voir **Figure 8**) (**Weissman A. M., 1997**).

Les ubiquitines-ligases

La classe E1 comporte les enzymes activatrices de l'ubiquitine, qui catalysent de façon ATP dépendante la formation d'un intermédiaire thiol-ester de haute énergie de l'ubiquitine prêt à être lié à une cible. Cette étape cruciale à l'utilisation de l'ubiquitine est accomplie par UBA1 (Ubiquitine activating enzyme 1), une protéine possédant deux isoformes dont l'expression dépend du cycle cellulaire (**Grenfell S. J., et al., 1994**). La classe E2 implique les enzymes capables de transporter l'ubiquitine activée (aussi nommées UBC Ubiquitine-conjugating enzyme), pour l'engager dans un nouveau cycle d'activation en formant un second thiol-ester d'ubiquitine de haute énergie. Les protéines UBC s'associent ensuite à la classe E3 via un site de reconnaissance spécifique (**Glickman et al., 2002**). La classe E3, appelée ubiquitine-ligase, va catalyser la réaction finale de liaison covalente de l'ubiquitine par identification d'une séquence peptidique présente sur son substrat. L'emplacement de l'ubiquitination est donc dépendant de la cible, et le cycle peut-être répété plusieurs fois dans le cas de signal de poly-ubiquitination (**Glickman et al., 2002**).

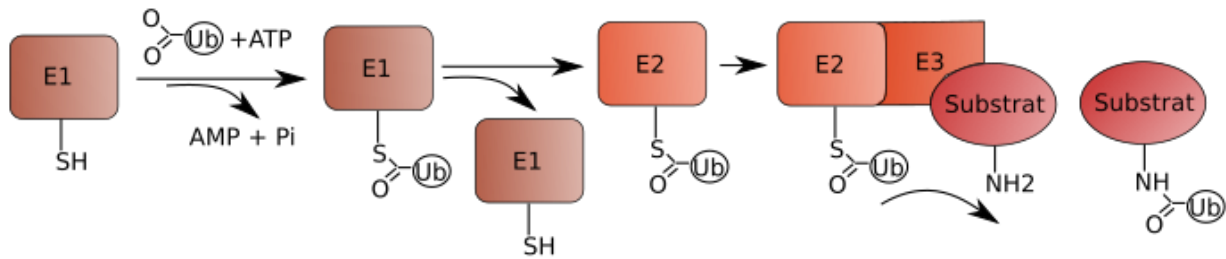


Figure 8 : Activation et transfert de l'ubiquitine. Les groupements ubiquitine sont liés aux enzymes de classe E1 via une interaction entre l'acide aminé C-terminal de l'ubiquitine (Glycine 76) et un acide aminé portant une fonction thiol de l'enzyme E1 (cystéine), ceci de façon ATP dépendante. L'enzyme E1 interagit ensuite avec une enzyme de classe E2 et réalise une seconde réaction thiol-ester, ce qui aboutit à la libération de l'enzyme E1 qui peut recommencer une nouvelle réaction en présence d'ATP. L'enzyme E2 interagit ensuite avec les enzymes ubiquitine-ligase de classe E3 via un site de reconnaissance spécifique formé lorsque l'E3 est déjà associée à son substrat. L'enzyme E3 catalyse ensuite la fixation du groupement ubiquitine sur l'accepteur final, canoniquement sur un résidu lysine. La position du résidu ainsi que le degré d'ubiquitination détermine le rôle de cette modification post-traductionnelle.

Les complexes ERAD-L/M et C

La fonction d'ubiquitination de l'ERAD est divisée en deux complexes (Voir **Figure 9**) reconnaissant différents types de domaines protéiques malformés. Le premier complexe est associé au rétro-translocon Derline-1/Vimp1/p97/Npl4/Ufd1 et engage l'ubiquitine ligase E3 Doa10 (alias TEB4) transmembranaire. Ce complexe, nommé ERAD-C (cytosolique) est impliqué dans l'ubiquitination des domaines cytosoliques malformés appartenant aux protéines transmembranaires produites dans le RE (**Carvalho P. et al., 2006**). Le second complexe, également associé au rétro-translocon et recruté par Sel1, implique HRD1, une ubiquitine-ligase E3 transmembranaire, ainsi que ses copartenaires Sel11 (nom alternatif HRD3), Herp et OS9. Herp facilite le recrutement d'HRD1 dans le complexe. Sel11 s'associe à HRD1 et OS9 pour identifier les glycoprotéines luminales malformées (**Denic V. et al., 2006 ; Gauss R. et al., 2006**). OS9 elle-même peut recruter BiP pour aider à cette reconnaissance (**Nishikawa S. I. et al., 2001**). Ce complexe possède un double rôle, pouvant ubiquitiner les protéines luminales via Sel11 et OS9, ou directement sélectionner les domaines membranaires déficients via HRD1, il gouverne donc les voies ERAD-L (luminales) et ERAD-M (membranaire) (**Nurzian I. et al., 2006**). Dans les deux cas, les complexes Doa10 et HRD1 coopèrent majoritairement avec l'ubiquitine-conjugase E2 UBC7 recrutée par l'intermédiaire membranaire Cue1 (**Biederer T. et al., 1997**).

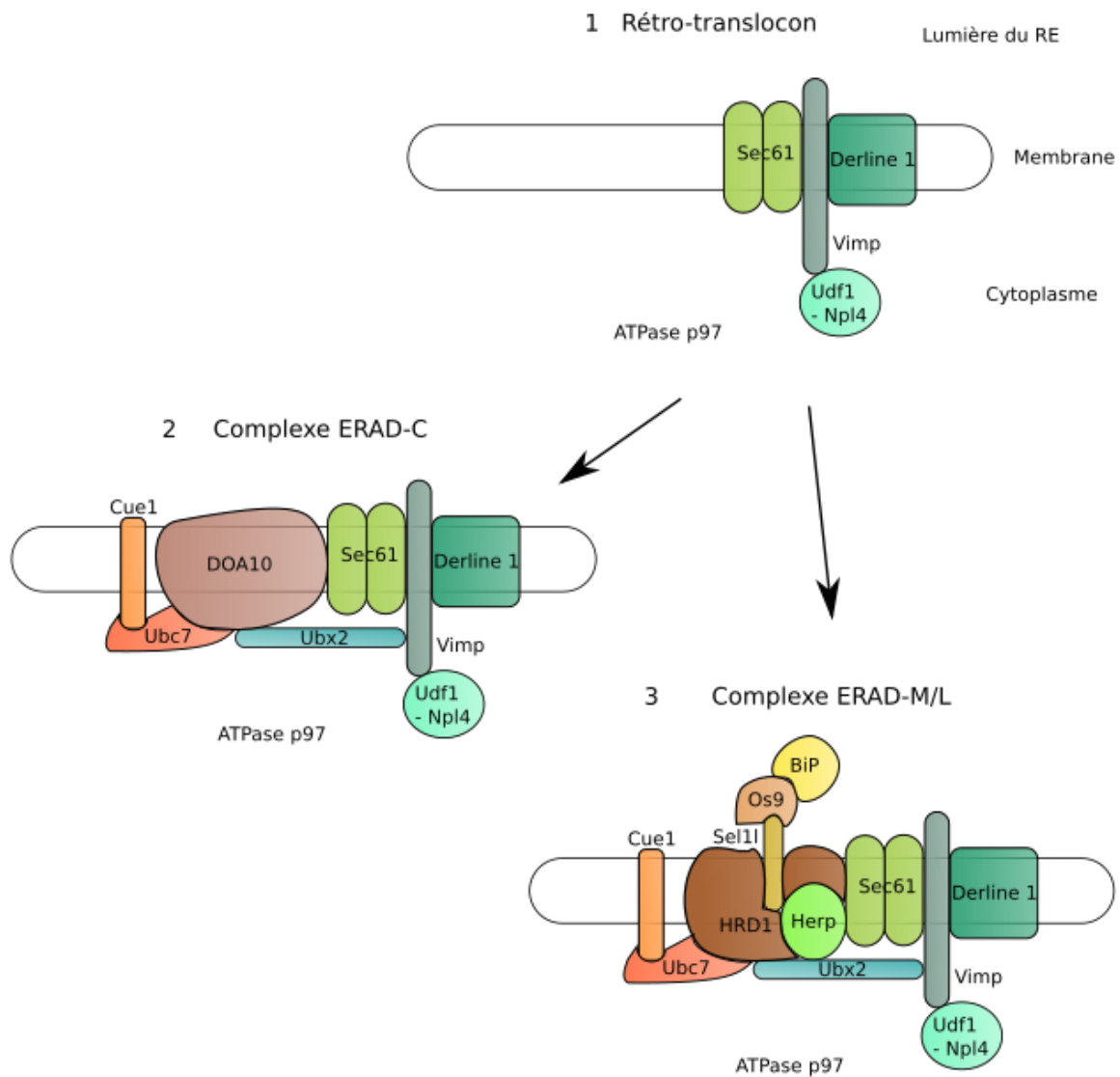


Figure 9 : Structure et interactions du rétro-translocon avec les complexes ERAD.

1. L'association du canal bidirectionnel Sec61 avec les différents membres du rétro-translocon, Vimp agit comme un domaine transmembranaire permettant la liaison des protéines ancrées dans la membrane du RE (Derline-1) et leurs copartenaires cytosoliques, notamment l'ATPase p97 indispensable au transport actif des protéines malformées.

2. Le complexe ERAD-C est dépendant de l'ubiquitine ligase E3 Doa10, elle interagit et exerce son activité ubiquitine-ligase E3 sur les domaines cytosoliques des protéines transmembranaires du RE. La protéine d'échafaudage Ubx2 permet une interaction plus efficace entre le complexe ERAD-C et le rétro-translocon. Ubc7 est une ubiquitine conjugase E2 qui transfère les groupements ubiquitine actifs au complexe, elle est retenue à la membrane par Cue1. **3.** Le complexe ERAD-L/M est majoritairement dépendant de l'ubiquitine ligase E3 HRD1. Le recrutement, l'insertion et l'activité d'HRD1 dans le complexe ERAD sont facilités par Herp. Sel1l, un autre copartenaire d'HRD1, interagit avec OS9 et BiP pour diriger les protéines luminales malformées du RE à HRD1. Les protéines membranaires malformées sont détectées directement par HRD1. Ubx2, Cue1 et Ubc7 sont également présents et exercent les mêmes rôles que dans le complexe ERAD-C.

III.3 - Alzheimer : Une maladie du RE ?

Différentes études ont rapporté les dysfonctionnements des systèmes assurant la synthèse, le repliement, l'export et la dégradation protéique du RE dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. Les sections suivantes vont donc présenter les interactions connues de ces systèmes avec les acteurs majeurs de la pathologie, ainsi que les conséquences physiologiques qui peuvent en découler.

Les chaperonnes altérées et relocalisées

Le système chaperonne, premier agent du maintien et du repliement des protéines néosynthétisées, est très affecté par la pathologie. La quantité totale de calréticuline neuronale est réduite dans les cerveaux des patients atteints de maladie d'Alzheimer, mais se trouve cependant plus concentrée dans les neurones les plus endommagés (**Taguchi J. et al., 2000**). Du fait de ses propriétés physico-chimiques, la chaperonne calréticuline est capable de lier le peptide amyloïde- β 1-42, ceci de façon dose dépendante (**Houan G. et al., 2008**). Le rôle de cette interaction est difficile à déterminer, en capturant le peptide amyloïde- β 1-42 elle limiterait son association avec d'autres cibles comme le complément (C1q), réduisant localement la production de ROS par les microglies environnantes et modulant l'inflammation (**Luo X. et al., 2003**). Mais les conséquences sur ses autres ligands sont inconnues.

La chaperonne BiP et les autres HSP70 ont également été très étudiées dans le cadre de la maladie d'Alzheimer et leurs rôles apparaissent complexes. L'expression de BiP est augmentée dans les modèles murins produisant du peptide amyloïde- β (**Soejima N., et al., 2013**). Cette observation est corrélée par les analyses immuno-histochimiques des cerveaux de patients atteints de la maladie, caractérisés par une accumulation précoce de BiP dans les neurones les moins endommagés (**Scheper et al., 2015**). Le rôle de BiP dans ces conditions n'est pas défini, mais on constate que les modulations génétiques ou pharmacologiques de BiP *in vitro* et *in vivo* dans des modèles cellulaires ou murins d'Alzheimer tendent à réduire la mort neuronale (**Yu et al., 1999 ; Kudo T., 2008**). Cependant, les mécanismes à l'origine

de ces effets ne sont pas évidents, car BiP est résidente du RE et le peptide amyloïde- β s'accumule majoritairement dans des compartiments intracellulaires plus tardifs ou alors au niveau extra-cellulaire. Mais comme dans le cas des lectines, certains travaux ont montré une expression membranaire ou sécrétée des chaperonnes HSP70 acheminées aux radeaux lipidiques (**Broquet A. H. et al., 2003**). D'autres études montrent que ces chaperonnes, dont BiP, peuvent activer la recapture et la clairance du peptide amyloïde- β extra-cellulaire par les cellules microgliales environnant les neurones (**Kakimura J. et al., 2002 ; Kakimura J. et al., 2001**). L'activation de BiP semble également limiter le transport et l'export de l'APP du RE, réduisant son métabolisme amyloïdogénique (**Yang Y. et al., 1998**). Finalement, le rôle des chaperonnes s'étend potentiellement au-delà du RE, modulant l'export des protéines ainsi que différents mécanismes inflammatoires. Dans ce cas, les perturbations du RE engendrées par l'accumulation intracellulaire du peptide amyloïde- β pourraient se répercuter sur la gestion extra-cellulaire du peptide amyloïde- β . La modulation de l'expression de ces protéines résidentes du RE par le stress peut donc englober tout un ensemble de fonctions cellulaires.

Les dysfonctionnements de l'ubiquitination

Les mécanismes régulant l'ubiquitination sont nettement altérés dans les cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer. En effet, une accumulation de l'ubiquitine est détectée dans les tissus cérébraux ainsi que dans le LCR des patients malades par rapport aux patients sains du même âge (**Kudo T. et al., 1994**). Cette accumulation est notablement corrélée spatialement aux inclusions de protéines Tau ou à la présence de peptide amyloïde- β agrégé (**Perry G. et al., 1987**). D'autre part, des formes mutantes de l'ubiquitine générées suite à une mauvaise lecture lors de la transcription (appelées UBB+1 Ubiquitine B precursor +1) sont également retrouvées dans ces structures, et sont caractérisées comme des inhibiteurs puissants de la dégradation protéasomale (**Van Leeuwen F. W. et al., 1998 ; Lindsten K. et al., 2002**). En parallèle à ces accumulations d'ubiquitinations, différentes enzymes E1-E2 et E3, ainsi que les déubiquitine-ligases sont affectées par la pathologie (voir **Table 2**). Notamment, l'ubiquitine-conjugase atypique E2-25K, qui possède une activité ubiquitine-ligase indépendante des E3, est augmentée dans les cerveaux des patients

atteints de la maladie d'Alzheimer. Située au niveau du protéasome elle médie l'inhibition de l'activité protéolytique en présence du peptide amyloïde- β 1-42 et peut activer la mort cellulaire suite à ce blocage (**Song S. et al., 2003**).

Au cœur du système ERAD, l'ubiquitine ligase E3 HRD1 du complexe ERAD-L/M est également diminuée dans le cortex des patients touchés par la pathologie (**Saito R. et al., 2010**). Sa position centrale dans l'ERAD suggère de nombreux substrats possibles. Des études se sont penchées sur l'implication de HRD1 dans la maladie, révélant son rôle dans la dégradation de l'APP via l'adressage au protéasome, réduisant potentiellement la production de peptide amyloïde- β (**Kaneko M. et al., 2010**). HRD1 est aussi associée à l'activation de la dégradation de la protéine Tau hyperphosphorylée, limitant son agrégation en fibrilles neurotoxiques (**Shen Y. X., et al., 2012**). De façon intéressante, HRD1 est elle-même sensible à l'agrégation et donc à la perte de sa fonction en présence de stress oxydatif, dont les marques sont communes et augmentées dans les cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer (**Saito R. et al., 2014**). Du fait de ses nombreuses fonctions, son inactivation pourrait alors contribuer au développement de la pathologie (**Kaneko M. et al., 2011**).

Table 2 : Liste des enzymes E1-E2-E3 modulées dans la maladie d'Alzheimer

Enzyme	Publication	Notes
UBA1 (E1)	Lopez-Salon M. et al., 2000	Activité et quantité diminuées dans les cerveaux des patients atteints de maladie d'Alzheimer.
Enzymes E2	Loring J. F., et al., 2001 Lu T. et al., 2004	Activité diminuant avec l'âge, l'effet est augmenté dans les cerveaux des patients touchés par la maladie d'Alzheimer.
E2-25K	Song S. et al., 2003	Activée dans la pathologie, peut déclencher l'inhibition du protéasome en présence du peptide amyloïde- β , ce qui contribue à une voie cellulaire pro-apoptotique.
CHIP (E3)	Shimura H. et al., 2004	En s'associant à des chaperonnes de type HSP70, CHIP peut activer la dégradation de la protéine Tau phosphorylée et réduire la mort neuronale induite par la présence de NFTs.

HRD1 (E3)	Saito R. et al., 2010 Shen Y. X. et al., 2012	Diminuée dans le cortex des patients atteints de maladie d'Alzheimer, HRD1 peut entraîner la dégradation de l'APP et de Tau phosphorylée, son rôle central dans l'ERAD suggère encore d'autres fonctions (voir texte).
UCH-L1 (déubiquitine- ligase)	Pasinetti G. M., 2001	Diminuée dans les cerveaux des patients atteints de maladie d'Alzheimer, ce qui pourrait expliquer en partie l'accumulation d'ubiquitine dans ces conditions.

L'inhibition du protéasome

En lien direct avec les altérations des fonctions d'ubiquitination retrouvées dans les cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer, l'activité du protéasome est diminuée dans les régions cérébrales les plus touchées par la pathologie (**Keller J. N. et al., 2000**). Ce phénomène pourrait provenir de différentes causes. Premièrement, la surcharge de protéines oxydées et ubiquitinées présentes dans la maladie d'Alzheimer est en elle-même inhibitrice du protéasome (**Bence N. F., et al., 2001**). Ensuite, les oligomères de peptide amyloïde- β 1-42 ont été caractérisés comme des inhibiteurs des différentes activités protéolytiques du protéasome *in vitro* : chymotrypsine, trypsine et peptidyle-glutamyle (**Tseng B. P et al., 2008**). Cette réduction de l'activité du protéasome a également été retrouvée dans les cultures primaires de neurones isolés de cerveaux de modèles murins surproduisant le peptide amyloïde, réversible via l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de l'activité γ -sécrétase (**Almeida C. G. et al., 2006**). *In vivo*, la diminution de l'activité du protéasome est constatée dans ces modèles, avec un rétablissement de cette activité suite à la suppression du peptide amyloïde- β par immunothérapie (**Tseng B. P et al., 2008**). Ces mêmes travaux ont révélé que le protéasome peut diminuer la quantité de peptide amyloïde- β et de protéine Tau *in vivo*. Par ailleurs, son inhibition dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer augmente significativement la quantité de peptide amyloïde- β intracellulaire dans les neurones (**Tseng B. P et al., 2008**).

III.4 Le système UPR

En réponse aux dysfonctions importantes du protéasome et de ses systèmes associés, la cellule engage l'UPR pour tenter de juguler le stress engendré. Bien que de nombreuses études rapportent l'activation de l'UPR dans les neurones des patients affectés par la maladie d'Alzheimer, son rôle dans le développement ainsi que dans la mécanique moléculaire de la pathologie n'est pas élucidé (**Scheper W. et al., 2015**). De façon plus générale l'UPR est impliquée dans de nombreuses maladies (Cancers, diabètes, inflammations chroniques, neurodégénérescences) et ses mécanismes complexes visent à l'activation d'une batterie de facteurs de transcription palliant le stress protéique (**Hetz C. et al., 2011**). Les cibles principales de l'UPR couvrent les chaperonnes et les membres de l'ERAD mais s'étendent au métabolisme, aux fonctions autophagiques, à la sécrétion et dans les cas de stress prolongé, à l'inflammation et à l'apoptose cellulaire (**Hetz C. et al., 2011**).

Trois senseurs complémentaires

Localisé au niveau du RE et du réseau Golgien, l'UPR possède trois senseurs pouvant entraîner une réponse graduée et adaptative, intégrée et difficile à isoler. Succinctement, le premier senseur, Perk (Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), inhibe la traduction protéique de façon globale (**Harding H. P. et al., 1999**). Le second senseur, ATF6, active la transcription de gènes associés aux chaperonnes et à l'ERAD (**Yoshida H. et al., 1998**). Le troisième senseur, Ire1 (Inositol requiring enzyme-1) active la maturation du facteur de transcription XBP-1s (X-box binding protein-1 spliced), qui possède certaines cibles communes à ATF6 mais qui régule également la biosynthèse lipidique, le métabolisme énergétique, les mécanismes autophagiques, la mort cellulaire et la réparation de l'ADN (**Acosta-Alvear D. et al., 2007**).

BiP, modulateur majeur de l'UPR

Le déclenchement de l'UPR est dépendant de l'état moléculaire de la chaperonne BiP (Voir **Figure 10**). En effet, la partie luminale des différents senseurs (Perk, Ire1 et ATF6) est orientée vers la lumière du RE et interagit avec BiP, empêchant l'activation de ces voies de régulation de façon constitutive (**Bertolotti A. et al., 2000 ; Morris J. A. et al., 1997**). Lorsque des protéines malformées s'accumulent dans le RE, BiP est relarguée pour accomplir sa fonction de chaperonne, libérant les senseurs de l'UPR et permettant la signalisation du stress jusqu'aux effecteurs en amont (**Bertolotti A. et al., 2000**). Grâce à ce système, la cellule peut déterminer l'état du stress réticulaire en fonction de la quantité de BiP libre ou lié, ceci de façon extrêmement rapide puisque le délai d'activation des senseurs de l'UPR est de l'ordre de la demi-heure (**DuRose J. B. et al., 2006**).

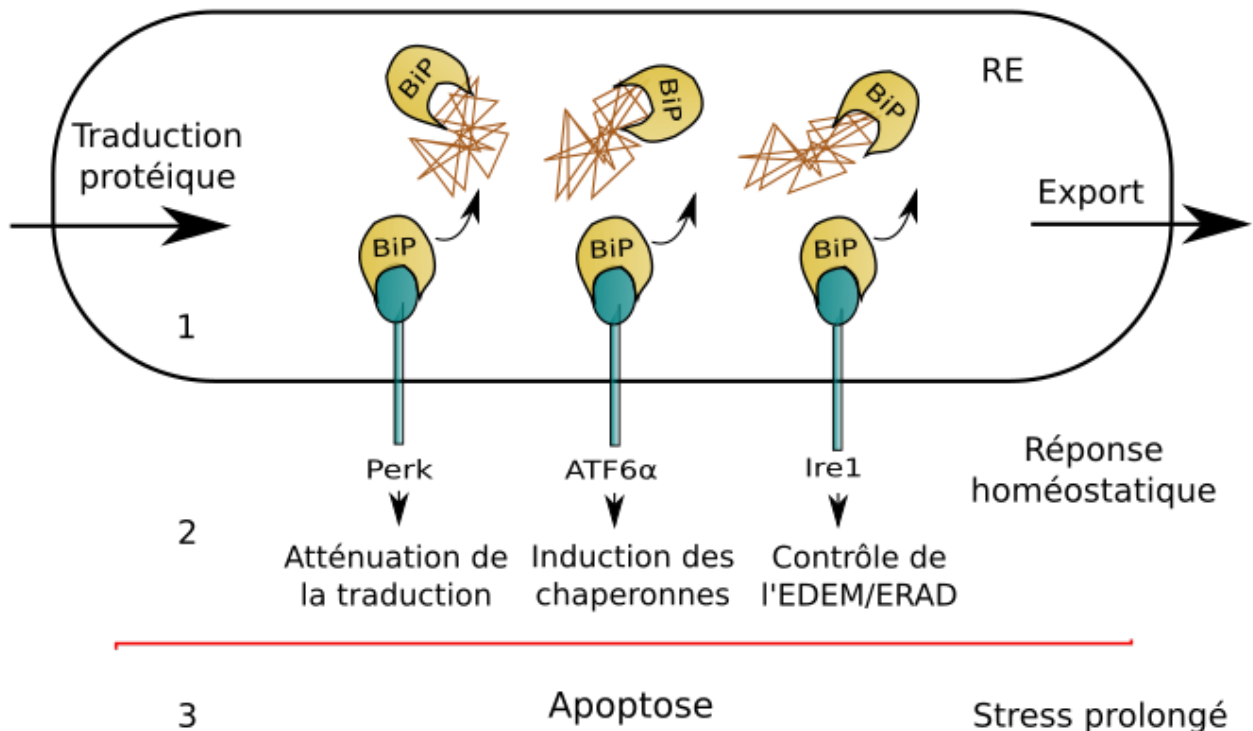


Figure 10 : Activation de l'UPR sous contrôle de BiP. 1. En deçà d'un certain seuil de stress, la chaperonne BiP s'associe à la partie luminale des senseurs de l'UPR et empêche leur activation. Lorsque des protéines malformées s'accumulent dans le RE, BiP est libérée pour exercer sa fonction de chaperonne, les senseurs de l'UPR sont activés. 2. Lors d'une augmentation de la traduction ou d'un stress modéré, l'UPR est actif de façon transitoire et homéostatique, stimulant différentes fonctions en rapport avec le repliement et la dégradation protéique. 3. Dans le cas de perturbations importantes du RE entraînant l'agrégation protéique ou la perte de fonction des chaperonnes, l'UPR restera actif pendant une période excessive et entraînera l'apoptose cellulaire.

III.4.a Perk

Perk est une protéine transmembranaire de type 1 résidente du RE, possédant un domaine kinase cytosolique nécessaire à la transmission des signaux de stress après le relargage de BiP dans la lumière du RE. Une fois libre, Perk peut s'auto-phosphoryler et s'homodimériser, devenant actif et capable de phosphoryler eIF2 α (eukaryotic translational initiation factor 2) pour l'inactiver et réduire la traduction protéique dans sa globalité (Voir **Figure 11**) (**Harding H. P. et al., 2000**). Cet état de phosphorylation et d'inhibition est normalement réversible, contrôlé par la phosphatase constitutive CReP (**Schroder M. et al., 2005**).

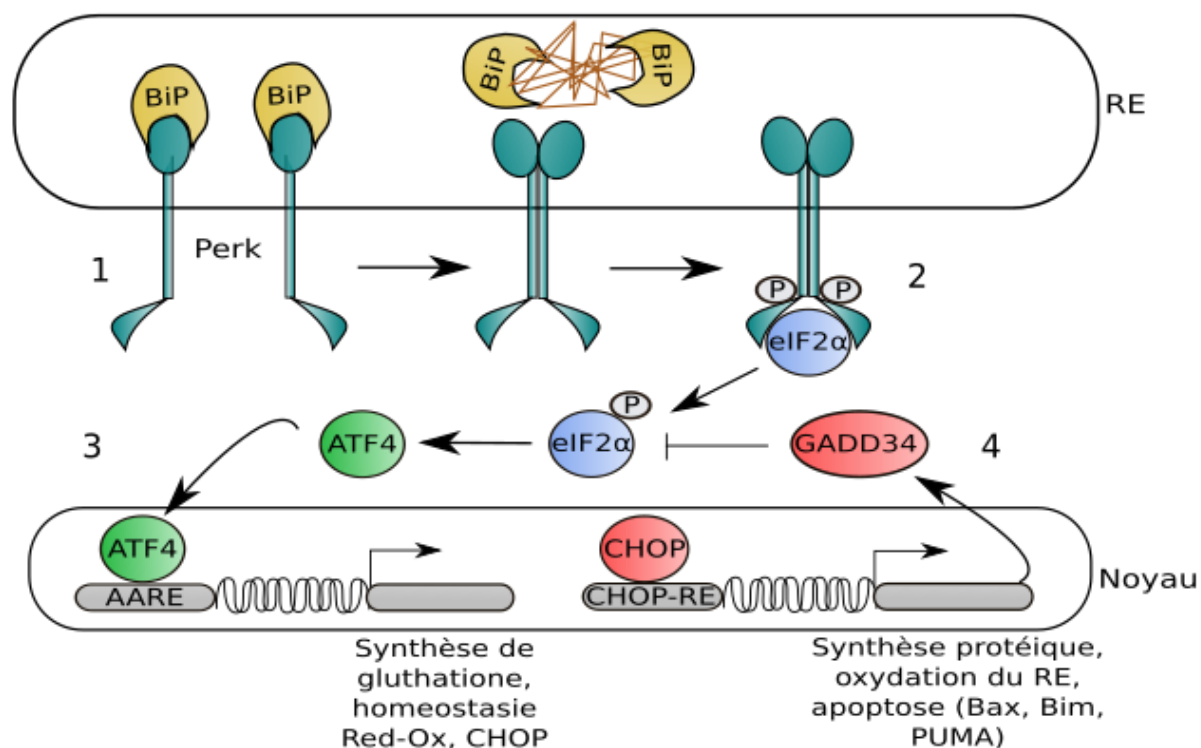


Figure 11 : L'activation et la régulation de Perk. 1. Perk est à l'état inactif non dimérisé sous contrôle de BiP, en présence de stress réticulaire BiP est libéré, entraînant la dimérisation et l'autophosphorylation de Perk. 2. Perk actif phosphoryle le facteur eIF2 α et l'inactive, ce qui inhibe la traduction protéique globale. 3. L'ARNm d'ATF4 possède des uORFs qui favorisent sa traduction lors de l'inhibition de eIF2 α , sa protéine agit comme un facteur de transcription reconnaissant certaines séquences AARE/CARE (Amino-Acid Response Element/C/EBP-ATF response element) et active l'homéostasie rédox cellulaire ainsi que la synthèse d'acides aminés. 4. ATF4 active également la transcription de CHOP, un facteur pouvant reverser l'inhibition de la traduction via l'activation de la phosphatase Gadd34, ainsi qu'activer l'apoptose en transactivant les gènes PUMA, Bax et Bim.

Une inhibition de la traduction nécessaire à l'activation d'ATF4

La phosphorylation prolongée d'eIF2 α va favoriser la traduction des ARNm possédant plusieurs uORFs (upstream open reading frames) dans leur séquence 5'UTR. Ces structures sont présentes sur de nombreux ARNm eucaryotes et permettent l'inhibition de leur traduction en condition normale, ceci via le décrochage du système ribosomal après leur lecture. À l'inverse, lorsque la présence de eIF2 α actif est réduite, l'initiation de la traduction peut-être retardée jusqu'à l'ORF principal codant la protéine cible (**Spriggs K. A. et al., 2010**). Ce mécanisme permet l'augmentation de la traduction du facteur de transcription ATF4, dont l'expression est faible hors condition de stress (**Vattem K. M. et al., 2004**). ATF4 possède différentes cibles transcriptionnelles, liées à l'homéostasie Red-Ox ainsi qu'à la néosynthèse et au transport d'acides aminés. Son activation augmente la quantité de glutathione disponible via la production de cystéine, permettant l'absorption du stress oxydatif généré lors de la formation des ponts di-sulfures indispensables à la conformation spatiale des protéines sécrétées (**Harding H. P. et al., 2003 ; Cuozzo J. W. et al., 1999**).

L'activation pro-apoptotique de CHOP

En parallèle, ATF4 peut aussi transactiver CHOP (CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein), un autre facteur de transcription régulant l'homéostasie Red-Ox, la synthèse de glutathione, ainsi que la stimulation de la traduction (**Fawcett T. W., 1999**). Opposé aux autres cibles d'ATF4, CHOP favorise la génération de radicaux libres oxygénés en augmentant les oxydases résidentes du RE comme ERO1 α (Endoplasmic Reticulum Oxidoreductase 1 alpha) (**Marciniak S. J. et al., 2004**). Il réduit également la quantité totale de glutathione cellulaire et favorise une levée du blocage de la traduction imposée par Perk et eIF2 α phosphorylé (**McCullough K. D. et al., 2001**). Cet effet est dépendant de GADD34, une phosphatase qui déphosphoryle eIF2 α , régulée au niveau transcriptionnel par CHOP (**Novoa I. et al., 2001**). En cas de stress prolongé, d'autres cibles directement liées à l'inhibition de l'apoptose, appartenant notamment à la famille Bcl-2, sont diminuées par CHOP (**Oyadomori S. et al., 2003**). En parallèle, des protéines pro-apoptotiques comme PUMA sont activées par ce facteur de transcription (**Galehdar Z. et al., 2010**).

Un senseur aux réponses opposées

En résumé, la réponse induite par Perk propose deux rôles a priori contradictoires. D'abord une atténuation de la traduction combinée à une augmentation de la résistance au stress oxydatif entraînée par la synthèse et le repliement protéique, une fonction qui est dépendante d'ATF4. Ensuite, une augmentation directe de la synthèse protéique via l'activation des oxydases résidentes du RE et la levée du blocage traductionnel contrôlé par CHOP. Des travaux ont confirmé ce schéma dualiste, révélant que l'invalidation génétique de Perk ou d'ATF4 sensibilise les cellules au stress réticulaire et oxydatif, alors que l'invalidation génétique de CHOP réduit l'induction de l'apoptose dans ces mêmes conditions (**Zinszner H. et al., 1998 ; Harding H. P. et al., 2003**). Physiologiquement, CHOP permet un retour de la traduction après une phase de stress, normalement jugulée par l'augmentation des capacités sécrétoires du RE. Cependant, si le stress n'est pas résolu alors la traduction de nouvelles protéines natives participera à l'encombrement du RE et sera délétère, entraînant l'apoptose (**Zinszner H. et al., 1998 ; Cornejo V. H. et al., 2013**).

III.4.b ATF6

Le second senseur de l'UPR, ATF6 α , est une protéine transmembranaire de type II exprimée dans le RE sous forme inactive. En plus de son domaine luminal sensible au stress réticulaire, sa partie cytoplasmique possède un domaine de liaison à l'ADN leucine-zipper basique (bZIP), couplé à un domaine fonctionnel d'activation de la transcription (**Haze K et al., 1999**). Cette forme transmembranaire et immature d'ATF6 α est transloquée du RE au réseau Golgien après relargage de BiP pour être clivée successivement par deux protéases associées à la fonction RIP, site 1 et site 2 (S1p, S2p) (Voir **Figure 12**) (**Ye J., et al., 2000**). Le produit de clivage cytosolique, ATF6 α (p50), est ensuite libéré et adressé au noyau pour réguler un ensemble de gènes associés aux fonctions de chaperonnes et à l'ERAD. La fixation d'ATF6 α (p50) à l'ADN est médiée par un site de reconnaissance ERSE (ER stress response element) présent dans le promoteur de ses cibles transcriptionnelles, ainsi que par la présence du cofacteur NF-Y (Nuclear Factor Y) (**Yoshida H. et al., 2000**).

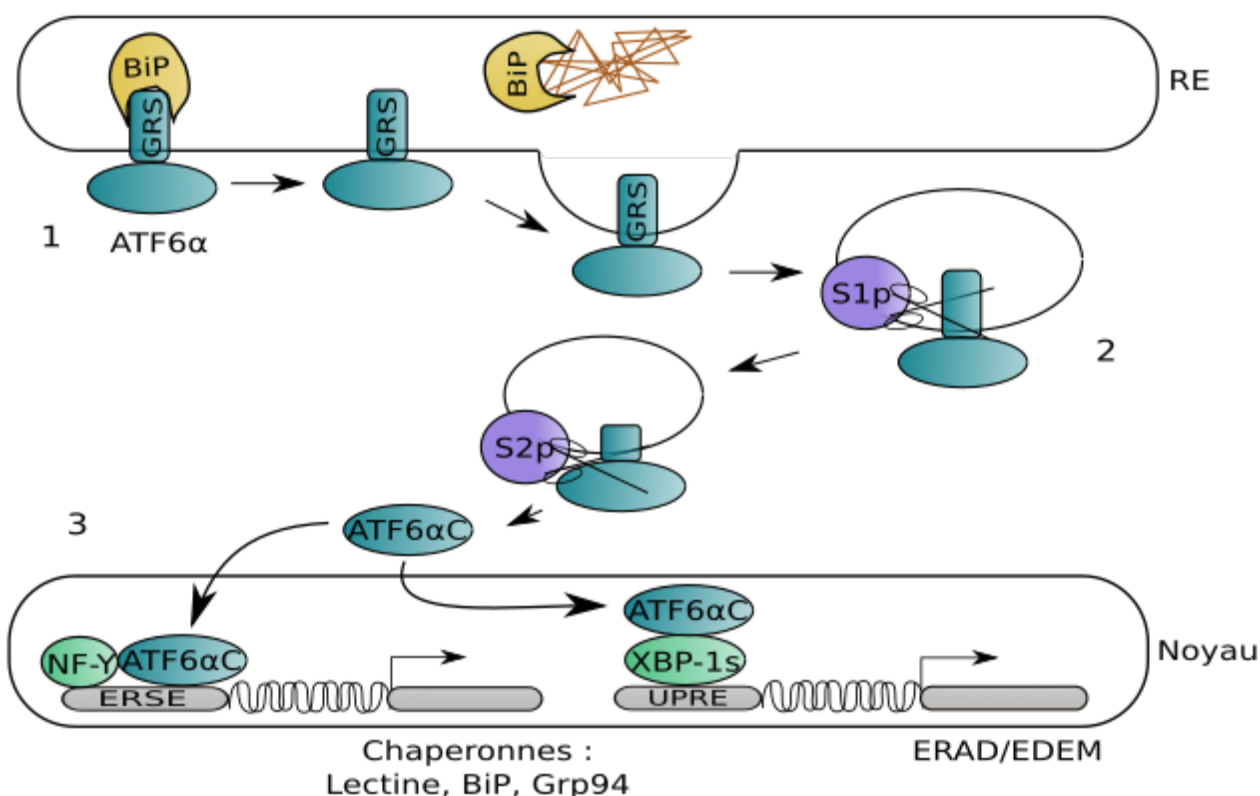


Figure 12 : L'activation et la régulation d'ATF6α. 1. BiP masque le signal de reconnaissance et d'adressage au Golgi (GRS) et garde ATF6 total inactif. En présence de stress réticulaire, BiP est libéré et ATF6 exporté dans les vésicules de Golgi. 2. Les protéases de l'activité RIP, S1p et S2p clivent séquentiellement ATF6 et produisent un fragment cytosolique ATF6α(p50). 3. En interagissant avec différents copartenaires nucléaires, ATF6α(p50) peut réguler de façon positive la transcription des chaperonnes du RE (association avec NF-Y sur les sites ERSE), ainsi que stimuler l'induction des gènes de l'ERAD/EDEM (association avec XBP-1s sur les sites UPRE).

Un régulateur des chaperonnes en association à XBP-1s

Parmi les cibles connues d'ATF6α, les chaperonnes BiP, Grp94 et calnexine ont pu être identifiées (Yoshida H. et al., 1998). Une autre cible importante d'ATF6α(p50) est XBP-1, un facteur de transcription dont l'ARNm subit une maturation contrôlée par le troisième senseur de l'UPR, Ire-1 (Yoshida H. et al., 2001). Ces deux facteurs sont connus pour agir de manière synergique puisque ATF6α(p50) et XBP-1 peuvent former des hétérodimères, cette association permettant à ATF6α d'agir comme un stimulateur de la transcription des membres de l'ERAD, dépendante des sites UPRE uniquement reconnus par XBP-1 (Yoshida H. et al., 2003 ; Yamamoto K. et al., 2007). En effet, les EDEM1 et les protéines de l'ERAD HRD1 et Herp sont toutes transactivées par ces hétérodimères en présence de stress du RE (Yamamoto K. et al., 2007).

ATF6 β et d'autres homologues aux rôles indéfinis

Protéolysée en parallèle d'ATF6 α dans le réseau Golgien, la protéine homologue ATF6 β est également capable de lier les sites ERSE et agirait potentiellement comme un régulateur négatif de la fonction d'ATF6 α , bien que les études sur le sujet ne soient pas toutes concordantes (**Thuerauf D. J. et al., 2004 ; Yamamoto K. et al., 2007**). En effet, la délétion génétique d'ATF6 α n'est pas létale, de même que la délétion d'ATF6 β , alors que la double suppression d'ATF6 α/β provoque la mort embryonnaire, supposant plutôt des fonctions compensatoires (**Yamamoto K. et al., 2007**). D'autres protéines putatives homologues à ATF6 sont également accumulées en présence de stress réticulaire, comme CREBH (**Zhang K. et al., 2006**), OASIS (**Kondo S. et al., 2005**), CREB4 (**Stirling J. et al., 2005**), BREB3 (**Liang G. et al., 2006**) ou BBF2H7 (**Kondo S. et al., 2007**), leurs rôles exacts dans l'UPR étant mal caractérisés.

III.4.c Ire1

Le troisième senseur de l'UPR, Ire1 (Inositol requiring enzyme 1), est une protéine résidente du RE et dispose d'une structure luminale ainsi qu'un mode d'activation similaire à Perk (**Tirasophon W. et al., 1998**). Cependant, en plus de posséder une activité kinase, la partie cytosolique d'Ire1 dispose également d'une activité endoribonucléase atypique, toutes les deux fonctionnelles après l'homodimérisation du senseur en condition de stress réticulaire (**Shamu C. E. et al., 1996 ; Tirasophon W. et al., 1998**). Comme les autres membres de l'UPR, Ire1 est constitutivement inactif en étant lié à BiP dans le RE (**Bertolotti A. et al., 2000**). Cependant, la délétion du domaine protéique de liaison à BiP ne provoque ni suractivation de cette voie de l'UPR, ni abolition de la détection du stress réticulaire (**Kimata Y. et al., 2004**). Le mécanisme à l'origine de cette particularité n'est pas élucidé, certains travaux ont montré la possible interaction directe de Ire1 avec des protéines malformées, suggérant une indépendance de Ire1 à BiP (**Kimata Y. et al., 2007**). Mais une autre étude n'a pas reproduit ces résultats et conserve BiP comme un modulateur important de l'activation de Ire1, ces disparités pourraient provenir des différents modèles eucaryotes utilisés (levures ou mammifères) (**Oikawa D. et al., 2009 ; Onn A. et al., 2010**).

Après s'être dimérisé, Ire1 s'auto-phosphoryle sur plusieurs résidus sérine. Le rôle exact de ces phosphorylations n'est pas déterminé, mais au moins trois d'entre elles sont caractérisées comme indispensables à l'activation complète de la fonction endoribonucléase d'Ire1 (ser724, ser726 et ser729) (Ali M. M. U. et al. 2011 ; Prischi P. et al., 2014). Cependant, une autre étude à priori contradictoire propose que cet état de phosphorylation permettrait d'éviter l'activation prolongée et délétère de cette voie de l'UPR (Chawla A. et al., 2011). En effet, l'abolition des sites d'autophosphorylation d'Ire1 provoque un stress chronique du RE, interprété comme une incapacité de la cellule à contrôler son homéostasie (Rubio C. et al., 2011). Dans tous les cas, la dimérisation d'Ire1 est indispensable à son activation, et son activité endoribonucléasique dépendante de son état de phosphorylation. Récemment, des formes oligomériques de haut poids moléculaire ont également été observées lorsque la protéine est surexprimée. Le degré de multimérisation pouvant moduler la surface et l'affinité du site de fixation aux ARNs (Korrenykh A. V. et al., 2009 ; Li H. et al., 2010).

La fonction kinase d'Ire1

En présence de stress réticulaire, la fonction kinase d'Ire1 est capable de mobiliser et phosphoryler des protéines cytosoliques impliquées dans l'inflammation et la mort cellulaire. L'un des principaux adaptateurs recruté par Ire1 est TRAF2 (TNFR-associated factor 2) (Urano F. et al., 2000a) (Voir **Figure 13**). Cette association permet l'initiation d'une voie pro-apoptotique via la formation d'un complexe impliquant NF- κ B, et aboutissant à l'induction du facteur TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) (Hu P. et al., 2006). Le couple Ire1/TRAF2 peut également déclencher l'apoptose via la phosphorylation et l'activation des kinases amino-terminales c-Jun et JNK (Voir **Figure 13**) (Urano F. et al., 2000b ; Nishito H. et al., 2002). En parallèle, cette voie dépendante de JNK peut induire l'autophagie lors de stress de courte durée, révélant une réponse graduée et adaptative (Ogata M. et al., 2006). De plus, cette voie est sensible au stress réticulaire ainsi qu'à l'inhibition directe du protéasome, ce qui place l'autophagie comme un mécanisme compensatoire à une réduction du système ERAD (Ding W. X. et al., 2007). D'autres protéines ciblées par l'activité kinase d'Ire1 en condition de stress ont été caractérisées, notamment ERK-1 et p38, associées à des fonctions favorisant la survie cellulaire (Nguyen D. T. et al., 2004).

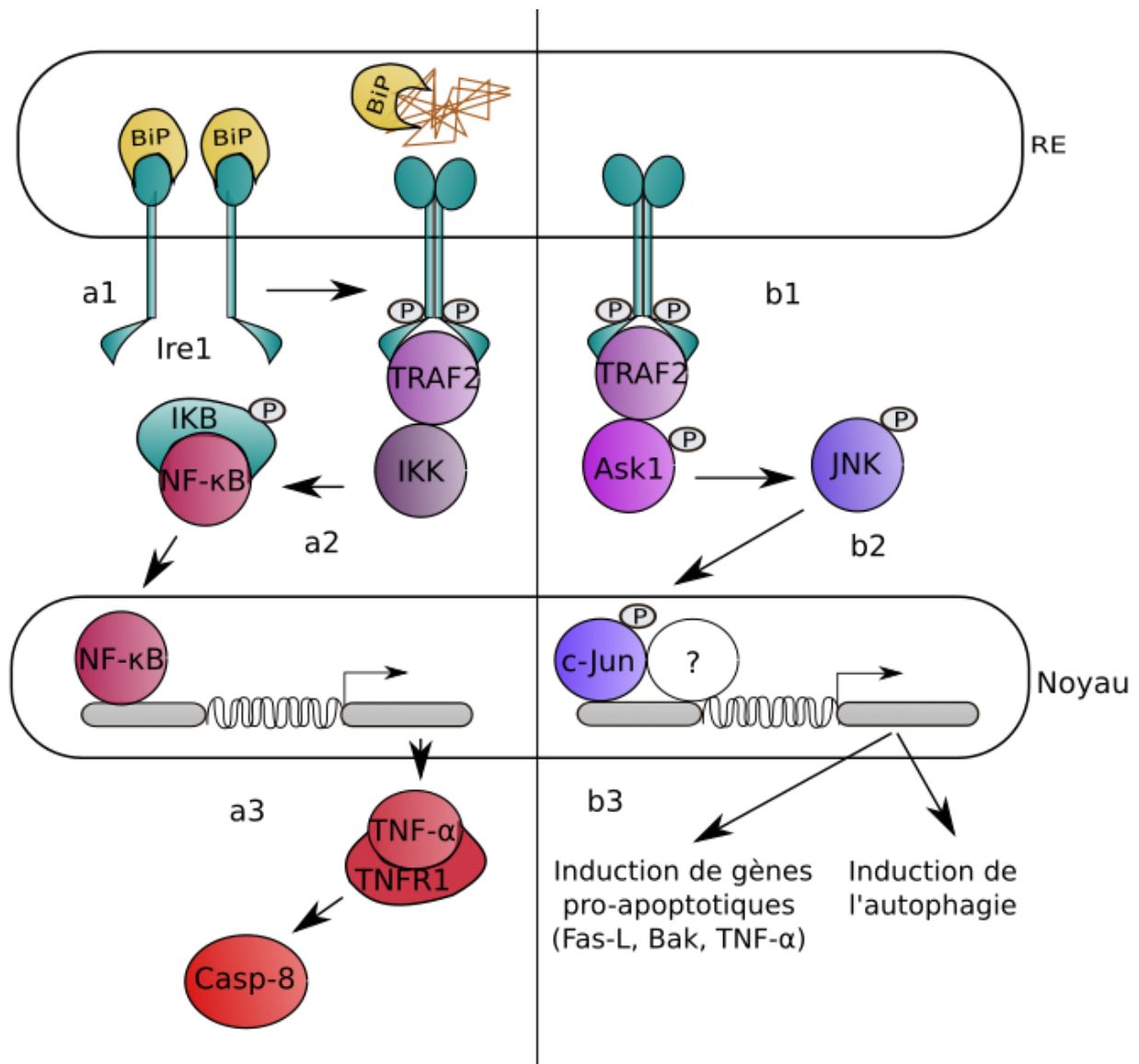


Figure 13 : La fonction kinase d'Ire1. **Fig. a1 :** Le stress réticulaire permet la libération de BiP et permet l'homodimérisation ainsi que l'autophosphorylation d'Ire1. Une fois actif, Ire1 peut recruter TRAF2 qui s'associe lui-même avec les complexes IKK α ou β . **Fig. a2 :** IKK phosphoryle IKB, une protéine qui séquestre le facteur de transcription NF- κ B dans le cytoplasme, IKB est ensuite dégradé par le protéasome et NF- κ B adressé au noyau. **Fig. a3 :** NF- κ B peut induire la transcription du facteur TNF- α , qui va lier son récepteur TNFR1 de façon autocrine et déclencher l'apoptose via l'activation de la caspase 8.

Fig. b1 : Suivant le même mode d'activation présenté dans la figure **a1**, Ire1 recrute TRAF2 qui s'associe à Ask1 et permet sa phosphorylation et son activation au sein de ce nouveau complexe. **Fig b2 :** Ask1 possède une fonction kinase et phosphoryle JNK, ce qui permet son adressage au noyau. **Fig b3 :** JNK peut alors phosphoryler et activer ou réprimer de nombreux facteurs de transcription (non exhaustif : ATF2, ATF3, p53, RxRa), l'une de ses cibles principale étant c-Jun qui peut transactiver différents gènes pro-apoptotiques. Cependant, en cas d'activation de courte durée de l'UPR, JNK-p peut favoriser l'activation de l'autophagie et aider à la survie cellulaire.

La fonction endoribonucléasique atypique d'Ire1

Une fois activée, Ire1 peut agir comme une endoribonucléase cytoplasmique. L'un de ses substrats les plus caractérisés étant XBP-1, un facteur de transcription considéré comme un régulateur majeur de la réponse UPR (**Calfon M. et al., 2002**). L'épissage de l'ARNm de XBP-1 par Ire1 est considéré atypique, puisqu'il se déroule dans le cytoplasme plutôt que dans le noyau, et ne requiert pas les séquences consensus utilisées par le spliceosome (**Aragon T. et al., 2009 ; Uemura A et al., 2009**). L'épissage en lui-même est catalysé par Ire1 via une conformation en boucle au niveau des jonctions intron-exon de l'ARNm de XBP-1 (Voir **Figure 14**), s'affranchissant de la formation d'une structure de Lariat propre à l'épissage nucléaire (**Yoshida H., 2007**). La réaction est achevée par le recrutement d'ARN ligases cytosoliques. Ce système permet un épissage beaucoup plus rapide à partir de la réserve d'ARNs déjà transcrite, alors que la contrepartie nucléaire doit être réalisée après une transcription *de novo* de l'ARN cible (**Yoshida H. et al., 2006**). L'ARNm pré-mature de XBP-1 est nommé XBP-1u (unspliced), et encode une protéine tronquée de stabilité faible agissant comme un répresseur de la transcription de XBP-1 (**Yoshida H. et al., 2006 ; Navon A. et al., 2010**). D'autres rôles ont également été associés à XBP-1u, comme l'adressage de son propre ARNm au site d'épissage d'Ire1 (**Yanagitani K. et al., 2009**). L'épissage de XBP-1u par Ire1 entraîne le retrait d'un intron de 26 nucléotides, produisant la forme longue et complète de XBP-1, XBP-1s (spliced) (Voir **Figure 14**).

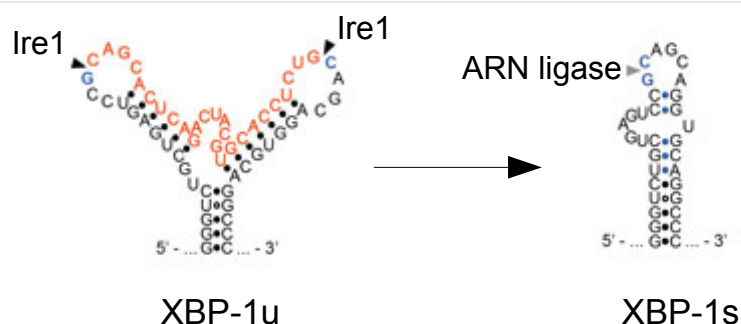


Figure 14 : L'épissage atypique de XBP-1u par Ire1. L'ARNm de XBP-1u possède une conformation spatiale exposant deux boucles formées par un intron de 26 paires de bases (en rouge). Cette structure est clivée sur deux sites par Ire1, ce qui libère l'intron. L'appariement des deux exons encadrant l'intron excisé est très conservé et permet le rapprochement de leurs extrémités et leur ligation par les ARNs ligases cytosoliques. La séquence intronique clivée contient un motif entraînant une pause traductionnelle de l'ARNm de XBP-1, produisant une protéine tronquée (261 acides aminés) rapidement dégradée. Après son retrait, la traduction de la protéine XBP-1s complète (376 acides aminés) peut-être achevée. (Image : **Peschek et al., 2015**)

La fonction RIDD

D'autres ARNm sont également substrats de la fonction endoribonucléase d'Ire1. Mais contrairement à XBP-1, ils ne sont pas épissés pour produire des ARNm matures mais dégradés, on décrit alors cette fonction sous l'appellation RIDD (Regulated Ire1-dependant decay) (**Hollien J. et al., 2006 ; Hollien J. et al., 2009**). De façon inattendue, l'activation pharmacologique isolée d'Ire1 ne déclenche pas l'activité RIDD, un stress global au niveau du RE est nécessaire, alors que cette stimulation ciblée d'Ire1 est suffisante pour provoquer l'épissage de XBP-1 (**Hollien J. et al., 2009**). Les mécanismes à l'origine de cette différence ne sont pas connus, mais suggèrent une réponse graduée au stress. Parmi les substrats de l'activité RIDD on compte l'ARNm de l'insuline, l'ARNm d'Ire1 lui-même, ainsi que de nombreux ARNm codant des protéines des voies sécrétoires (HMG-CoA réductase, β 2 microglobuline et d'autres récepteurs de surfaces) (**Han D. et al., 2009 ; Tirasophon W. et al., 2000**). Le rôle de cette fonction serait le contrôle de la traduction des protéines nécessitant des repliements spatiaux complexes pouvant facilement encombrer le RE.

Ire1 : Le lien critique entre homéostasie et apoptose ?

La multiplicité des axes de signalisation contrôlés par Ire1 (homéostatiques ou pro-apoptotiques), appelle à une régulation fine du senseur. En effet, plusieurs facteurs activés en présence de stress réticulaire ont d'ailleurs été caractérisés comme des modulateurs de la voie de signalisation d'Ire1, notamment dans les premières phases de l'UPR (**Woehlbier U. et al., 2011**). Différentes protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bak, AIP1 et PTP1B, sont capables de colocaliser et d'interagir avec Ire1 pour faciliter son activité endoribonucléase, augmentant l'épissage de XBP-1 (**Hetz C. et al., 2006 ; Luo D. et al., 2008 ; Gu F. et al., 2004**). XBP-1 étant connu comme un cytoprotecteur, cette régulation suggère que dans les premières phases de l'UPR, la stimulation éventuelle de facteurs pro-apoptotiques n'est pas toujours délétère et laisse une chance à la cellule de retrouver son homéostasie (**Lisbona F. et al., 2009 ; Woehlbier U. et al., 2011**). Ceci amène à l'autre pendant indissociable de l'axe de régulation médié par Ire1 : le facteur de transcription XBP-1.

III.4.d - XBP-1

Avant d'être identifié comme l'un des éléments cruciaux de la réponse UPR, XBP-1 a été caractérisé comme nécessaire à l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II du système immunitaire, mais surtout indispensable au fonctionnement correct de la sécrétion importante des cellules B (plasmocytes) (**Liou H. C. et al., 1990**). La protéine XBP-1s est un facteur de transcription de type leucine-zipper appartenant à la famille CREB (Cyclic AMP response element binding protein), capable d'interagir avec de nombreux copartenaires pour réguler l'expression d'un ensemble de gènes variant d'un type cellulaire à un autre, avec comme tout un core commun.

XBP-1s, un régulateur majeur de la biogenèse protéique

Parmi les cibles bien définies de XBP-1s on retrouve principalement des gènes impliqués dans le système sécrétoire et la synthèse protéique, ainsi que l'UPR. Plusieurs chaperonnes résidentes du RE, comme ERdj, HEDJ, p58IPK et les disulfites isomérases PDI-P5 sont transactivées par XBP-1s au niveau de leur promoteur (**Lee A. H. et al., 2003**). D'autres chaperonnes majeures du RE comme BiP, ne sont que faiblement régulées par XBP-1s (**Lee A. H. et al., 2003**). Certains membres de l'ERAD (HRD1, Herp, et les Derlines), les EDEMs et plus globalement, les gènes codants pour les protéines impliquées dans les mécanismes de glycosylation du RE, sont des cibles de XBP-1s (**Oda Y. et al., 2006 ; Yoshida H. et al., 2003 ; Kaneko M. et al., 2003 ; Lee A. H. et al., 2003**). De façon plus vaste et en accord avec la première caractérisation de XBP-1, la biogenèse du RE et du réseau Golgien est considérablement accrue par XBP-1s, notamment dans les plasmocytes et les cellules sécrétrices (cellules pancréatiques, cellules exocrines des glandes salivaires, cellules de Paneth). Ces effets sont associés à une augmentation de la synthèse protéique et lipidique, ainsi qu'à une augmentation du diamètre cellulaire et une activation du métabolisme mitochondrial (**Shaffer A. L. et al., 2004 ; Sriburi R. et al., 2007 ; Sriburi R. et al., 2004**).

Un facteur indispensable à l'homéostasie des tissus sécrétoires et du métabolisme

Le rôle central de XBP-1 dans la sécrétion protéique est mis en évidence lors de son invalidation génétique ciblée dans les tissus sécrétoires, qui entraîne l'échec du développement de ces fonctions biologiques **(Lee A. H. et al., 2005)**. L'implication de XBP-1 dans d'autres fonctions est révélée par son invalidation constitutive et généralisée dans un modèle murin, létale au niveau embryonnaire et caractérisé par une hypoplasie du foie **(Reimold A. M. et al., 2000)**. La complémentation hépatique de XBP-1 permet aux souris transgéniques de survivre après la naissance, mais elles succombent rapidement suite à l'absence du développement des fonctions digestives et pancréatiques **(Lee A. H. et al., 2005)**.

Malgré les liens moléculaires étroits entre XBP-1s et Ire1, l'invalidation génétique d'Ire1 provoque un phénotype différent de la délétion de XBP-1. En effet, même si l'invalidation constitutive d'Ire1 entraîne également la mort embryonnaire, sa complémentation doit être réalisée au niveau du placenta et non au niveau hépatique pour récupérer la viabilité de l'embryon **(Iwakawi T. et al., 2009)**. Lors de l'invalidation conditionnelle d'Ire1 à l'âge adulte, on observe une légère hypo-insulémie et hyperglycémie ainsi qu'un poids réduit des souris **(Iwakawi T. et al., 2010)**. Ces déficits sont confirmés par des altérations tissulaires du pancréas, mais aucun dysfonctionnement hépatique n'est observé **(Iwakawi T. et al., 2010)**. Ire1 pouvant commander différentes fonctions pro-apoptotiques, il est possible que la délétion de XBP-1 provoque la sur-activation de ces voies de signalisation en présence de stress, aggravant le phénotype observé dans les souris invalidées pour XBP-1 en comparaison à celles invalidées pour Ire1 **(Han D. et al., 2009)**. Cette observation souligne d'autant plus le rôle majeur de XBP-1 dans l'homéostasie et la survie cellulaire.

Des rôles dépendants d'associations multiples

Pour exercer l'ensemble de ses fonctions variées, XBP-1s est capable de recruter de nombreux copartenaires. Le plus connu et décrit étant ATF6 α (p50), le fragment cytosolique du senseur UPR ATF6. L'hétérodimérisation de XBP-1s avec ATF6 α (p50) potentialise la transcription de différentes cibles de XBP-1s au niveau de l'ERAD et des chaperonnes, bien que XBP-1s seul soit suffisant pour obtenir une induction plus limitée de ces gènes **(Yamamoto K. et al., 2007)**. D'autres copartenaires ont été révélés en présence de stress réticulaire, comme la sous-unité p85 α régulatrice de PI3K (Phospho-Inositide 3-kinase) impliquée dans le métabolisme cellulaire. Cette sous-unité peut former des hétérodimères avec XBP-1s pour accroître sa localisation au noyau et donc son pouvoir transcriptionnel **(Park S. W. et al., 2010)**. Lors de la délétion de p85 α , une réponse UPR altérée à tendance pro-apoptotique augmentée est constatée **(Winnay J. N. et al., 2010)**. XBP-1s peut également interagir avec le facteur de transcription FoxO1 (Forkhead box 01), un autre élément lié au métabolisme cellulaire, et directement commander son adressage au protéasome sans recourir à l'induction de gènes de la dégradation protéique de l'UPR **(Zhou Y. et al., 2011)**. En plus d'être un régulateur de la biosynthèse protéique et du métabolisme, XBP-1s est également un ligand du récepteur aux oestrogènes α , pouvant alors activer la prolifération cellulaire **(Ding L. et al., 2003)**. La dérégulation de cette voie étant associée à la résistance aux traitements pharmacologiques anti-tumeurs visant l'arrêt du cycle cellulaire **(Shajahan A. N. et al., 2009)**.

Outre les interactions avec ses copartenaires, l'activité de XBP-1s peut être modulée par différentes modifications post-traductionnelles sur certains résidus lysines présents dans sa partie COOH terminale. En condition de stress du RE, différentes acétylations ou déacétylations, régulant respectivement de façon positive ou négative la stabilité de XBP-1s sont médiées par p300 et SIRT1 (Sirtuine 1) **(Wang F. M. et al., 2011)**. L'invalidation génétique de la déacétylase SIRT1 augmente notablement la résistance des cellules à l'apoptose induite par le stress réticulaire **(Wang F. M. et al., 2011)**. D'autres types de modifications, comme la sumoylation, altèrent de façon négative l'activité de XBP-1s, ceci sans modifier sa présence au noyau **(Chen H., et al., 2010)**.

III.4.e - L'UPR dans la maladie d'Alzheimer

Les présénilines, un lien génétique avec l'UPR

L'un des premiers liens entre l'implication de l'UPR et le développement de la maladie d'Alzheimer, impliquait les présénilines, les sous-unités catalytiques de la γ -sécrétase responsables de la production du peptide amyloïde- β . En effet, plusieurs études ont révélé des interactions directes entre les présénilines et certaines pompes calciques du RE, comme SERCA, les récepteurs IP3-R et RyR, pouvant mener à une modulation de l'homéostasie calcique cellulaire (**Haifeng J. et al., 2009 ; Hornarnejad K. et al., 2012**). Différentes mutations génétiques des présénilines 1 ou 2 associées aux formes familiales de la maladie d'Alzheimer ont été liées à une diminution de l'activation des différents senseurs de l'UPR (Ire1, ATF6 et Perk) *in vitro*, altérant l'induction de chaperonnes comme BiP et sensibilisant les cellules au stress réticulaire et à l'apoptose (**Yasuda Y. et al., 2002 ; Katayama T. et al., 1999 ; Niwa M. et al., 1999**). Cependant, d'autres études n'ont pas retrouvé ces modifications d'expression des chaperonnes dans des modèles invalidés pour les présénilines, mettant en doute les mécanismes exacts en jeu dans ce contexte cellulaire (**Sato N. et al., 2000**). Malgré ce point en suspens, un corpus de la littérature associe ces mutations des présénilines à des dysfonctions de l'homéostasie calcique, le modèle précis et la conséquence exacte de ces perturbations étant toujours débattus (**Tu H. et al., 2006 ; Hornarnejad K. et al., 2012**). Globalement, même si les mécanismes sous-jacents responsables des phénotypes observés dans les contextes présentés ne sont pas élucidés, ces études constituent une première preuve génétique d'une altération possible de l'UPR dans la maladie d'Alzheimer.

L'inhibition de la synthèse protéique et la formation de la mémoire

Un second lien plausible entre la pathologie et l'UPR se situe au niveau de la protéine Perk. En effet, l'état d'activité de cette kinase dans les cellules neuronales est important puisque certaines phases de la potentialisation de la mémoire à long terme sont hautement dépendantes de la synthèse protéique (**Costa-Mattioli M. et al., 2008**). Plusieurs

mécanismes d'atténuation de la traduction ont été associés à l'inhibition de la plasticité synaptique lors de la formation de cette mémoire, dont la phosphorylation de Perk et l'induction d'ATF4 (**Costa-Mattioli M. et al., 2007 ; Chen A. et al., 2003**). À l'inverse, la potentialisation de la mémoire à court terme est favorisée dans ces mêmes conditions (**Costa-Mattioli M. et al., 2007**).

Perk ; un acteur indéfini de la maladie Alzheimer

De par cette implication en tant que médiateur entre les différents types de mémoires, plusieurs travaux se sont intéressés à son rôle possible dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Des premiers rapports ont constaté un niveau de phosphorylation de Perk et eIF2 α augmenté dans les cerveaux des patients atteints par la pathologie (**Chang R. C. et al., 2002**). De manière intéressante, cette activation est présente aux premiers stades de la maladie, dans les neurones hippocampiques et dans le cortex frontal, ainsi qu'accrue dans les cellules saines comparées aux cellules en dégénérescence (**Hoozemans J. J. M. et al., 2005 ; Hoozemans J. J. M. et al., 2012**). Plusieurs rôles délétères en rapport étroit avec la maladie d'Alzheimer ont été associés à Perk et à l'inhibition de la traduction. Premièrement, BACE1, indispensable à la production du peptide amyloïde- β est augmentée suite à la phosphorylation de eIF2 α car la partie 5'UTR de l'ARNm de BACE1, à l'instar d'ATF4, possède de multiples uORFs (**O'Connor T. et al., 2008**). Ensuite, l'activation de Perk est corrélée à l'augmentation de GSK-3 β , une kinase responsable de la phosphorylation de Tau et impliquée dans son agrégation (**Hoozemans J. J. M. et al., 2009**). Un polymorphisme nucléotidique de Perk a d'ailleurs été associé au risque d'apparition de certaines tauopathies (Progressive supra-nuclear palsy) (**Hoglinger G. U. et al., 2011**). Malgré ces modulations a priori nocives pour la cellule, l'invalidation génétique de Perk potentialise les effets toxiques des oligomères de peptide amyloïde- β 1-42 *in vitro*, et la stimulation pharmacologique de la phosphorylation de Perk réduit l'apoptose induite par ces mêmes oligomères (**Lee D. Y. et al., 2010**). Cet effet protecteur semble médié par l'induction de certaines chaperonnes telles que BiP, ce qui est consistant avec les observations montrant une co-expression de Perk actif et de BiP dans les neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (**Hoozemans J. J. M. et al., 2012**). Une autre étude a révélé la présence de CHOP associée à une diminution

de BiP dans les cerveaux de patients touchés par la pathologie, suggérant alors un possible changement de la fonction de Perk : choisissant un rôle homéostatique puis pro-apoptotique au cours du développement de la maladie (**Lee J. H. et al., 2010**).

Différents mécanismes ont été avancés pour expliquer l'activation accrue de Perk dans les cerveaux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Le stress oxydatif et les déficits métaboliques, deux lésions présentes dans la pathologie mais également corrélées au vieillissement, sont activatrices de la voie Perk et donc de BACE1 et de l'amyloïdogénèse (**Mouton-Liger F. et al., 2012 ; O'Connor T. et al., 2008**). Le peptide amyloïde- β lui-même est suggéré comme un activateur direct de l'UPR dans sa globalité et de Perk, notamment via la perturbation de l'homéostasie calcique et rédox du RE indispensable au fonctionnement des chaperonnes et des α -mannosidases du système EDEM (**Alberdi E. et al., 2013**).

XBP-1s, stimulateur de la neurogenèse dans des conditions normales

Beaucoup plus récemment, un autre élément de l'UPR, XBP-1s, a été lié à la formation et à l'amélioration de la mémoire (**Martinez G. et al., 2016**). BDNF (Brain derived neurotrophic factor), un facteur de croissance neuronal, exhibe un site UPRE dans son promoteur qui possède les séquences nécessaires à la fixation de XBP-1s. Les souris invalidées de façon conditionnelle pour XBP-1s ont une quantité totale de BDNF diminuée, avec des performances cognitives réduites lors des différents tests de comportement exécutés. À l'inverse, l'activation de l'expression de XBP-1s au niveau de l'hippocampe augmente la mémoire spatiale. De manière intéressante, BDNF lui-même peut être activateur de Ire1 et donc stimuler sa propre transcription, ceci sans déclencher l'UPR de façon globale. Néanmoins, cet axe de régulation a été étudié dans des conditions physiologiques, l'effet du stress réticulaire sur cette voie de signalisation reste à déterminer.

XBP-1s également neuroprotecteur en condition de stress

Précédemment, certains travaux avaient suggéré le rôle neuroprotecteur de XBP-1s, dans le cadre de la maladie d'Alzheimer et différentes protéinopathies. La surexpression *in vitro* de XBP-1s protège de l'exposition aux peptides amyloïdes- β 1-42 oligomériques dans différents modèles cellulaires, sans que les mécanismes à l'oeuvre derrière ces observations ne soient clairement déterminés (**Casas-Tinto S. et al., 2011**). L'activation de l'épissage de XBP-1u semble également répondre à des traitements cellulaires de différents types d'oligomères peptidiques, dont ceux de peptide amyloïde- β (**Castillo-Carranza D. L. et al., 2012**). Une accumulation de XBP-1s est retrouvée dans le cortex frontal des cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer, combinée à une augmentation de certaines de ses cibles transcriptionnelles comme la chaperonne PDI-P5 (**Lee J. H. et al., 2010**). Par ailleurs, un polymorphisme nucléotidique du promoteur de XBP-1 a également été associé à une augmentation du risque de développer la pathologie dans certaines populations humaines (**Liu S. Y. et al., 2013**).

L'analyse *in silico* du large panel de gènes potentiellement régulés par XBP-1s a révélé plusieurs cibles transcriptionnelles en rapport direct avec certains acteurs de la maladie d'Alzheimer. PS1, la nicastrine et Pen-2, trois membres du complexe γ -sécrétase, montrent des sites de fixation de XBP-1s dans leur promoteur (**Acosta-Alvear D. et al., 2007**). Des kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau, comme Cdk5 et Cdk5rap3, sont également des cibles putatives de XBP-1s (**Acosta-Alvear D. et al., 2007**). Aucune étude ne valide expérimentalement ces résultats, mais des travaux ont récemment révélé une régulation transcriptionnelle d'ADAM10, le principal responsable du clivage α -sécrétase de l'APP par XBP-1s (**Reinhardt S. et al., 2014**). Cette activation positive d'ADAM10 augmente la quantité de sAPP α produite par les cellules, ce qui apparaît cohérent avec le rôle neuroprotecteur de XBP-1.

Le rôle de XBP-1s dans l'UPR propre à la maladie d'Alzheimer reste à définir

Malgré ces données, la caractérisation des mécanismes reliant XBP-1s dans l'UPR avec la régulation des composantes de maladie d'Alzheimer reste très incomplète. Une étude *in vitro* a révélé la modulation de l'expression post-traductionnelle de l'APP via l'ERAD et l'ubiquitine ligase HRD1, sous contrôle transcriptionnel de XBP-1s (**Kaneko M. et al., 2010**). L'activation de l'ERAD et la diminution de la quantité d'APP conduisent à une diminution de la quantité de peptide amyloïde- β produit. D'autres travaux ont également caractérisé la protéine tau comme une cible de HRD1 et de l'ERAD (**Shen Y. X., et al., 2012**).

Au vu de la localisation cellulaire et du mode d'adressage et de transport de la machinerie enzymatique responsable de la production du peptide amyloïde- β , l'implication de l'ERAD dans la régulation d'autres sécrétases semble être une piste plausible. Mes travaux au sein du laboratoire du Dr. Frédéric Checler se sont donc intéressés à cette possibilité, ainsi qu'à la régulation de l'ERAD par le peptide amyloïde- β lui-même (**Partie IV**).

En parallèle, d'autres travaux de recherche dans le même laboratoire, dirigés par le Dr. Moustapha Cissé et auxquels j'ai participé, se sont intéressés à l'implication du facteur de transcription XBP-1s dans la formation de la mémoire dans un contexte pathologique (Modèle murin 'Alzheimerisé') (**Partie V**).

IV - La régulation de l'expression de BACE1 dépendant de XBP-1 et impliquant HRD1 via le peptide amyloïde- β 1-42 oligomérique

A β 42 oligomers modulate BACE1 through an XBP-1s-dependent pathway involving HRD1.

Yannis Gerakis, Julie Dunys, Charlotte Bauer and Frédéric Checler

IV.1 - La modulation de l'expression et l'activité de BACE1 par les oligomères de peptide amyloïde- β 1-42

Pour obtenir une quantité d'oligomères suffisante en comparaison à la forme monomérique, à partir de peptide amyloïde 1-42 humain de synthèse, j'ai employé un protocole défini et partagé par le professeur Sérgio Ferreira (détails en section matériel et méthode). Le traitement de cellule SH-SY5Y (Neuroblastomes) avec ces oligomères a entraîné une augmentation de l'ARN messenger de BACE1 (**Figure 1B**), peu ou pas reflété par son expression protéique (**Figures 1C et 1D**).

Cependant, dans un modèle cellulaire produisant naturellement des oligomères de peptides amyloïde- β (**Figure 1E**), via l'expression d'un transgène de l'APP portant une mutation favorisant la production de peptide amyloïde- β (mutation LDN), j'ai observé une activation de l'ARNm, de la protéine et de l'activité de BACE1 (**Figures 1F, 1G, 1H et 1I**). Cette différence inattendue pourrait provenir du mode de traitement, transitoire dans un cas et prolongé dans l'autre, la présence de l'APP ne semblant pas affecter de façon significative l'expression de BACE1 (contrôle d'expression de l'APP sauvage négatif). Ces premiers résultats semblent consistants avec les observations *in vivo* rapportant une accumulation de BACE1 possible dans les cerveaux des patients touchés par la maladie d'Alzheimer.

IV.2 - Les oligomères de peptide amyloïde- β 1-42 induisent l'épissage de XBP-1s

En utilisant des amorces de PCR quantitative permettant de détecter de façon spécifique la forme de XBP-1 mature, j'ai constaté une augmentation de l'ARNm de XBP-1s dans les cellules SH-SY5Y traitées avec des oligomères de peptides amyloïde- β 1-42 synthétiques (**Figure 2A**). Cette activation est également présente dans les cellules produisant naturellement des oligomères de peptide amyloïde- β 1-42 (**Figure 2D**). J'ai également confirmé la spécificité de cet épissage en recourant à des cellules invalidées génétiquement pour XBP-1 (Fibroblastes embryonnaires de souris XBP $-/-$), ou l'abolition totale de l'induction de XBP-1s en présence d'oligomères est observée (**Figures 2B et 2C**).

IV.3 - L'expression de XBP-1s réprime l'expression protéique et l'activité de BACE1

Les oligomères de peptide amyloïde- β activant de façon simultanée l'expression de BACE1 et l'épissage de XBP-1s, j'ai recherché un lien possible entre les deux événements. Pour cela, j'ai réalisé la sur-expression de la forme mature épissée XBP-1s encodée dans un vecteur plasmidique dans des cellules HEK293. L'expérience montre une diminution de la quantité de BACE1 protéique par immuno-empreinte (**Figures 3A et 3B**), couplée à une diminution de son activité enzymatique (**Figures 3C et 3D**). Ces résultats apparaissent à priori en contradiction avec l'augmentation de BACE1 constatée précédemment. Cependant, l'effet global d'un traitement utilisant les oligomères de peptide amyloïde- β 1-42 diffère nettement de la sur-expression spécifique de XBP-1s. Ces résultats ont également été confirmés dans le type cellulaire SH-SY5Y (données non incluses dans la publication).

IV.4 - L'invalidation génétique de XBP-1 augmente l'expression protéique et l'activité de BACE1

En utilisant les cellules XBP -/- présentées dans la section **IV.b**, j'ai analysé l'expression de BACE1 en absence de XBP-1s. L'immuno-marquage de BACE1 révèle une nette augmentation de la protéine (**Figures 3E et 3F**), corrélée à une augmentation de son activité enzymatique (**Figures 3G et 3H**). De plus, la complémentation des cellules XBP -/- par transfection transitoire de vecteurs encodant XBP-1s diminue la quantité de BACE1 protéique, en accord avec les résultats exposés dans la figure 3 (**Figures 3I et 3J**).

IV.5 - Le contrôle négatif de XBP-1s sur BACE1 n'est pas transcriptionnel

XBP-1s étant un facteur de transcription majeur de l'UPR, il est apparu logique de commencer à vérifier la nature de cette régulation sous un angle transcriptionnel. L'analyse bio-informatique du promoteur de BACE1 a révélé la présence de plusieurs sites pouvant potentiellement lier XBP-1s, l'un d'eux étant notablement à 1kb en amont du point de départ de la transcription. Un autre site plus atypique a été retrouvé dans la partie 5'UTR de l'ARNm de BACE1. J'ai alors réalisé l'intégration du promoteur complet dans un vecteur plasmidique, couplé à une séquence codant l'expression de la luciférase. La double transfection de ce vecteur avec le vecteur encodant XBP-1s a produit des résultats négatifs, aucune modulation de l'activité luciférase n'a été constatée. Ceci dans différents systèmes, HEK293 (**Figure 4C**), Fibroblastes XBP -/- (**Figure 4F**), SH-SY5Y (non montré). En parallèle l'analyse des ARNm de BACE1 reflète l'absence de régulation du promoteur, ne montrant aucune modulation de leur expression après transfection du vecteur encodant XBP-1s dans tous les types cellulaires étudiés, HEK293 (**Figures 4A et 4B**), Fibroblastes XBP -/- (**Figures 4D et 4E**) et SH-SY5Y (non montré). Ces expériences mettant en évidence l'absence de régulation transcriptionnelle de BACE1 par XBP-1s, la question d'un intermédiaire post-traductionnel s'est posée.

IV.6 - XBP-1s peut contrôler seul la transcription de l'ubiquitine ligase HRD1

BACE1 étant traduite dans le RE et transportée jusqu'à la membrane cellulaire, sa régulation post-traductionnelle doit se dérouler dans ce compartiment. HRD1 étant une ubiquitine ligase du complexe ERAD-Luminal ou Membranaire, son implication dans la diminution protéique de BACE1 apparaît plausible. HRD1 étant normalement transcrite par l'hétérodimère XBP-1s-ATF6α(p50), j'ai vérifié si XBP-1s seul était suffisant pour induire son expression. En premier contrôle j'ai utilisé les fibroblastes XBP -/- et induit la réponse UPR dans ces cellules en utilisant un agent de stress réticulaire très décrit, la thapsigargine (TPS). L'ARNm de HRD1 est augmenté en présence de TPS (**Figure 5B**), et cette activation est totalement bloquée dans les cellules XBP -/- (**Figures 5B**), de même que l'épissage de XBP-1s (**Figure 5A**).

Pour conserver les mêmes conditions utilisées dans les expériences précédentes, j'ai réalisé la transfection du plasmide encodant XBP-1s dans les cellules HEK293. Les résultats révèlent une augmentation des ARNm de HRD1 en présence de XBP-1s (**Figures 5C et 5D**), ainsi que l'augmentation de la quantité protéique de HRD1 (**Figures 5E et 5F**). Cette expérience a été confirmée par PCR quantitative dans les cellules XBP -/- complémentées avec XBP-1s (**Figures 5G et 5H**).

IV.7 - Les oligomères de peptide amyloïde-β 1-42 induisent l'expression de HRD1, sous contrôle de XBP-1s

Après avoir établi le lien entre XBP-1s et HRD1, ainsi que le lien entre les oligomères de peptide amyloïde-β et XBP-1s, j'ai recherché la possibilité d'un axe linéaire XBP-1s-HRD1 sous contrôle du stress UPR induit par les oligomères. En réalisant une première analyse dans les cellules produisant naturellement des oligomères de peptides amyloïde-β, j'ai constaté une augmentation de l'expression des ARNm de HRD1 (**Figure 6C**) couplée à une augmentation de sa protéine par immuno-empreinte (**Figures 6A et 6B**).

J'ai également traité des cellules SH-SY5Y avec des préparations d'oligomères synthétiques de peptide amyloïde- β 1-42 et obtenu une induction de l'ARNm de HRD1 (**Figures 6F**), combinée à une accumulation de sa protéine (**Figures 6D et 6E**). Cette activation de l'expression de HRD1 par les oligomères est bloquée dans les cellules possédant le génotype XBP $-/-$, montrant la nécessité absolue de XBP-1s lors de l'activation de cet axe (**Figures 6G et 6H**).

IV.8 - HRD1 module BACE1 de façon post-traductionnelle en affectant sa demi-vie

L'étape suivante de ce travail consistait à valider HRD1 comme régulateur négatif de l'expression de la protéine BACE1. J'ai donc commencé par réaliser la transfection d'un plasmide encodant la protéine HRD1 dans des cellules HEK, et j'ai analysé l'effet de cette sur-expression sur BACE1. Le marquage par immuno-empreinte de BACE1 révèle une diminution de la protéine HRD1 dans ces conditions (**Figures 7A et 7B**), corrélée par une diminution de son activité enzymatique (**Figures 7C et 7D**).

En accord avec les expériences précédentes (**section IV.e**), la surexpression de HRD1 ne module ni le promoteur de BACE1 (**Figure 7E**), ni l'expression de ses ARNm (**Figure 7F et 7G**). Pour finir, j'ai analysé la demi-vie de la protéine BACE1 en présence de HRD1. Pour cela, HRD1 a été sur-exprimée dans des cellules HEK puis la néosynthèse protéique a été bloquée après un traitement au cycloheximide, provoquant une diminution plus rapide de la quantité de BACE1 dans les cellules transfectées par rapport aux contrôles (**Figures 7H et 7I**).

IV.9 - L'invalidation de XBP-1 augmente l'expression de BACE1 en présence d'oligomères de peptide amyloïde- β 1-42

L'effet de l'invalidation de XBP-1 sur BACE1 a été ensuite analysé en présence d'oligomères de peptide amyloïde- β 1-42. Les cellules XBP-1 sauvage possèdent un phénotype similaire à celui observé au cours des expériences de la section **IV.a**, avec une induction de l'ARNm de BACE1 par les oligomères (**Figure 8D**) qui n'est pas reflétée par l'expression de sa protéine (**Figures 8A, 7B**). En revanche, lors de la délétion de XBP-1, une nette accumulation de la protéine BACE1 est observée après traitement des cellules avec les oligomères (**Figures 8A et 8C**). L'absence de XBP-1s ainsi que de HRD1 impacte donc la quantité protéique de BACE1 en présence de stress provoqué par les oligomères.

IV.10 - Conclusion

Mes travaux montrent que XBP-1s est capable de diminuer l'expression de BACE1 selon un mode non transcriptionnel (Voir **Figure 15** à la suite). Ce résultat s'accorde avec une autre étude qui pointait l'absence de régulation du promoteur de BACE1 par XBP-1s (**Reinhardt S. et al., 2014**). L'implication du système ERAD et de HRD1 est également intéressante puisque la surexpression de HRD1 a été associée à une diminution de la production du peptide amyloïde- β (**Jung E. S. et al., 2015**), ce qui pourrait être provoqué par cette régulation de BACE1. Finalement, ces résultats suggèrent un contrôle physiologique de l'expression de BACE1 par l'ERAD, qui limite son accumulation dans des conditions de stress provoqué par les oligomères de peptide amyloïde 1-42, agissant comme une voie compensatoire pour empêcher la mise en place d'une boucle où le peptide amyloïde- β alimenterait sa propre production. Lorsque cette voie est altérée en bloquant l'activation de HRD1 par XBP-1s, BACE1 est augmentée, et son expression exacerbée en présence d'oligomères de peptide amyloïde- β 1-42. HRD1 étant diminuée dans les cerveaux des patients touchés par la maladie d'Alzheimer et BACE1 accumulée, une corrélation entre les deux événements apparaît plausible (**Saito et al., 2010 ; Yang et al., 2003**).

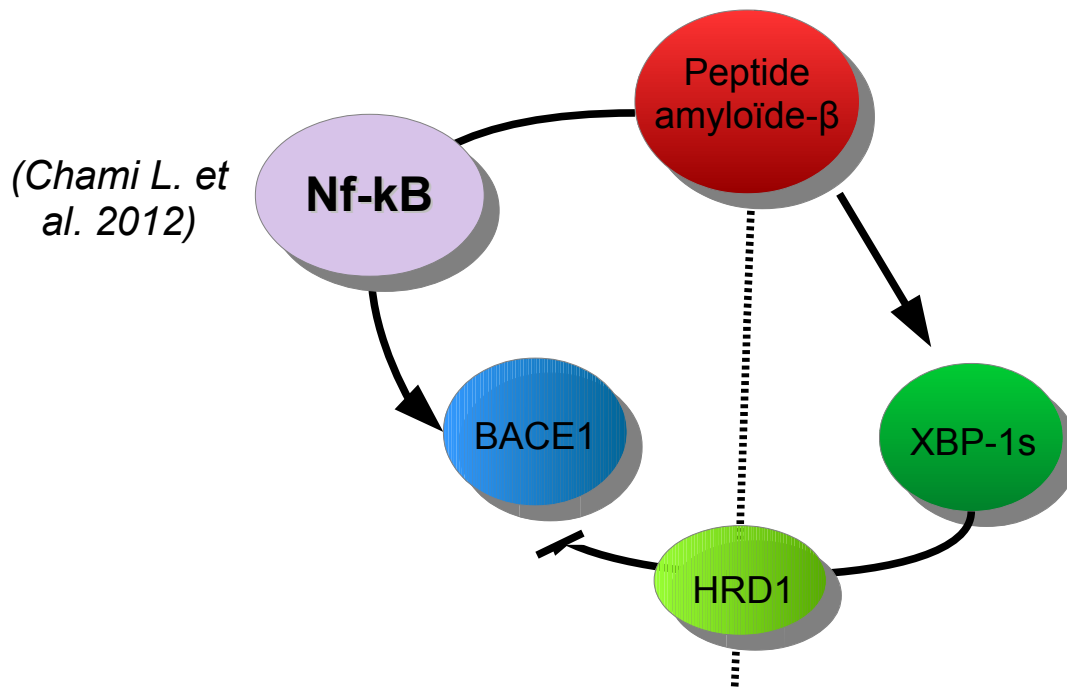


Figure 15 : Modèle possible de la régulation de BACE1 par le peptide amyloïde- β . L'exposition de cellules à des oligomères de peptide amyloïde- β active transcriptionnellement l'expression de BACE1 par des voies indépendantes de XBP-1s. En exemple : Le facteur de transcription Nf- κ B peut-être un régulateur direct de BACE1 en activant son promoteur en présence de peptide amyloïde- β (Chami L. Et al., 2012). Cependant, l'induction de l'axe XBP-1s-HRD1 par le stress réticulaire généré par les oligomères de peptide amyloïde- β régule négativement l'expression de la protéine BACE1 au niveau post-traductionnel, limitant son accumulation dans la cellule.

Publication numéro 1

A β 42 oligomers modulate BACE1 through an XBP-1s-dependent pathway involving HRD1.

Yannis Gerakis, Julie Dunys, Charlotte Bauer and Frédéric Checler

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

A β 42 oligomers modulate β -secretase through an XBP-1s-dependent pathway involving HRD1

Yannis Gerakis, Julie Dunys, Charlotte Bauer & Frédéric Checler

Received: 10 August 2016

Accepted: 28 October 2016

Published: 17 November 2016

The aspartyl protease β -site APP cleaving enzyme, BACE1, is the rate-limiting enzyme involved in the production of amyloid- β peptide, which accumulates in both sporadic and familial cases of Alzheimer's disease and is at the center of gravity of the amyloid cascade hypothesis. In this context, unravelling the molecular mechanisms controlling BACE1 expression and activity in both physiological and pathological conditions remains of major importance. We previously demonstrated that A β controlled BACE1 transcription in an NF κ B-dependent manner. Here, we delineate an additional cellular pathway by which natural and synthetic A β 42 oligomers enhance active X-box binding protein XBP-1s. XBP-1s lowers BACE1 expression and activity indirectly, via the up-regulation of the ubiquitin-ligase HRD1 that acts as an endogenous down-regulator of BACE1. Thus, we delineate a novel pathway by which cells could compensate for A β 42 oligomers production and thus, associated toxicity, by triggering a compensatory mechanism aimed at lowering BACE-1-mediated A β production by a molecular cascade involving XBP-1s and HRD1. It thus identifies HRD1 as a potential target for a novel A β -centered therapeutic strategy.

Alzheimer's disease (AD) is a neurological disorder, which is one of the most common dementia among elderly people. One of the main hypotheses regarding AD etiology, called the amyloid cascade hypothesis, considers the A β peptide at a central position of a sequence of cellular events leading to clinical picture, dementia and ultimately, death.

The amyloidogenic pathway yielding A β ^{1–3} involves a rate-limiting cleavage of the β -amyloid precursor protein (β APP) by the β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 (BACE1)⁴, thereby producing a secreted fragment (sAPP β) and an intramembranous C-terminal fragment (C99), which is then processed by γ -secretase to release A β peptide and an intracellular domain, AICD⁵. The definitive nature of the A β species (intracellular, truncated, aggregated) that genuinely triggers aversive effects such as oxidative stress⁶, elevated calcium toxicity⁷, mitochondria and cells energy production defects⁸, excitotoxicity of neuronal axons⁹, all of these leading to cell death and apoptosis¹⁰, remains a matter of discussion.

BACE1 is considered as a key therapeutic target not only because its inhibition precludes A β production but also because BACE-1-mediated β APP cleavage only, generates C99 that had been shown to trigger cellular perturbations and toxicity even in absence of A β in mice models of AD^{11–13}. BACE1 is highly expressed in neurons and, unlike is the case for γ -secretase, its expression increases during ageing as well as in the brain of AD patients^{14,15}. This aroused interest for delineating the mechanistic regulation of this enzyme and more particularly, for transcription factors regulating BACE1, some of which also increased with age. These transcription factors, induced by stress and environmental conditions, such as c-Jun¹⁶, nuclear factor-kappa B (NF- κ B)¹⁷, nuclear factor of activated T-cells 1 (Nfat-1)¹⁸, specificity protein 1 (Sp1)¹⁹, Yin Yang 1 (YY1)²⁰, signal transducer activator of transcription 3 (STAT3)²¹ and p25/cdk5²² have been shown to directly bind BACE1 promoter, to up-regulate BACE1 gene transactivation and, thereby, increase its expression and catalytic activity.

Protein misfolding, accumulation in the endoplasmic reticulum (ER), widely known as ER stress and abnormal protein aggregation have been well documented in AD and are intimately linked to BACE1²³. ER stress

Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, France, Laboratory of excellence DistALZ, 660 route des Lucioles, 06560, Sophia-Antipolis, Valbonne, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.C. (email: checler@ipmc.cnrs.fr)

activates the unfolded protein response (UPR), an adaptive sensor-regulator network aimed at restoring the protein folding homeostasis or, in case of irreversible stress damage, responsible for apoptosis activation^{24,25}. Three main sensors control UPR signaling: Activating Transcription Factor 6 (ATF6), Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase 1 (PERK1) and the endoribonuclease Inositol Requiring Enzyme 1 (IRE1). Upon ER stress signal, IRE1 splices the mRNA of x-box binding protein-1 (XBP-1), thereby yielding a more stable form that is then translated into an active transcription factor (XBP-1s)²⁶. Besides its well established function in UPR signaling, XBP-1s transcription factor has been implicated in additional physiological functions including glucose and lipid metabolism control but could also be modulated in neurodegenerative diseases including AD^{27,28}. Interestingly, XBP-1s was recently shown to regulate memory formation²⁹.

Although UPR and XBP-1s activation are generally considered as early neuroprotective responses aimed at limiting A β -related neurodegeneration^{30,31}, the mechanisms by which XBP-1s triggers cellular protective phenotypes have not been yet fully elucidated.

Here, we describe a novel cellular cascade by which synthetic and natural A β 42 oligomers modulate BACE1 expression and activity through a pathway involving new players, HRD1 ubiquitin ligase and XBP-1. Thus, our study unravels a potential compensatory mechanism by which cells could tune down A β -oligomers-associated toxicity.

Results

Synthetic and natural A β 42 oligomers increase BACE1 mRNA expression. We previously established that exogenous application of A β 42 monomers or transient transfection of cDNA encoding A β 42 enhanced BACE1 mRNA levels via NF κ B³². This data was conformed by our demonstration that cells overexpressing Swedish-mutated β APP and producing supraphysiological levels of A β displayed enhanced NF κ B-dependent BACE1 transcription and activity¹⁷. Although these studies consistently indicate an indirect control of BACE1 by its own APP-derived product, it did not definitely demonstrate the capability of A β 42 oligomers (A β o), currently recognized as the most toxic A β species^{33,34} to mimic this effect. Furthermore, it did not examine whether alternative NF κ B-independent pathways could govern A β -linked control of BACE1.

We examined first the influence of synthetic oligomeric A β o (Fig. 1a) and we show that they increase BACE1 mRNA levels in SH-SY5Y cells (Fig. 1b) while a trend of enhanced BACE1 protein expression was observed that did not reach statistical significance (Fig. 1c,d). It was unclear whether this apparent dichotomy between A β o-associated influence on BACE1 mRNA and protein expressions could be accounted for by the experimental procedure where acute exposure to oligomers or by kinetic delay between transcription process and translation. Thus, we envisioned determining whether naturally occurring A β o chronically produced by chinese ovary hamster cells (CHO) stably engineered to express either wild type β APP or β APP harboring the London mutation (V717I; APP_{LDN})³⁵ could modulate BACE1 expression and activity. Figure 1 shows that CHO APP_{LDN} cells indeed yield high levels of A β o (Fig. 1e) concomitant to increased BACE1 expression (Fig. 1f,g) and enzymatic activity (Fig. 1h,i). Overall, this set of data indicates that both synthetic and naturally occurring A β o modulate BACE1 mRNA and protein expression and activity although we cannot totally preclude the possibility of a marginal contribution of A β monomers.

Synthetic and naturally occurring A β oligomers up-regulate mRNA levels of spliced X-Box binding protein 1. The intimate link between cellular stress, A β and BACE1^{23,36} led us to investigate whether A β o effects on BACE1 expression could be governed by cellular sensors involved during the unfolded protein response in response to A β aggregation. Since A β o affect BACE1 transcription, we envisioned XBP-1s, a transcription factor activated upon stress-associated Ire1 α -mediated maturation, as a putative target. Interestingly, XBP-1s mRNA levels were increased upon synthetic A β o treatment of SH-SY5Y cells (Fig. 2a). We ruled out the possibility of a cell-dependent artifact by monitoring A β o-induced modulation of XBP-1s in murine fibroblasts. Thus synthetic A β o also triggered enhanced XBP-1s mRNA levels in wild-type (Fig. 2b) but not in XBP-1s null fibroblasts (Fig. 2c). Of importance, we show that naturally occurring A β o also increase XBP-1s mRNA levels (Fig. 2d) even if we did not examine the precise nature of oligomers species involved in such effect. Overall, this data demonstrates the ability of both synthetic and naturally occurring monomers/A β o mix to up-regulate XBP-1s mRNA levels.

XBP-1s regulates BACE1 expression and activity at a post-transcriptional level. We reasoned that since A β o increase both BACE1 and XBP-1s, the latter could behave as an intermediate cellular effector mediating A β o-associated increase in BACE1 transcription. Thus, we investigated the effect of a modulation of XBP-1s on BACE1 expression and protease activity. Surprisingly, we found that overexpression of XBP-1s reduces BACE1 expression (Fig. 3a,b) and enzymatic activity (Fig. 3c,d) in HEK293 cells. Conversely, XBP-1s depletion increases BACE1 expression (Fig. 3e,f) and activity (Fig. 3g,h), a phenotype that can be rescued by XBP-1s overexpression in XBP-1s knockout cells (Fig. 3i,j).

We then examined whether XBP-1s-linked modulation of BACE1 expression and activity could be accounted for BACE1 promoter transactivation by XBP-1s. As expected, XBP-1s overexpression yields quantifiable amounts of XBP-1s mRNA (Fig. 4a) while it neither altered BACE1 mRNA levels (Fig. 4b) nor BACE1 promoter transactivation (Fig. 4c). To rule out any cell specific artifacts, these results were confirmed in fibroblasts genetically invalidated for XBP-1. As was observed in HEK293 cells, restoration of XBP-1s expression in null cells (Fig. 4d) did not modify BACE1 mRNA levels (Fig. 4e) or promoter transactivation (Fig. 4f). This post-transcriptional XBP-1s-mediated regulation of BACE1 was also observed in cells of neuronal origin (SH-SY5Y) (Supplementary Fig. 1a–c). Altogether, this set of data indicates that XBP-1s down-regulates BACE1 at a post-transcriptional level in both human neuroblastoma cells and mouse fibroblasts.

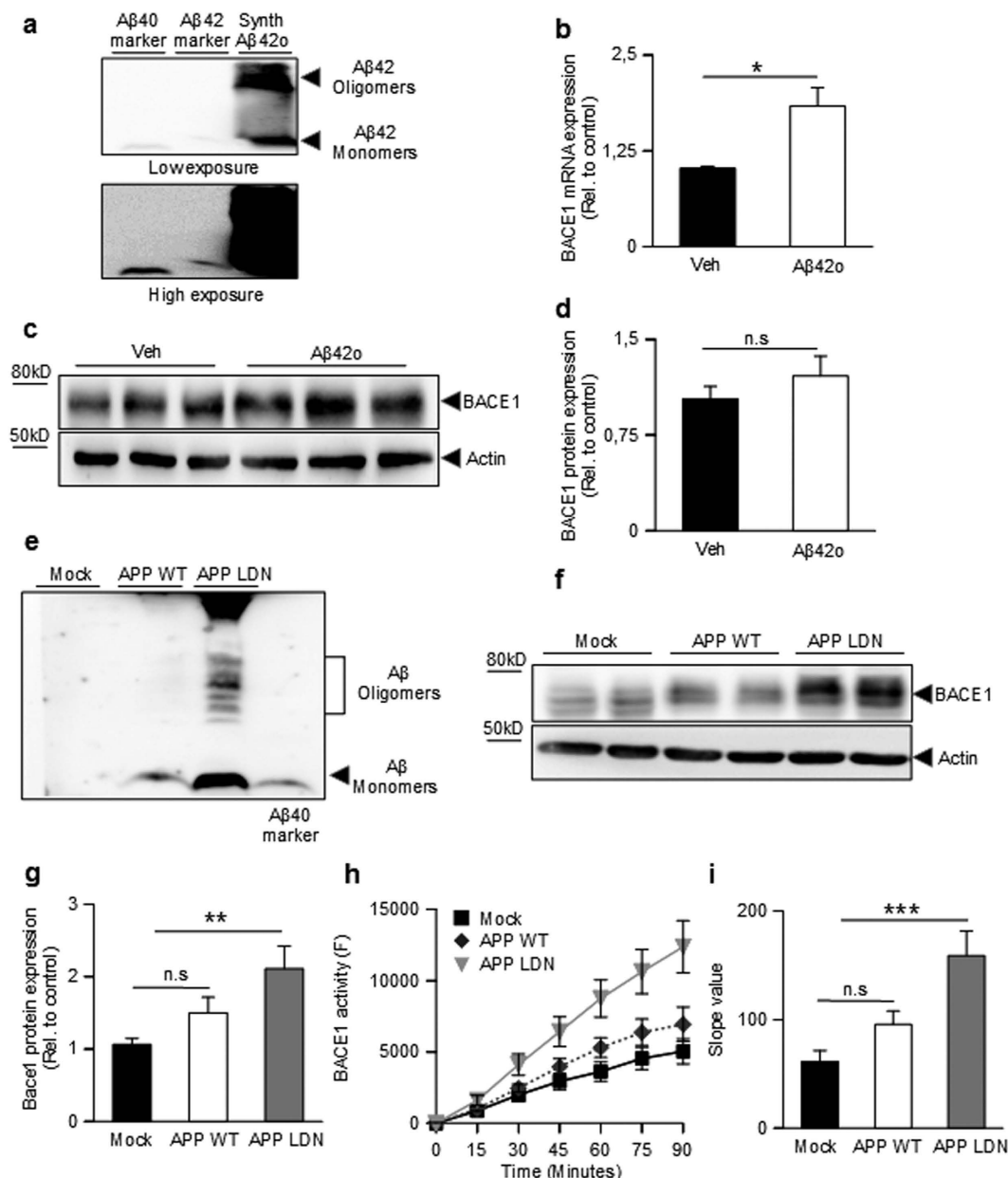


Figure 1. Influence of synthetic and natural Aβ42 oligomers on BACE1. (a) Western blot analysis of synthetic Aβ42 oligomers (Aβ40) obtained as described in the Methods. (b) Quantitative PCR analysis of BACE1 mRNA levels in SH-SY5Y neuroblastoma cells treated overnight with synthetic Aβ42o. BACE1 mRNAs are normalized using the expression of human Rpl69 housekeeping gene. (c,d) Western blot analysis (c) and densitometric quantification (d) of BACE1 expression in Aβ42o-treated SH-SY5Y cells. Graphs show the mean of three independent experiments (6 and 8 biological replicates per group in (b) and (d), respectively). A Student one-tailed T-test is applied for statistics (*p-value = 0,02 and n.s = non significant, in (b) and (d), respectively). (e) Western blot analysis of media recovered from CHO cells stably overexpressing either wild type βAPP (APP_{WT}) or βAPP bearing the London mutation (APP_{LDN}) compared to mock-transfected CHO cells. (f,g) Western blot analysis (f) and densitometric analysis of BACE1 (g) protein expression in the indicated cell lines. The graph shows the mean of 5 independent experiments (10 biological replicates per group). For statistics, a one-way ANOVA followed by a post hoc Bonferroni-Holm test is applied (**p-value = 0,0053 alpha 0,01; n.s non significant). (h) Specific BACE1 activity measured in the indicated cell line. BACE1 activity corresponds to the inhibitor-sensitive fluorimetry and is expressed relatively to control and normalized by protein quantification using Bradford method. The graph represents the mean BACE1 activity of 4 independent experiments, with 8 biological replicates plotted per group. (i) Represents the slope value of the curves in (h). Statistic analysis is as in B (**p-value = 0,001 alpha 0,01; n.s non significant).

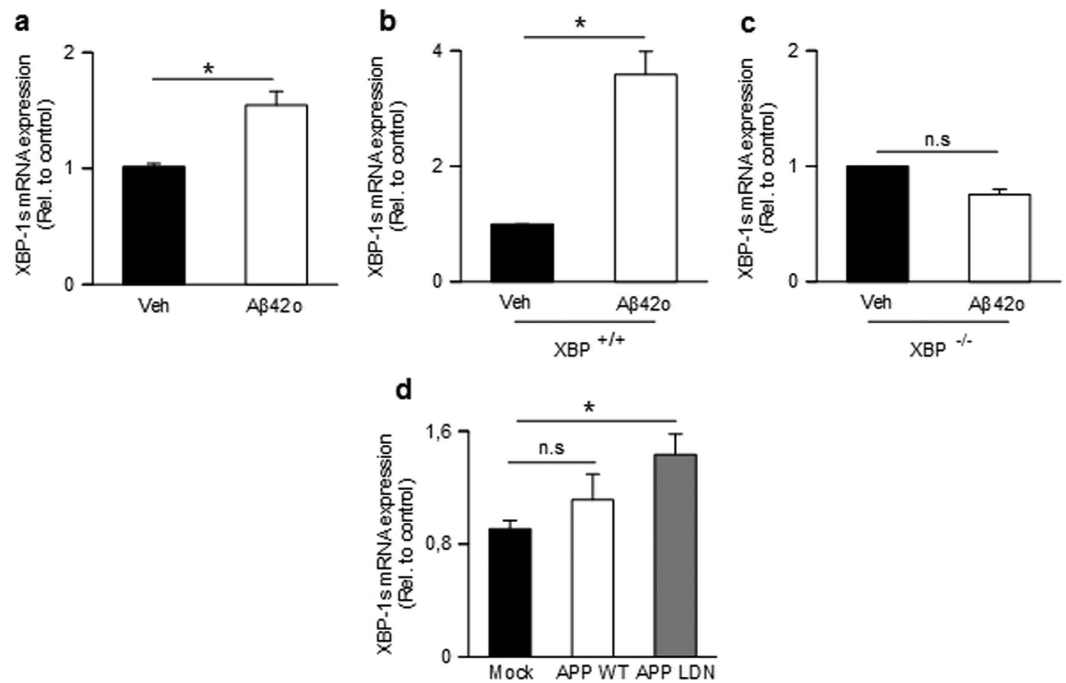


Figure 2. Influence of synthetic and natural Aβ42 oligomers on XBP-1s mRNA levels. (a) Quantitative PCR analysis of XBP-1s mRNA in SH-SY5Y (a), XBP^{+/+} (b) and XBP^{-/-} (c) cells treated overnight with synthetic Aβo. XBP-1s mRNAs are normalized using the expression of human Rpl69 housekeeping gene. The graphs show the mean of three independent experiments (6 and 3 biological replicates per group in (a,b and c), respectively). Student one-tailed T-test is applied for statistics (*p-value = 0,02 (a) and 0,03 (b,c); n.s non-significant). (d) Quantitative PCR analysis of XBP-1s mRNA in indicated CHO cell lines. XBP-1s mRNAs are normalized as above and graph shows the mean of 3 independent experiments (9 biological replicates per group). Statistical analysis is performed by a one-way ANOVA followed by a post hoc Bonferroni-Holm is applied (*p-value = 0,02 alpha 0,05; n.s, non-significant).

XBP-1s regulates HRD1 expression at a transcriptional level. Our data indicate that Aβo increases BACE1 and XBP-1s but that the latter lowers BACE1 by post-transcriptional mechanisms. We thus reasoned that such cascade of events could only be explained by an intermediate effector between XBP-1s and BACE1 that should fulfill three criteria: (1) to be up-regulated by XBP-1s; (2) to act as a repressor of BACE1 and; (3) to trigger its effect at a post-transcriptional level.

Yamamoto and Colleagues demonstrated that HRD1, an E3 ubiquitin ligase, was up-regulated under ER stress conditions through an XBP-1 dependent pathway³⁷. This led us to envision HRD1 as the cellular effector linking XBP-1s to BACE1. First, we show that XBP-1s mRNA levels are enhanced in the presence of thapsigargin, a well known ER-stress inducer (Fig. 5a), and that this activation, as expected, is indeed fully abolished by XBP-1 genetic invalidation. HRD1 mRNA levels were also enhanced by thapsigargin and this increase was abolished by XBP-1s depletion (Fig. 5b). To strengthen this observation, we examined the influence of XBP-1s expression on HRD1 mRNA levels in human cells. As expected, XBP-1s overexpression enhances both HRD1 mRNA (Fig. 5d) and protein (Fig. 5e,f) expressions. These results were conformed by the ability of XBP-1s to increase HRD1 (Fig. 5h) in MEF cells devoid of XBP-1s (Fig. 5g). The effect of XBP-1s on HRD1 transcription was also confirmed in SH-SY5Y cells (Supplementary Fig. 1d). Overall, our results show that XBP-1s up-regulates HRD1 transcription in our cellular models.

Aβ42 oligomers increase HRD1 expression through XBP1-dependent mechanisms. Since Aβo increase XBP-1s that up-regulates HRD1, we assumed that a linear cascade should be reflected by an up-regulation of HRD1 by Aβo. We examined whether naturally secreted and synthetics Aβo indeed modulate HRD1 expression. Figure 6 shows that HRD1 protein (Fig. 6a,b) and mRNA (Fig. 6c) levels were enhanced in CHO APP_{LDN} cells. This data was corroborated by the fact that synthetic Aβo also enhanced HRD1 protein (Fig. 6d,e) and mRNA levels (Fig. 6f). Of most interest, Aβo-associated increased amount of HRD1 mRNA expression in wild-type fibroblasts (Fig. 6g), was fully abolished by XBP1 gene invalidation (Fig. 6h). Thus, this data demonstrates a direct link between Aβo-mediated increases in XBP-1s and HRD1.

HRD1 reduces BACE1 expression. To validate the molecular cascade linking Aβo-mediated increase of XBP-1s and HRD1 to XBP-1s-associated decrease of BACE1, one should envision HRD1 as an intermediate down-regulator of BACE1. Figure 7 shows that it was indeed the case. Thus, HRD1 overexpression decreased BACE1 protein expression (Fig. 7a,b) and activity (Fig. 7c,d) by about 30%. However, HRD1 expression (see increased HRD1 mRNA expression in Fig. 7e) was unable to modulate BACE1 promoter transactivation (Fig. 7f)

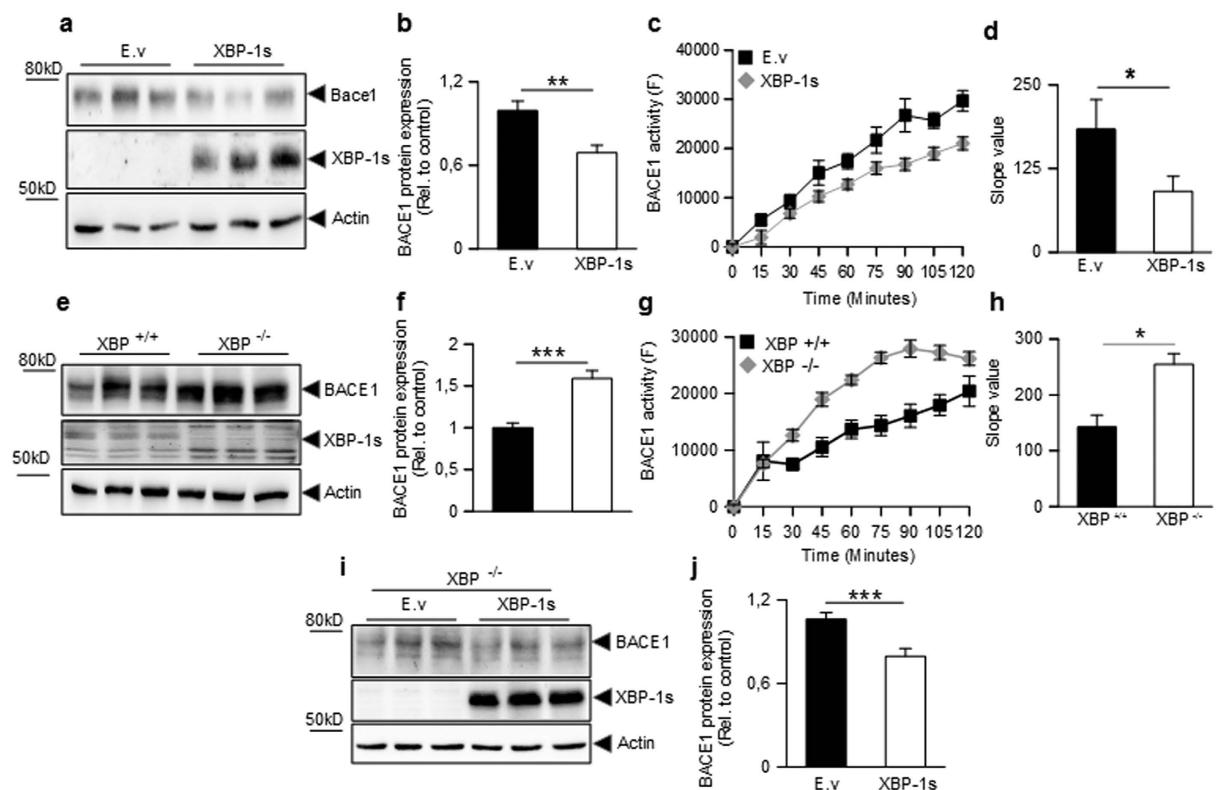


Figure 3. Modulation of BACE1 expression and catalytic activity by XBP-1s. (a–h) Western blot analysis (a,e), densitometric quantification (b,f) and specific activities (c,g) of BACE1 24 hours after transient transfection of HEK293 cells with XBP-1s encoding vector or empty vector (E.v) (a–c) or in XBP^{+/+} or XBP^{-/-} mouse fibroblasts (e–g). BACE1 activity is expressed relatively to control and normalized by protein quantification using Bradford method. Graphs represents the mean of 6 (b), 3 (c,g), and 5 (f) independent experiments and correspond to 24 (b), 9 (c) and 15 (f,g) biological replicates per group. In (d and h), bars represent the slope values of the curves presented in (c and g), respectively. All statistics are carried out with student one-tailed T-test: (**p-value = 0,0076 (B); *p-value = 0,04 (D); ***p-value = 0,0006 (f); *p-value = 0,04 (h). (i,j) Western blot analysis (i) and densitometric quantification (j) of BACE1 expression 24 hours after transient transfection of XBP^{-/-} cells with either control empty vector (E.v) or XBP-1s cDNA. Bars in (j) are the mean of 5 independent experiments (15 biological replicates per group). ***p-value = 0,0002.

and mRNA levels (Fig. 7g). Thus, HRD1-linked down-regulation of BACE1 likely occurs at a post-transcriptional level. This was supported by the reduced lifetime of BACE1 upon HRD1 expression (Fig. 7h,i) in experimental conditions where neosynthesis of endogenous BACE1 was blocked by cycloheximide (see Methods), in agreement with the HRD1 function as an ubiquitin ligase³⁸. Overall, the above-described data demonstrate a linear molecular cascade by which A β decrease BACE1 via an XBP-1s-mediated and HRD1-dependent mechanism.

Additional XBP-1s-independent control of BACE1 by A β oligomers. At first sight, the above data linking A β to a decrease of BACE1 appear contradictory to our initial observation that both synthetic and naturally occurring A β increased BACE expression and activity (see Fig. 1). This led us to question whether A β could modulate BACE1 exclusively via XBP-1s or if there exist alternative pathway by which A β could control BACE1. Thus, we examined the influence of synthetic A β on BACE1 in absence of XBP-1s. Figure 8a–e clearly shows that A β could still increase BACE1 expression in XBP-1s depleted cells (Fig. 8a–c). Interestingly, this appeared to occur at a transcriptional level since A β also increased BACE1 mRNA levels in XBP^{-/-} cells (Fig. 8e). This indicates that besides, XBP-1s-mediated HRD1-linked post-translational events aimed at reducing BACE1, A β could also increase BACE1 by alternative XBP-1s-independent transcriptional pathway. Thus, both A β -linked XBP-1s- dependent and -independent pathways could occur and one can envision that the former likely aims at preventing acute A β -induced toxicity and increased BACE-1-associated self-production, at least at early stages of the pathology.

Discussion

Numerous biochemical, anatomical and genetic data led to the claim that the so-called amyloid cascade hypothesis fulfils the major gap in the understanding of Alzheimer's disease (AD) etiology. For years, it has been proposed that senile plaques that accumulate in AD-affected brains correspond to the pathological lesions and thus, their main components, amyloid β -peptides (A β) thought to be at the center of gravity of the neurodegenerative process, drove much attention. This simplistic view of a complex disease has recently drastically evolved. Besides

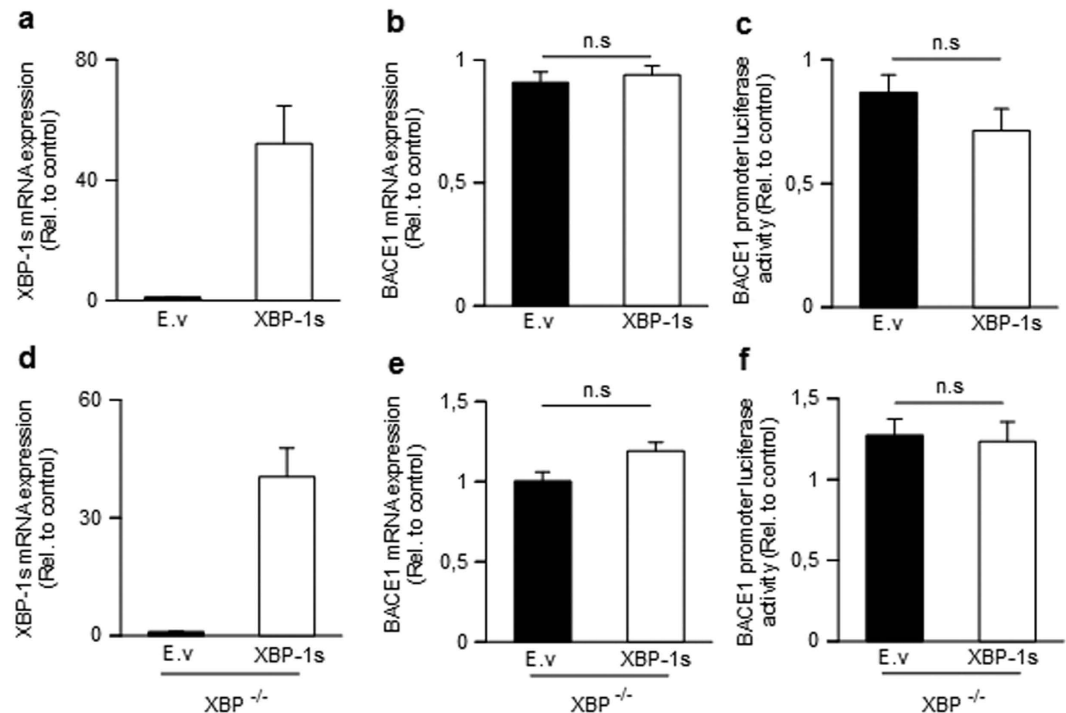


Figure 4. Influence of XBP-1s on BACE1 promoter transactivation and mRNA levels. (a,b) Quantitative PCR analysis of XBP-1s (a,d) and BACE1 (b,e) mRNA levels 24 hours after transient transfection of HEK293 (a,b) or XBP1^{-/-} (d,e) cells with either empty vector (E.v) or XBP-1s cDNA. BACE1 and XBP-1s mRNAs are normalized using the expression of Rpl69 housekeeping gene. (c,f) Luciferase activity measured in HEK293 (c) or XBP1^{-/-} (f) cells co-transfected with either empty vector (E.v) or XBP-1s cDNA, a BACE1 human promoter in frame with luciferase transcript (see methods) and a vector coding for beta-galactosidase. Luciferase activity was normalized with beta-galactosidase activity and protein concentration of samples and then expressed relatively to control. Graphs show the mean of four (a–c) or 3 (d–f) independent experiments corresponding to 24 (a,b), 12 (c) and 18 (d–f) biological replicates per group. Student one-tailed T-test is applied for statistics (n.s. not significant).

altered ratios in the canonical forms of A β 40 and A β 42 that are indeed affected in AD brain³⁹, recent advances on the structural nature (N-terminally truncated and/or C-terminally trimmed^{40,41}, biophysical state (monomeric, multimeric, aggregated, fibrillar^{34,42}, subcellular localization (intracellular, secreted^{43,44}) of A β species as well as other β APP catabolites (C99, AICD^{5,11–13,45}, have significantly modified our view of the genuine trigger of the pathology. It arose from these studies that soluble A β oligomers (A β o), appear prior to senile plaques and are now considered to be more toxic than monomeric or fibrillar A β . Supporting this view, amongst a series of cellular perturbations, A β o contribute to neuronal cell death, LTP inhibition⁴⁶ calcium homeostasis perturbation⁴⁷, oxidative or ER stresses⁴⁸.

Whatever the toxic A β -related trigger, it remains that understanding the upstream enzymatic steps ultimately yielding A β was of major importance. Although the nature of the secretases is consensual, the mechanisms by which their activity is finely tuned or regulated remained a matter of investigation.

The choice of the secretase as a therapeutic target is a hard one. Most attention was originally centered on γ -secretase because this enzyme triggers the ultimate cleavage yielding A β . However, γ -secretase-mediated breakdowns of numerous additional substrates involved in vital cellular functions⁴⁹ have been documented and it has been hard to design specific inhibitory compounds usable in clinic. This likely explains reiterated failures of γ -secretase-centric clinical trials and has severely tempered the optimism for considering γ -secretase blockade as a mean to interfere with the course of the disease. Although BACE1 was recently shown to contribute to several physiological functions^{50–54}, it appears that unlike is the case for γ -secretase^{55,56}, BACE1 gene ablation is rather well supported in animals, indicating a more narrow substrates specificity than that of γ -secretase or, alternatively, that functions of its additional substrates appear less vital for cells. These considerations suggest that the targeting of BACE1 appears apparently less challenging. Furthermore, this strategy presents several advantages. First BACE1 is the rate-limiting enzyme of A β biosynthetic pathway. Second, the blockade of BACE1 not only impairs A β production but also theoretically prevents all β APP-related catabolites, some of which appear very toxic, even in absence of A β ^{11–13}.

Relatively few data concern BACE1 regulation and most of them linked A β load or β APP mutations to altered BACE1 gene transcription^{16,17,32}. More often, BACE1 expression or activity have been linked to cellular conditions mostly related to hypoxia^{36,57}, oxidative⁵⁸ and ER stress^{23,59}.

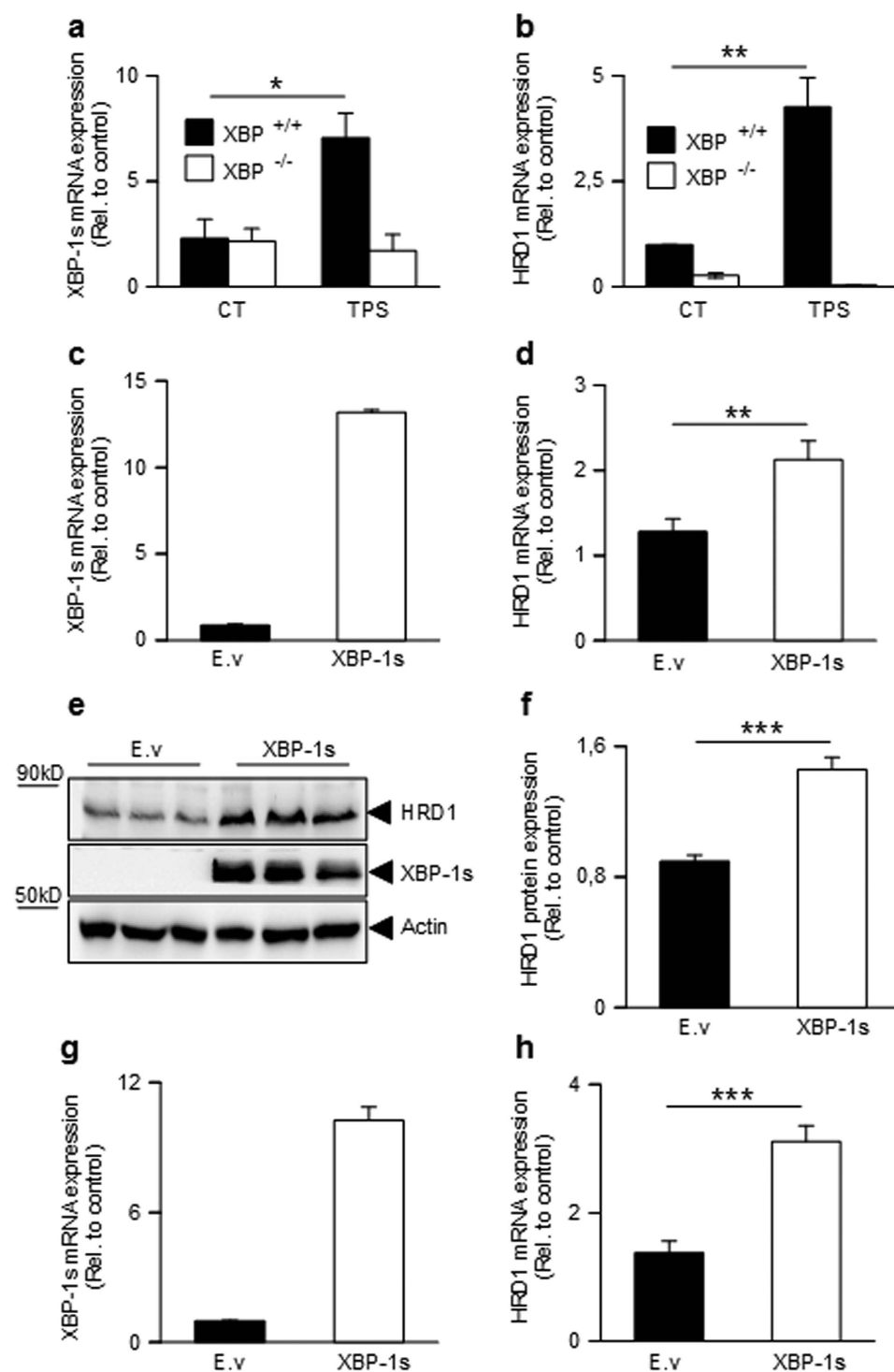


Figure 5. Modulation of HRD1 by thapsigargin and XBP-1s in human cells and XBP-depleted cells. (a,b) Quantitative PCR analysis of XBP-1s (a,c) and HRD1 (b,d) mRNA levels in XBP^{+/+} or XBP^{-/-} fibroblasts control (Ct) or treated 6 hours with thapsigargin (1 μ M, TPS, (a,b) or 24 hours after transient transfection of HEK293 cells with empty vector (E.v.) or XBP-1s (c,d). (e,f) Western blot analysis (e) and densitometric quantification (f) of HRD1 protein expression in HEK293 cells transiently transfected with XBP-1s as above. (g,h) Quantitative PCR analysis of XBP-1s (g) and HRD1 (h) mRNA levels 24 hours after transient transfection of XBP^{-/-} cells with either empty vector (E.v.) or XBP-1s. All HRD1 and XBP-1s mRNAs are normalized using the expression of mouse Rpl69 housekeeping gene. Graphs shows the mean of 3 independent experiments, 6 (a,b), 18 (c,d,g,h) and 9 (f) biological replicates per condition. Student one-tailed T-test are applied for statistics (*p-value = 0,02 (a); **p-value = 0,01 (b); **p-value = 0,004 (d); ***p-value = 0,00001 (f); ****p-value 0,00007 (h)).

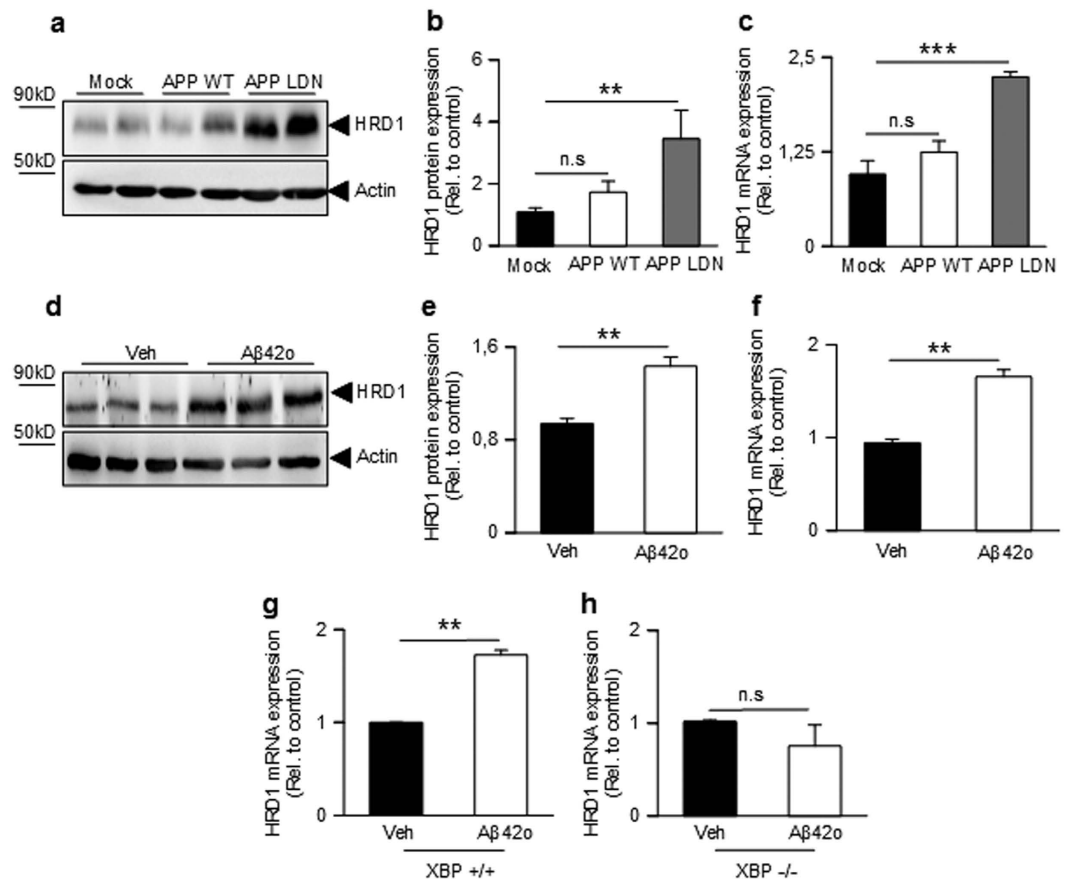


Figure 6. Effect of synthetic and natural Aβ42o on HRD1 protein and mRNA expressions and effect of Aβ42o on BACE1 in XBP^{-/-} fibroblasts. (a–f) Western blot (a,d), densitometric analysis (b,e) and mRNA levels (c,f) of HRD1 in indicated CHO cell lines (a–c) or in synthetic Aβ42o-treated SH-SY5Y (d–f). (g,h) Quantitative PCR analysis of HRD1 mRNA levels in Aβ42o-treated XBP^{+/+} (g) and XBP^{-/-} (h) cells. HRD1 mRNAs are normalized using the expression of Top1 housekeeping gene (CHO cell line) or Rpl69 (SH-SY5Y and fibroblasts). Graphs show the mean of 4 (b) or 3 (c,e–h) independent experiments corresponding to 10 (b), 6 (c,f), 8 (e) and 3 (g,h) biological replicates per group. In (b and c), a one-way ANOVA followed by a post hoc Bonferroni–Holm test is applied for statistics (**p-value = 0,01 alpha 0,05 (b) and ***p-value = 0,00000246 alpha 0,01 (c); n.s non significant). In (e–h), a student one-tailed T-test is applied for statistics (**p-value = 0,002 (e), **p-value = 0,01 (f); **p-value = 0,0047 (g); n.s: not significant).

XBP-1 is a transcription factor known to regulate genes involved in ER homeostasis that has also been involved in multiple signaling pathways and diseases (For review see ref. 28). Here we show that XBP-1s lowers BACE1 expression and activity in various cells of human and murine origins. Interestingly, XBP-1s-mediated repression of BACE1 occurs at a post-transcriptional level. This agrees well with a recent study showing that XBP1s did not modify BACE1 promoter transactivation in human cells⁶⁰. In search for a cellular intermediate, we reasoned that it should be either a BACE1 activator that would be transcriptionally repressed by XBP-1s or, alternatively, a BACE1 repressor, the transcription/activity of which would be enhanced by XBP-1s. The latter case stood. Thus we demonstrated that HRD1 mRNA levels were up-regulated by XBP-1s and that HRD1 down-regulated BACE1 protein but not mRNA expressions. This agreed with the well-documented function of HRD1 that acts as an ubiquitin ligase involved in protein ubiquitination and degradation during Endoplasmic Reticulum associated degradation (ERAD), a process known to be under control of XBP-1⁶¹. The above-described set of data was comforted by the fact that Aβ42o increased both XBP1s and HRD1 expressions. This agreed with several independent studies showing that XBP-1 mRNA splicing, and therefore activation, was potentiated by Aβ42o in transgenic flies³⁰ and primary cultured neurons⁶² see Suppl. Fig. 12) and demonstrating an Aβ42o-mediated post-transcriptional regulation of neuronal BACE1-like immunoreactivity⁶³. In addition, previous works indicated a negative correlation between HRD1 expression and Aβ generation⁶⁴ and demonstrated that HRD1 suppression leads to enhanced Aβ production^{65,66}.

We propose that Aβ42o-mediated increase in XBP-1s could be seen as a compensatory mechanism aimed at down-regulating BACE1 activity and thus, interfering with a potential vicious cycle by which Aβ42o feed their own production. This could occur to counteract Aβ42o-mediated increase in BACE1 activity by transcription factors such as c-Jun¹⁶, nuclear factor-kappa B (NF-κB)¹⁷, nuclear factor of activated T-cells 1 (Nfat-1)¹⁸, specificity protein 1 (Sp1)¹⁹, Yin Yang 1 (YY1)²⁰, and signal transducer activator of transcription (STAT3)²¹ as has been previously

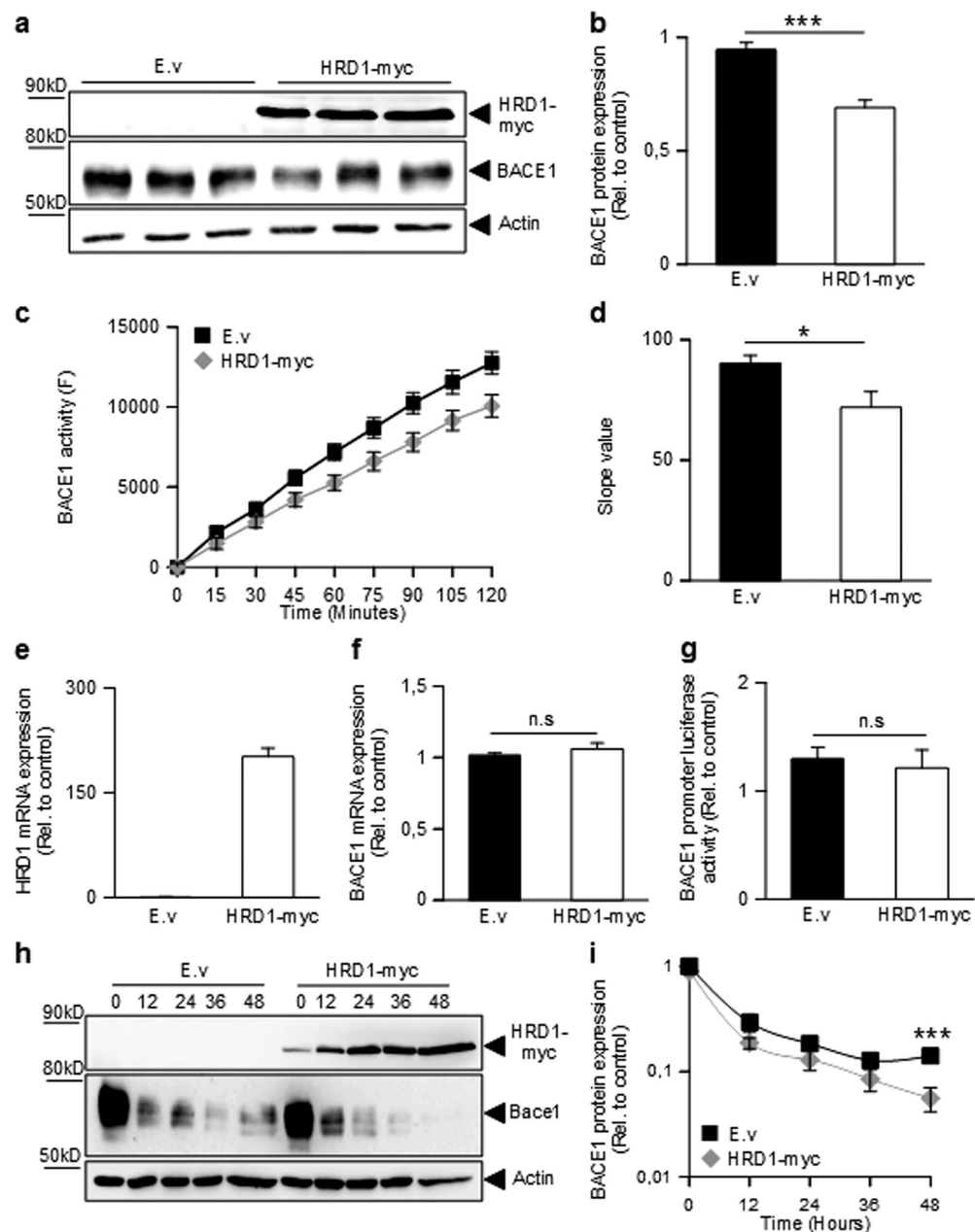


Figure 7. HRD1 controls BACE1 at a post-transcriptional level. Western blot analysis (a), densitometric quantification (b) and specific activities (c) of BACE1 24 hours after transient transfection of HEK293 cells with control (E.v) or HRD1-myc cDNA. BACE1 activity is expressed relatively to control and normalized by protein quantification using Bradford method. Graphs represents the mean of 6 (b) and 3 (c) and correspond to 18 (b) and 9 (c) biological replicates per group. (d) Represents the slope value of the curve presented in (c). Student one-tailed T-test is applied for statistics (**p-value = 7×10^{-8} (b) and *p-value = 0.03 (c)). (e,f) Quantitative PCR analysis of HRD1 and BACE1 mRNA 24 hours after transient transfection of HEK293 cells with control (E.v) or HRD1-myc cDNA. BACE1 and HRD1 mRNAs are normalized using the expression of human Rpl69 housekeeping gene. The graph shows the mean of 3 independent experiments (9 biological replicates per group). Student one-tailed T-test is applied for statistics (n.s non significant). (g) Luciferase activity measured in HEK293 cells co-transfected with control or HRD1 coding vector, a BACE1 human promoter in frame with luciferase and a vector coding for beta-galactosidase. Luciferase activity was normalized with beta-galactosidase activity and protein concentration of samples and then expressed relatively to control. The graph shows the mean of 3 independent experiments (18 replicates per group). Student one-tailed T-test is applied for statistics (n.s non significant). (h) Western blot analysis of HEK293 cells transiently transfected with control (E.v.) or HRD1-myc cDNA for 12 h before treatment with cycloheximide (1 μ M) up to 48 h. (i) Densitometric analysis of BACE1 expression normalized with actin and represented relatively to control (cells transfected with control vector at T0) through time. Note that ordinate axis follows a logarithmic scale. The graph shows the quantification of four independent experiments (4 replicates per condition). Student one-tailed T-test is applied for statistics (**p-value = 0.001).

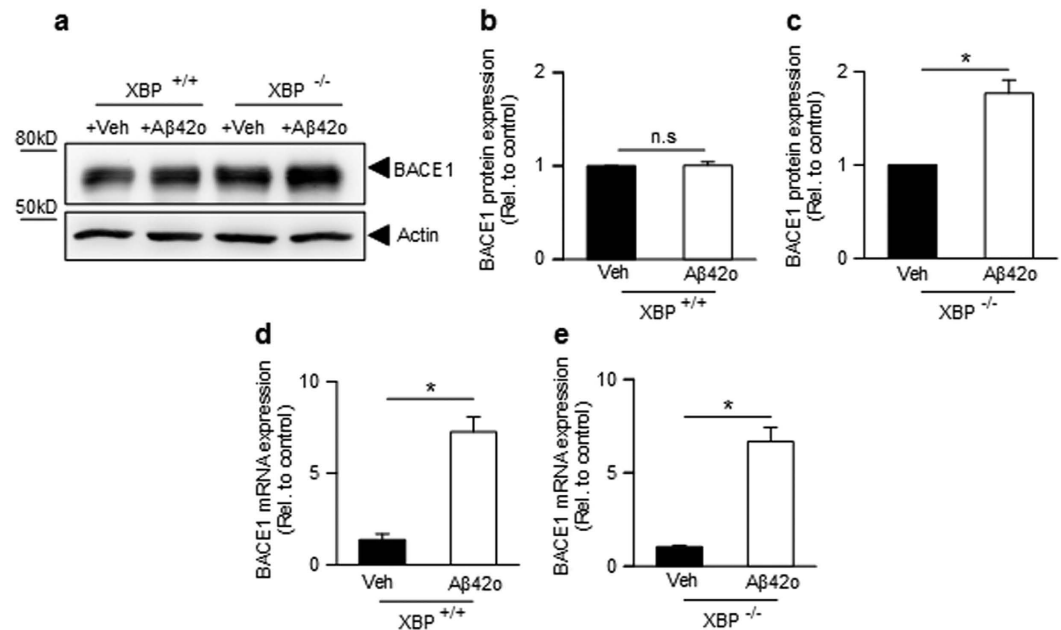


Figure 8. Influence of XBP1 depletion on Aβ42o-induced effect on BACE1 protein and mRNA expression. (a–c) Western blot analysis (a), densitometric quantification (b,c) and quantitative PCR mRNA analysis (d,e) of BACE1 after an overnight treatment of XBP^{+/+} (a,b,d) or XBP^{-/-} (a,c,e) fibroblasts. BACE1 mRNAs are normalized using the expression of human Rpl69 housekeeping gene. Bars show the mean of 3 independent experiments (3 biological replicates per group). Student one-tailed T-test is applied for statistics (*p-value = 0,03 (c); *p-value = 0,03 (d); *p-value = 0,02 (e)).

documented. Indeed, our study also clearly shows that Aβ₄₀ could enhance BACE1 protein and mRNA expressions in XBP1 knockout cells (see Fig. 8).

The XBP-1S-mediated compensatory mechanism would agree with the protective phenotype generally ascribed to XBP-1s. Thus, previous studies showed that XBP-1s protected against Aβ-associated toxicity³⁰ and could interfere with autophagy process⁶⁷. More importantly and related to Alzheimer's disease, XBP1 depletion revealed memory defects in wild-type mice²⁹ and XBP-1s expression restored synaptic plasticity and memory control in several AD mice models⁶². Finally, XBP-1S transcriptionally up-regulates ADAM10, the α-secretase constitutive activity involved in the protective non amyloidogenic βAPP processing pathway⁶⁰.

According to the time frame of AD development, we anticipate that compensatory mechanisms should occur early and transiently. This notion of temporal window is supported by studies on the expression of XBP1 in various AD mice models and AD-affected human brains. Thus, proteomic analysis revealed enhanced XBP1 protein expression at an early stage of disease progression in 5xFAD mice⁶⁸. Further, Reinhard and colleagues showed that XBP-1s mRNA levels peaked at 8 months of age in APP/PS1⁶⁰. Finally, we observed a transient increase of XBP-1s mRNA in the hippocampus of 3 month-old CRND8 and 3xTg-AD mice⁶². Interestingly, XBP-1s expression was lowered in the frontal and temporal cortices in autopsied AD affected brains, i.e. at late stage of the disease, when BACE1 expression has been clearly shown to be enhanced¹⁴. This is consistent with the claim of a protective increase in XBP1 aimed at reducing BACE1 expression at early stage of the pathology, a transient compensatory process ineffective at later stage of the pathology.

Gene therapy has been proposed as a track to target brain pathologies linked to ER stress⁶⁹. In this context, it is noteworthy that modulating XBP1 has proved efficient to protect against Huntington disease in mice model of this pathology. Whether XBP-1s targeting would be efficient in the case of Alzheimer's disease remains a matter of speculation and still awaits faithful biomarkers that could tag the very early stages of the disease. However, it remains that our study shows that compensatory mechanisms should not be underscored and underlines the need for further understanding of secretases regulation.

Methods

Plasmids. The spliced form of mouse XBP-1 cDNA (XBP-1s) was cloned in pcDNA3 plasmid. The human HRD1-myc cDNA (transcript variant 2) was cloned in pCMV6 and obtained from OriGene Technologies. Luciferase construct of human BACE1 promoter cloned in pGL3-basic vector was kindly provided by Dr. Lahiri D.K.

Cell culture and transfections. Human embryonic kidney cells (HEK293), human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) and mouse embryonic fibroblasts (MEF) were cultured at 37°C humidified air with 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (4,5 g/L glucose) supplemented with fetal calf serum (10%). No antibiotics were added. Chinese ovary hamster cells (CHO) stably expressing wild type APP (APP_{WT}) and APPV717I mutation (APP_{LDN}), were obtained as described³⁵ and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (4,5 g/L

glucose) supplemented with fetal calf serum (10%), HT supplement (Gibco) and D-Proline. Transfections were performed with lipofectamine 2000 (Invitrogen) for mouse embryonic fibroblast (MEF) XBP^{+/+} and XBP^{-/-}. Cells (about 300,000) were plated 24 h before transfection on 6 well plates, then DMEM medium was replaced by Dulbecco's Optimum medium with a transfection mix (5 µl lipofectamine, 2.5 µg cDNA/well) for 6 hours. Other cell types were plated at about 500,000 cells per well and transfected with Jetprime (Polyplus-transfection) following manufacturer's instruction. Harvest and analysis of cells were carried out 24 h after transfection.

Protein extraction and western blotting. Cultured cells were collected in PBS-EDTA (5 mM) before centrifugation at 3,000 rpm for 5 min. Pellets were lysed in RIPA buffer with a complete proteases inhibitor, then centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. Total protein concentration was assessed in the supernatant by Bradford method. Each sample (50 µg) was resuspended in Laemli buffer (1x final) and boiled at 96 °C for 5 min before loading and resolving on 10% SDS-PAGE gel. Wet transfer was done using Hybond-C membrane (Amersham Bioscience) at 100 V for 1 h30, then membrane were blocked with 5% PBS-milk solution for 1 h15 and blotted overnight with following antibodies: Mouse monoclonal 3D5 anti-Bace1 (kindly given by Dr. Vassar R.), rabbit polyclonal anti-XBP-1 (M-186 Santa-Cruz Biotechnology), mouse-monoclonal anti-actin (Sigma Aldrich), mouse-monoclonal anti-Myc (9E10; Santa-Cruz biotechnology). Protein immunoreactivity was assayed using peroxidase-coupled antibodies (Jackson immunoresearch), resulting electrochemiluminescence was detected with luminescence analyzer LAS-3000 (Raytech). Multi-Gauge software (FUJI film) was used for image protein quantification. All densitometric quantifications were normalized using actin as loading control.

RNA extraction and Quantitative Real-time PCR. Total RNA extractions were performed with RNA easy extraction kit (Qiagen) on Qiacube device following manufacturer's material and methods. RNA quantities were normalized at 2000 ng and reverse-transcribed with GoScript reverse-transcriptase (Promega) on a Biometra thermocycler. Real time quantitative PCR were performed on Rotor-gene6000 (Qiagen) using SYBR Green protocol according to manufacturer's recommendation. Gene expression of BACE1, XBP-1s and HRD1 were normalized using human or mouse ribosomal protein 69 (Rpl 69) gene expressions depending on RNA species. RNA relative expression was calculated following Livak K.J. delta-delta CT method⁷⁰. Selected primers are listed below: cTOP Forward (F) 5'-AGG-ATC-ACA-GTG-GCT-TGG-TG-3'/Reverse (R) 5'-TCG-TAG-TCC-CGT-CGG-TCA-T-3'; cHRD1: F5'-AGG-TGT-CTT-ACC-CCC-GAA-GT-3'/R5'-GGT-AGT-AGG-CAT-GAG-CCA-CC-5'; cXBP-1s: F5'-GAG-CTG-GAA-CAG-CAA-GTG-GT-3'/R5'-GCCTGCACCTGCT GCG-3'; hTOP: F 5'-CCC-TGT-ACT-TCA-TCG-ACA-AGC-3'/R 5'-CCA-CAG-TGT-CCG-CTG-TTT-C-3'; hRPL69: F 5'-GGG-CAT-AGG-TAA-GCG-GAA-GG-3'/R 5'-TCA-GGT-ACA-GGC-GTG-GAT-ACA-3'; hXBP-1s: F 5'-AGC-TTT-TAC-GGG-AGA-AAA-CTC-A-3'/R 5'-ACA-GTC-GTC-TTG-GGACGT-G-3'; hHRD1: F 5'-GGC-AAC-AGG-AGA-CTC-CAG-CTT-3'/R 5'-CTG-CTT-CTG-CCA-CAG-CAT-C-3'; hBACE1: F 5'-ACA-CCA-GCT-GCT-CTC-CTA-GC-3'/F 5'-TGC-AGT-CAA-ATC-CAT-CAA-GG-3'; mRPL69: F 5'-CTG-ATC-AGG-GAT-GGG-CTG-AT-3'/F 5'-GCC-GCT-ATG-TAC-AGA-CAC-GA-3'; mXBP-1s: F 5'-AGC-TTT-TAC-GGG-AGA-AAA-CTC-A-3'/R 5'-GCC-TGC-ACC-TGC-TGC-G-3'; mHRD1: F 5'-TCT-GTG-CAG-CTG-GTA-TTT-GG-3'/R 5'-GGC-AAA-GAG-TGG-GAA-TGT-GT-5'; mBACE1: F 5'-TCC-TTC-CGC-ATC-ACC-ATC-3'/R 5'-ACA-GTC-GTC-TTG-GGA-CGT-G-3'.

β-secretase enzymatic activity assay. Cells were harvested in PBS-EDTA 5 mM and centrifuged at 3,000 rpm for 5 min. After centrifugation, pellets were lysed on ice with an homogenization buffer (5 mM EDTA, 1 mM Hepes, 0.25 M sucrose) using a 26G syringe. The samples were then centrifuged at 850 g for 10 minutes and the supernatants were centrifuged once more at 20,000 g for 1 h. All preparations were normalized to a protein concentration of 3 µg/µl after Bradford quantification using Tris buffer (Tris 10 mM pH 7.5). 10 µl of each sample were incubated in a 96 wells plate with 90 µl acetate buffer (25 mM, pH 4.5) in presence or absence of BACE1 specific inhibitor (PromoKin). After 5 minutes of incubation, BACE1 fluorimetric substrate [(7-methoxycoumarin-4-yl)-acetyl-SEVNLDAEFRK(2,4-dinitrophenyl)-RRNH₂; 10 µM R&D Systems] was added and the BACE1-like activity was monitored as described⁷¹ every 15 minutes for 2 h30 (320 nm excitation wavelength and 420 nm emission wavelength). Specific BACE1 activity was considered as the inhibitor-sensitive fluorimetric activity.

Luciferase and β-galactosidase activities. Luciferase activities (reporting BACE1 promoter activities) were measured after cells co-transfection with both a luciferase reporter construct and a β-galactosidase encoding construct. Cells were lysed, on ice, using a reporter lysis buffer (Promega) before centrifugation at 2,500 rpm for 10 minutes. Supernatant fraction (20 µl) was mixed with luciferase reagent (50 µl) and luminescence was then measured on Varioskan flash reader (Thermo Scientific). Luciferase activity was normalized with either beta-galactosidase activity and protein concentration determined by Bradford method.

Cycloheximide pulse-chase experiment. Cells were transfected with construct encoding HRD1-myc or a control empty vector for 12 hours. Cycloheximide (Sigma-Aldrich) was added to the cell media at a concentration of 1 µM up to 48 hours of time. Cells were harvested every 12 hours in PBS-EDTA buffer and centrifuged at 3,000 rpm for 5 minutes. Protein extraction and western blot were then carried out as indicated in the corresponding section.

Synthetics Aβ42 oligomers preparation. Synthetic Aβ42 (Bachem Distribution Services GmbH, Weil am Rhein, Germany) was solubilized in HFIP (hexafluoro-2-propanol) according to previously described (Clarke *et al.*, 2015). Briefly, after solubilization and solvent evaporation, dried films were dissolved and stirred in 10 µl dimethylsulfoxide. After dilution into 500 µl of cold PBS during 24 hours, insoluble aggregates were removed by

centrifugation at 14,000 g for 10 min at 4 °C as described (De Felice *et al.*⁴⁸). Supernatant was then stored at 4 °C. For each cell treatment, 300 µl of the preparation were used.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed with the Excel software. For statistical comparison between two groups, the parametric Student T-test (two tailed) was used. For statistical comparison between three groups, a one-way ANOVA test was performed, followed by the Bonferroni-Holme post hoc correction for multiple comparisons. Graphs represents the mean of the values obtained for each group of samples (biological replicates consisting of independent cells cultures, technical replicates were used in quantitative PCR as internal control for accuracy but are excluded from statistical analysis), error bars represent the standard error of the calculated mean (s.e.m). Criteria for data exclusion were: high background noise and low or heterogeneous specific signal, important loading control variation (Western blot), important modulation of housekeeping gene expression or low accuracy between technical replicates (quantitative PCR), unequal β -galactosidase activity between samples (Luciferase dosage), flat specific enzymatic curve with no exponential phase (β -secretase enzymatic activity assay).

References

- Selkoe, D. J. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* **6**, 487–498 (1991).
- Checler, F. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **65**, 1431–1444 (1995).
- Zhang, H., Ma, Q., Zhang, Y. W. & Xu, H. Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem* **120** Suppl 1, 9–21, doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07519.x (2012).
- Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R. & Wong, P. C. The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci* **29**, 12787–12794, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3657-09.2009 (2009).
- Pardossi-Piquard, R. & Checler, F. The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem* **120** Suppl 1, 109–124, doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07475.x (2012).
- Bonda, D. J. *et al.* Oxidative stress in Alzheimer disease: a possibility for prevention. *Neuropharmacology* **59**, 290–294, doi: 10.1016/j.neuropharm.2010.04.005 (2010).
- Mattson, M. P. ER calcium and Alzheimer's disease: in a state of flux. *Sci Signal* **3**, pe10, doi: 10.1126/scisignal.3114pe10 (2010).
- Orth, M. & Schapira, A. H. Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet* **106**, 27–36, doi: 10.1002/ajmg.1425 (2001).
- Paula-Lima, A. C., Brito-Moreira, J. & Ferreira, S. T. Deregulation of excitatory neurotransmission underlying synapse failure in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **126**, 191–202, doi: 10.1111/jnc.12304 (2013).
- Reddy, P. H. *et al.* Amyloid-beta and mitochondria in aging and Alzheimer's disease: implications for synaptic damage and cognitive decline. *J Alzheimers Dis* **20** Suppl 2, S499–S512, doi: 10.1007/s00401-016-1577-6 (2010).
- Jiang, Y. *et al.* Alzheimer's-related endosome dysfunction in Down syndrome is Abeta-independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**, 1630–1635, doi: 10.1073/pnas.0908953107 (2010).
- Lauritzen, I. *et al.* The beta-Secretase-Derived C-Terminal Fragment of betaAPP, C99, But Not Abeta, Is a Key Contributor to Early Intraneuronal Lesions in Triple-Transgenic Mouse Hippocampus. *J Neurosci* **32**, 16243–16255 (2012).
- Lauritzen, I. *et al.* Intraneuronal aggregation of the beta-CTF fragment of APP (C99) induces Abeta-independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol* **132**, 257–276, doi: 10.1007/s00401-016-1577-6 (2016).
- Yang, L. B. *et al.* Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med* **9**, 3–4, doi: 10.1038/nm0103-3 (2003).
- Miners, J. S., van Helmond, Z., Kehoe, P. G. & Love, S. Changes with age in the activities of beta-secretase and the Abeta-degrading enzymes neprilysin, insulin-degrading enzyme and angiotensin-converting enzyme. *Brain Pathol* **20**, 794–802, doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00375.x (2010).
- Tamagno, E. *et al.* Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem* **104**, 683–695, doi: 10.1111/jnc.12304 (2008).
- Chami, L. *et al.* Nuclear factor-kappaB regulates betaAPP and beta- and gamma-secretases differently at physiological and supraphysiological Abeta concentrations. *J Biol Chem* **287**, 24573–24584 (2012).
- Cho, H. J., Jin, S. M., Youn, H. D., Huh, K. & Mook-Jung, I. Disrupted intracellular calcium regulates BACE1 gene expression via nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT 1) signaling. *Aging Cell* **7**, 137–147, doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03692.x (2008).
- Christensen, M. A. *et al.* Transcriptional regulation of BACE1, the beta-amyloid precursor protein beta-secretase, by Sp1. *Mol Cell Biol* **24**, 865–874 (2004).
- Nowak, K. *et al.* The transcription factor Yin Yang 1 is an activator of BACE1 expression. *J Neurochem* **96**, 1696–1707, doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03692.x (2006).
- Liu, L., Martin, R., Kohler, G. & Chan, C. Palmitate induces transcriptional regulation of BACE1 and presenilin by STAT3 in neurons mediated by astrocytes. *Exp Neurol* **248**, 482–490, doi: 10.1016/j.expneurol.2013.08.004 (2013).
- Wen, Y. *et al.* Transcriptional regulation of beta-secretase by p25/cdk5 leads to enhanced amyloidogenic processing. *Neuron* **57**, 680–690, doi: 10.1016/j.neuron.2008.03.017 (2008).
- Chami, L. & Checler, F. BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and beta-amyloid production in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **7**, 52, doi: 10.1186/1750-1326-7-52 (2012).
- Ron, D. & Walter, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519–529, doi: 10.1038/nrm2199 (2007).
- Lin, J. H. *et al.* IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* **318**, 944–949, doi: 10.1126/science.1151822 (2007).
- Calton, M. *et al.* IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92–96, doi: 10.1038/415092a (2002).
- Cornejo, V. H. & Hetz, C. The unfolded protein response in Alzheimer's disease. *Semin Immunopathol* **35**, 277–292, doi: 10.1007/s00281-013-0373-9 (2013).
- Dunys, J., Duplan, E. & Checler, F. The transcription factor X-box binding protein-1 in neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener* **9**, 35 (2014).
- Martinez, G. *et al.* Regulation of Memory Formation by the Transcription Factor XBP1. *Cell Rep* **14**, 1382–1394, doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.028 (2016).
- Casas-Tinto, S. *et al.* The ER stress factor XBP1s prevents amyloid-beta neurotoxicity. *Hum Mol Genet* **20**, 2144–2160 (2011).
- Hoozemans, J. J. *et al.* The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **110**, 165–172, doi: 10.1007/s00401-005-1038-0 (2005).
- Buggia-Prevot, V., Sevalle, J., Rossner, S. & Checler, F. NF-kappaB-dependent control of BACE1 promoter transactivation by Abeta42. *J Biol Chem* **283**, 10037–10047, doi: 10.1074/jbc.M706579200 (2008).
- Lambert, M. P. *et al.* Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1–42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 6448–6453 (1998).

34. Walsh, D. M. & Selkoe, D. J. A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* **101**, 1172–1184, doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x (2007).
35. Guillot-Sestier, M. V. *et al.* alpha-Secretase-derived fragment of cellular prion, N1, protects against monomeric and oligomeric amyloid beta (Abeta)-associated cell death. *J Biol Chem* **287**, 5021–5032, doi: 10.1074/jbc.M111.323626 (2012).
36. Guglielmo, M. *et al.* The up-regulation of BACE1 mediated by hypoxia and ischemic injury: role of oxidative stress and HIF1alpha. *J Neurochem* **108**, 1045–1056, doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05858.x (2009).
37. Yamamoto, K. *et al.* Human HRD1 promoter carries a functional unfolded protein response element to which XBP1 but not ATF6 directly binds. *J Biochem* **144**, 477–486, doi: mvn091/jb/mvn091 (2008).
38. Kikkert, M. *et al.* Human HRD1 is an E3 ubiquitin ligase involved in degradation of proteins from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **279**, 3525–3534, doi: 10.1074/jbc.M307453200 (2004).
39. Kuperstein, I. *et al.* Neurotoxicity of Alzheimer's disease Abeta peptides is induced by small changes in the Abeta42 to Abeta40 ratio. *EMBO J* **29**, 3408–3420, doi: 10.1038/emboj.2010.211 (2010).
40. Sevalle, J. *et al.* Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. *J Neurochem* **109**, 248–256 (2009).
41. Wolfe, M. S. Processive proteolysis by gamma-secretase and the mechanism of Alzheimer's disease. *Biol Chem* **393**, 899–905, doi: 10.1515/hsz-2012-0140 (2012).
42. Burdick, D. *et al.* Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* **267**, 546–554 (1992).
43. Chui, D. H. *et al.* Transgenic mice with Alzheimer presenilin 1 mutations show accelerated neurodegeneration without amyloid plaque formation. *Nat Med* **5**, 560–564, doi: 10.1038/8438 (1999).
44. Chui, D. H. *et al.* Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular Abeta42 labeling. *J Alzheimers Dis* **3**, 231–239 (2001).
45. Ghosal, K. *et al.* Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 18367–18372, doi: 10.1073/pnas.0907652106 (2009).
46. Wang, H. W. *et al.* Soluble oligomers of beta amyloid (1–42) inhibit long-term potentiation but not long-term depression in rat dentate gyrus. *Brain Res* **924**, 133–140 (2002).
47. Demuro, A. *et al.* Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers. *J Biol Chem* **280**, 17294–17300, doi: 10.1074/jbc.M500997200 (2005).
48. De Felice, F. G. *et al.* Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* **282**, 11590–11601, doi: 10.1074/jbc.M607483200 (2007).
49. Haapasalo, A. & Kovacs, D. M. The many substrates of presenilin/gamma-secretase. *J Alzheimers Dis* **25**, 3–28, doi: 10.3233/JAD-2011-101065 (2011).
50. Lichtenthaler, S. F. *et al.* The cell adhesion protein P-selectin glycoprotein ligand-1 is a substrate for the aspartyl protease BACE1. *J Biol Chem* **278**, 48713–48719, doi: 10.1074/jbc.M303861200 (2003).
51. Wong, H. K. *et al.* beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J Biol Chem* **280**, 23009–23017, doi: 10.1074/jbc.M414648200 (2005).
52. Willem, M. *et al.* Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* **314**, 664–666, doi: 10.1126/science.1132341 (2006).
53. Cai, J. *et al.* beta-Secretase (BACE1) inhibition causes retinal pathology by vascular dysregulation and accumulation of age pigment. *EMBO Mol Med* **4**, 980–991, doi: 10.1002/emmm.201101084 (2012).
54. Zhou, L. *et al.* The neural cell adhesion molecules L1 and CHL1 are cleaved by BACE1 protease *in vivo*. *J Biol Chem* **287**, 25927–25940, doi: 10.1074/jbc.M112.377465 (2012).
55. De Strooper, B. *et al.* A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* **398**, 518–522, doi: 10.1038/19083 (1999).
56. Donoviel, D. B. *et al.* Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects. *Genes Dev* **13**, 2801–2810 (1999).
57. Zhang, X. *et al.* Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha)-mediated hypoxia increases BACE1 expression and beta-amyloid generation. *J Biol Chem* **282**, 10873–10880, doi: 10.1074/jbc.M608856200 (2007).
58. Tong, Y. *et al.* Oxidative stress potentiates BACE1 gene expression and Abeta generation. *J Neural Transm (Vienna)* **112**, 455–469, doi: 10.1007/s00702-004-0255-3 (2005).
59. Costa, R. O. *et al.* Endoplasmic reticulum stress occurs downstream of GluN2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptor in mature hippocampal cultures treated with amyloid-beta oligomers. *Aging Cell* **11**, 823–833, doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00848.x (2012).
60. Reinhardt, S. *et al.* Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *Faseb J* **28**, 978–997 (2013).
61. Lee, A. H., Iwakoshi, N. N. & Glimcher, L. H. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **23**, 7448–7459 (2003).
62. Cisse, M. *et al.* The transcription factor XBP1s restores hippocampal synaptic plasticity and memory by control of the Kalirin-7 pathway in Alzheimer model. *Molecular Psychiatry* In Press (2016).
63. Mamada, N. *et al.* Amyloid beta-protein oligomers upregulate the beta-secretase, BACE1, through a post-translational mechanism involving its altered subcellular distribution in neurons. *Mol Brain* **8**, 73, doi: 10.1186/s13041-015-0163-5 (2015).
64. Saito, R., Kaneko, M., Okuma, Y. & Nomura, Y. Correlation between decrease in protein levels of ubiquitin ligase HRD1 and amyloid-beta production. *J Pharmacol Sci* **113**, 285–288, doi: JST.JSTAGE/jphs/10118SC (2010).
65. Kaneko, M. *et al.* Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid-beta generation. *J Neurosci* **30**, 3924–3932, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2422-09.2010 (2010).
66. Jung, E. S., Hong, H., Kim, C. & Mook-Jung, I. Acute ER stress regulates amyloid precursor protein processing through ubiquitin-dependent degradation. *Sci Rep* **5**, 8805, doi: 10.1038/srep08805 (2015).
67. Zhao, Y. *et al.* XBP-1u suppresses autophagy by promoting the degradation of FoxO1 in cancer cells. *Cell Res* **23**, 491–507, doi: 10.1038/cr.2013.2 (2013).
68. Hong, I. *et al.* Quantitative proteomic analysis of the hippocampus in the 5XFAD mouse model at early stages of Alzheimer's disease pathology. *J Alzheimers Dis* **36**, 321–334, doi: 10.3233/JAD-130311 (2013).
69. Valenzuela, V., Martinez, G., Duran-Aniotz, C. & Hetz, C. Gene therapy to target ER stress in brain diseases. *Brain Res*, doi: 10.1016/j.brainres.2016.04.064 (2016).
70. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408, doi: 10.1006/meth.2001.1262 S1046-2023(01)91262-9 (2001).
71. Andrau, D. *et al.* BACE1- and BACE2-expressing human cells: characterization of beta-amyloid precursor protein-derived catabolites, design of a novel fluorimetric assay, and identification of new *in vitro* inhibitors. *J Biol Chem* **278**, 25859–25866, doi: 10.1074/jbc.M302622200 (2003).

Acknowledgements

Drs L. Glimcher and R. Vassar are warmly thanked for providing us with the XBP-1 constructs and 3D5 antibody, respectively. Dr D.K. Lahiri is acknowledged for the kind gift of human Bace1 promoter cloned in pGL3-basic vector. This work has been developed and supported through the LABEX (excellence laboratory, program investment for the future) DistALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease) and by the Hospital University federation (FHU) OncoAge. YG has been supported by DistALZ. The present work was supported by CNRS, INSERM and by the "Conseil Départemental des Alpes Maritimes" and the "Fondation Claude Pompidou".

Author Contributions

Y.G. and C.B. performed experiments. Y.G. and J.D. designed experimental procedures. Y.G., J.D. and F.C. wrote the paper. J.D. and F.C. supervised the project. Final manuscript version has been approved by all the authors.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Gerakis, Y. *et al.* A β 42 oligomers modulate β -secretase through an XBP-1s-dependent pathway involving HRD1. *Sci. Rep.* **6**, 37436; doi: 10.1038/srep37436 (2016).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

V - La restauration de la plasticité synaptique et de la mémoire hippocampique par XBP-1s via la voie Kalirin-7 dans un modèle Alzheimer

The transcription factor XBP1s restores hippocampal synaptic plasticity and memory by control of the Kalirin-7 pathway in Alzheimer model

Moustapha Cissé, Eric Duplan, Thomas Lorivel, Julie Dunys, Charlotte Bauer, Xavier Meckler, Yannis Gerakis, Inger Lauritzen, and Frédéric Checler

V.1 - La plasticité et la mémoire hippocampique sont améliorées par XBP-1s dans un modèle de souris Alzheimer

XBP-1s a été surexprimé *in vivo* par infection virale, en utilisant une injection stéréotaxique dans le cerveau de souris 3xTgAD. Ce modèle de souris triple transgéniques, portant des mutations sur l'APP (sur-expression), la Préséniline 1 (knock in) et Tau, récapitule les lésions canoniques de la maladie : production d'A β menant à la formation de plaques, NFTs et déficits cognitifs (**Figure 1A**). L'infection virale a produit un taux d'expression de XBP-1s élevé (60% au moins dans le Gyrus dentelé et le CA1) (**Figure 1B + Figure 1C-1E**)

Différents tests comportementaux permettant d'évaluer les performances d'apprentissage et mémorielles ont été ensuite réalisés sur les différents groupes de souris (NTG - Non transgénique + Empty - Lentivirus avec vecteur vide ; 3xTgAD + Empty ; 3xTgAD + XBP-1s). Lors du test de piscine de Morris, les souris 3xTgAD + Empty ont obtenu des performances bien en dessous des souris 3xTgAD + XBP-1s et NTG Empty (**Figures 1F, 1G et 1H**). Le poids des différentes souris, leur vitesse de nage ainsi que leur vision ont également été comparés pour s'assurer que les capacités physiques plutôt que mémorielles des animaux n'étaient pas en cause (**Figures Supplémentaire 1G, 1H et 1I**). Aucune différences significatives n'ont été observé.

Puisque la plasticité neuronale est étroitement liée à la formation et à la transmission synaptique, la quantité d'épines dendritiques a été étudiée dans les différents groupes de souris. Les expériences ont montré une augmentation de la densité d'épines dendritiques des neurones pyramidaux du CA1 chez les animaux 3xTgAD/XBP-1s par rapport aux 3xTgAD/Empty (**Figure 1I**). Ces résultats montrent que XBP-1s peut améliorer la plasticité synaptique, via une modulation de la formation des épines dendritiques - ceci sans exclure d'autres voies possibles.

V.2 - XBP-1s et les oligomères de peptide amyloïde- β 1-42 peuvent réguler le récepteur Kalirin-7 de façon opposée

La formation des épines dendritiques est dépendante de la voie de signalisation Kalirin-7 (Kal-7)/Rac1, qui permet la remodelisation du cytosquelette d'actine. La surexpression de XBP-1s dans des cultures primaires de neurones révèle une augmentation de la quantité d'ARNm de la forme épissée de XBP-1, ainsi qu'une augmentation de sa protéine (**Figures 2B et 2C**). Pour confirmer l'implication de la fonction transcriptionnelle de XBP-1s, l'activation du promoteur de Kal-7 a également été étudiée, ceci dans la lignée cellulaire SH-SY5Y utilisant un système de gène rapporteur luciférase. Les résultats montrent que XBP-1s active le promoteur de Kal-7 (**Figure 2A**).

De façon intéressante, l'expression de l'ARNm ainsi que de la protéine Kal-7 est diminuée chez les souris 3xTgAD (**Figures 2D et 2E**). Il en va de même pour l'un de ses activateurs EphB2 (Ephrine B2) (**Figures 2D et 2E**). L'effecteur de cette voie de signalisation, Rac1, montre également un niveau de phosphorylation réduit de sa protéine, indiquant une moindre activation de cette signalisation (**Figure 2F**). Ces résultats ont été reproduits dans un modèle murin surproduisant le peptide amyloïde- β , sans mutations de la protéine Tau, supposant une implication du peptide dans ces altérations (**Figures Supplémentaires 2A-2H**).

Pour confirmer la régulation de cette voie par le peptide amyloïde- β , les modulations de Kal-7, EphB2 et Rac1 ont été analysées en présence d'oligomères de peptides amyloïde- β issus de cellules CHO (Voir matériels et méthodes), sur des cultures primaires de neurones. L'expression des ARNm ainsi que des protéines Kal-7 et d'EphB2 sont réduites par le traitement, ainsi que la quantité de Rac1 activé (**Figures 2G et 2H**). L'activation des promoteurs de Kal-7 et EphB2 est également inhibée en présence d'oligomères (**Figure 2I et 2J**).

V.3 - La voie Kalirin-7 est aussi diminuée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer

Des échantillons post-mortem des cerveaux des patients atteints de maladie d'Alzheimer (forme non familiale), ont été analysés par immuno-marquage. En accord avec les résultats obtenus dans les modèles murins et cellulaires, la quantité protéique de Kal-7, de EphB2 ainsi que de Rac1 actif est diminuée dans les tissus hippocampiques (Gyrus dentelé et CA1) par rapport aux contrôles (**Figure 3A-3L**). Cette altération apparaît fortement corrélée à la pathologie.

V.4 - L'inhibition de la Kalirin-7 diminue les capacités mémorielles des souris du groupe contrôle

Pour vérifier l'implication des protéines EphB2/Kal-7 dans la plasticité synaptique, leur expression a été réduite en utilisant des shARNs (Short Hairpin). Des lentivirus capables de transcrire les différentes séquences (shARNs anti-EphB2, shARNs anti-Kal-7 ; séquence contrôle "scramble") ont été injectés ou co-injectés par stéréotaxie dans les régions du CA1 et du gyrus dentelé des souris contrôle (**Figure 4A**). Une réduction notable de l'expression des ARNm des deux cibles a été observée en comparaison aux injections contrôles (scramble) (**Figure 4B**). La mesure de la densité d'épines dendritiques des neurones du CA1 des souris injectées avec les shARNs anti-EphB2 ou anti-Kal-7 révèle une diminution égale

de la quantité d'épines, qui n'est pas accentuée par la double expression des deux shARNs (**Figure 4C**). Du fait de la linéarité de la voie EphB2/Kal-7, ces résultats ne sont pas surprenants. La transmission synaptique des neurones pyramidaux du CA1 des souris injectées a ensuite été testée dans les différentes conditions exposées. Une diminution de la LTP (Potentialisation à long terme) est constatée chez les animaux exprimant les shARNs anti-EphB2 ou anti-Kal-7 par rapport aux contrôles (**Figure 4D**).

Finalement, les performances mémorielles de ces souris ont été analysées en utilisant le test de piscine de Morris. Des altérations négatives du comportement des animaux injectés avec les shARNs anti-EphB2 ou anti-Kal-7 sont constatées, avec une réduction de l'efficacité de la mémoire spatiale (**Figures 4E-4G**). Comme lors des tests précédents, le poids et les capacités motrices des souris sont évalués et égaux entre les différents groupes.

V.5 - XBP-1s active la plasticité synaptique via la signalisation Kalirin-7 dans les souris 3xTgAD

XBP-1s ainsi que la voie EphB2/Kal-7 activent la plasticité synaptique, et XBP-1s peut moduler la transcription de Kal-7, la dernière étape consiste à vérifier le lien possible entre ces deux voies. Des souris 3xTgAD ont donc été co-injectées par stéréotaxie avec des lentivirus exprimant XBP-1s ainsi qu'un lentivirus exprimant le shARN anti-EphB2, anti-Kal-7 ou scramble, dans les régions hippocampiques du gyrus dentelé et du CA1 (**Figures 5A et 5B**). De façon intéressante, les souris injectées avec XBP-1s/Scramble montrent une augmentation de l'ARNm de Kal-7 mais pas de EphB2. Les souris XBP-1s/shARN anti-EphB2 montrent comme attendu une diminution de EphB2, cependant les souris XBP-1s/shARN anti-Kal-7 expriment un niveau d'ARNm de Kal-7 similaire aux animaux contrôles Empty/Scramble (**Figures Supplémentaires 10A-D**). Cette observation révèle une compensation possible de l'inhibition de Kal-7 par son shARN via la surexpression de son activateur XBP-1s.

En accord avec les résultats de la **Section 1**, les souris 3xTgAD XBP-1s/Scramble montrent une augmentation de la densité d'épines dendritiques dans les neurones du CA1 et du gyrus dentelé (**Figures 5C et 5D**), combinée à une amélioration de la LTP par rapport aux souris contrôles Empty/Scramble (**Figures 5E et 5F**). Ces effets positifs de XBP-1s sur la plasticité synaptique des souris 3xTgAD sont totalement bloqués par le shARN anti-Kal-7, mais pas par le shARN anti-EphB2 (**Figures 5C-5F**). La compensation des déficits de mémoire spatiale des souris 3xTgAD par la surexpression de XBP-1s est également bloquée par le shARN anti Kal-7 mais pas par le shARN anti-EphB2 (**Figures 5G-5I**). L'activation de Kal-7 par XBP-1s apparaît donc comme une voie parallèle à l'activation de Kal-7 par EphB2.

V.6 - Conclusion

Cette étude révèle une activité de XBP-1s dans des conditions pathologiques, en utilisant un modèle murin mimant les différentes lésions histopathologiques de la maladie d'Alzheimer ainsi que certains des troubles comportementaux qui y sont associés. La surexpression cérébrale de XBP-1s dans ces conditions montre une amélioration de la plasticité synaptique des animaux transgéniques, ainsi qu'une augmentation de leurs performances à certains tests cognitifs, suggérant une amélioration de leur mémoire hippocampique. Cet effet est dépendant de l'activation de la formation des épines dendritiques des neurones par XBP-1s via la signalisation Kalerin-7. Ces résultats rejoignent une autre étude récente montrant que XBP-1s favorise la formation de la mémoire hippocampique en augmentant la transcription du facteur neurotrophique BDNF, ceci dans des conditions non pathologiques (**Martinez G. et al., 2016**). Ces travaux apportent des preuves supplémentaires de l'effet bénéfique de XBP-1s sur l'homéostasie neuronale, confirmant également l'activation basale finalement faible, ou très transitoire, de ce facteur de transcription dans les cerveaux des modèles étudiés ou des patients touchés par la maladie. Cette observation soulève la possibilité d'approches thérapeutiques visant à stimuler ou prolonger l'activation de XBP-1s, pour compenser la diminution de certaines signalisations liées à la transmission synaptique et donc aux symptômes de la pathologie.

Publication numéro 2

The transcription factor XBP1s restores hippocampal synaptic plasticity and memory by control of the Kalirin-7 pathway in Alzheimer model

Moustapha Cissé, Eric Duplan, Thomas Lorivel, Julie Dunys, Charlotte Bauer, Xavier Meckler, Yannis Gerakis, Inger Lauritzen, and Frédéric Checler

ORIGINAL ARTICLE

The transcription factor XBP1s restores hippocampal synaptic plasticity and memory by control of the Kalirin-7 pathway in Alzheimer model

M Cissé, E Duplan, T Lorivel, J Dunys, C Bauer, X Meckler, Y Gerakis, I Lauritzen and F Checler

Neuronal network dysfunction and cognitive decline constitute the most prominent features of Alzheimer's disease (AD), although mechanisms causing such impairments are yet to be determined. Here we report that virus-mediated delivery of the active spliced transcription factor X-Box binding protein 1s (XBP1s) in the hippocampus rescued spine density, synaptic plasticity and memory function in a mouse model of AD. XBP1s transcriptionally activated Kalirin-7 (Kal7), a protein that controls synaptic plasticity. In addition, we found reduced levels of Kal7 in primary neurons exposed to A β oligomers, transgenic mouse models and human AD brains. Short hairpin RNA-mediated knockdown of Kal7 altered synaptic plasticity and memory formation in naive mice. Further, reduction of endogenous Kal7 compromised the beneficial effects of XBP1s in Alzheimer's model. Hence, our findings reveal that XBP1s is neuroprotective through a mechanism that engages Kal7 pathway with therapeutic implications in AD pathology.

Molecular Psychiatry advance online publication, 20 September 2016; doi:10.1038/mp.2016.152

INTRODUCTION

Spine development and plasticity are essential for normal cognitive function and underlie processes such as learning and memory. Abnormalities in spine formation and morphology are associated with numerous neurological and intellectual disorders, including Alzheimer's disease (AD).^{1–6} AD is characterized histologically by intracellular neurofibrillary tangles and extracellular A β deposits in specific regions of the brain.⁷ Loss of synapses in the hippocampus is a hallmark of AD⁸ and acute A β exposure to neuronal cultures or slices reduces spine density and alters neuronal plasticity,^{9–11} most likely by affecting proteins that regulate spinogenesis. Loss of dendritic spines directly correlates with the loss of synaptic function and deficits in memory.^{12,13} Therefore, pharmacological strategies aimed at preserving the integrity of spines by targeting proteins that functionally regulate these neuronal structures could be beneficial in AD pathology. In this perspective, X-Box binding protein 1s (XBP1s), a sensor of endoplasmic reticulum stress and potent multitasking transcription factor¹⁴ is one likely target for several reasons. Indeed, endoplasmic reticulum stress is implicated in neurodegenerative diseases and a polymorphism on the *XBP1* promoter is a risk factor for AD.¹⁵ The mRNA of XBP1 is expressed in the brains of adult rodents,¹⁶ although little is known about the detailed pattern of expression and function of XBP1 in the mammalian central nervous system. Furthermore, sparse reports indicate that in hippocampal neurons, XBP1 mRNAs are transported from the nucleus to the dendrites,¹⁷ spliced locally into its active form XBP1s by IRE1 and translated in the manner of local protein synthesis.¹⁸ However, whether XBP1s functionally regulates dendritic spine density and ameliorates synaptic plasticity and memory function in the pathogenic context of AD remain to be determined.

Here we report that therapeutic gene modulation of XBP1s in the hippocampus of AD mice resulted in profound changes of spine density, synaptic plasticity and cognitive function. These changes countervailed A β -induced alterations of synaptic plasticity and memory function. We further established that Kalirin-7 (Kal7), a member of the Rho-GEF family that regulates the formation, maturation, and maintenance of dendritic spines,¹⁹ is the main molecular mediator of beneficial effects exerted by XBP1s in AD model.

METHODS SUMMARY

General

Unless indicated otherwise, all data reported in this paper were obtained in blind-coded experiments, in which the investigators who obtained the data were unaware of the specific genotype and treatment of mice, brain slices and cell cultures.

Experimental models

Heterozygous transgenic and nontransgenic mice were from line CRND8²⁰ and 3xTg-AD.²¹ Hippocampal primary neuronal cultures from wild-type rats were treated with medium conditioned by CHO cells that do or do not produce human amyloid- β .²²

Experimental manipulations

Lentiviral constructs directing expression of no transgene products, XBP1s, EphB2-Flag or green fluorescent protein (GFP) in combination with anti-Kal7 short-hairpin RNAs (shRNAs), anti-EphB2 shRNAs or scrambled control shRNAs were injected stereotactically into the hippocampus of mice. Neuronal cultures were infected with some of these constructs and stimulated with

Fc-ephrin-B2 or Fc control. Human neuroblastoma cells were transfected with empty vector or a vector encoding Kal7 promoter and treated with A β oligomers or vehicle.

Outcome measures

EphB2, GluN1, XBP1s, tubulin, active Rac1, total Rac1 and Kal7 levels in brain tissues or neuronal cultures were determined by western blot. Corresponding transcripts were measured by quantitative polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-qPCR). Field recordings from acute hippocampal slices were used to determine synaptic strength (field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) I/O relationships) and synaptic plasticity long-term potentiation (LTP) at the Schaffer collateral to CA1 pyramidal cell synapses. Learning and memory were assessed in the Morris water maze (MWM) task.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of A β oligomers

Stably hAPP-transfected CHO cells, which naturally produce A β oligomers, were cultured as described.²³ In brief, CHO cells were grown to 80% confluency in 150-mm dishes, washed with PBS and incubated for ~24 h in serum-free Neurobasal A medium. The medium was collected and spun at 1000 rpm for 10 min to eliminate cell debris. Supernatants were concentrated 10-fold with a Centrprep YM-3 (4303; Millipore, Fontenay sous Bois, Île-de-France, France), collected as 1-ml aliquots and stored at -80 °C.

Primary neuronal culture and treatment

Hippocampi of rat pups (P0) (<http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/sprague-dawley-rat>) were cultured by using the papain dissociation system (LK003150; Worthington) per manufacturer's instructions. Cells were plated in polylysine-coated wells and maintained in serum-free Neurobasal medium (12348-017; Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with B27 (17504044; Gibco) and antibiotics (15070-063; ThermoFisher Scientific). Half the medium was changed after 5 days in culture. Cells were used after 14 days in culture. More than 95% of the cells were neurons, as determined by staining with an antibody against the neuron-specific marker MAP2 (data not shown). Neuronal cultures were treated with A β oligomers from CHO-conditioned medium, control vehicle from untransfected CHO cells, clustered recombinant EphrinB2-Fc (496-EB; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), or control Fc (SA1-600; ThermoFisher Scientific). EphrinB2-Fc and control Fc were preclustered with anti-human Fc antibody at 50 ng ml⁻¹ in Neurobasal medium at RT for 1 h and applied at final concentrations of 500 ng ml⁻¹. Treatment with anti-Fc antibodies served as an additional control. After treatment, cells were harvested in a lysis buffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 5 mM EDTA) supplemented with a protease inhibitor mixture (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), spun at 13 000 rpm for 5 min, and frozen at -80 °C for subsequent determination of protein concentration and western blot analysis.

Immunohistochemistry

Mouse brain sections. After behavioral testing, mice were anesthetized with Pentobarbital (NEMBUTAL, CEVA, Akorn, Lake Forest, IL, USA) and transcardially perfused with 0.9% saline. One hemibrain was drop-fixed in 4% paraformaldehyde for 48 h, and the other hemibrain was immediately frozen at -70 °C. Sagittal sections (30 μ m) were prepared with a sliding microtome and collected for immunohistochemistry. Primary antibodies used were: goat anti-EphB2 (1:500; AF467; R&D Systems), rabbit anti-Kal7 (1:500; Ab-2958 or Ab-2959 (ref. 24)) rabbit anti-XBP1s (1:100; Ab-M186; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA).

JH2958 or JH2959 antibodies are specific to the last 20 aa C-terminal residues of Kal7, which have been extensively characterized in primary cultured neurons and in hippocampal tissues.^{24–28}

Binding of antibodies was detected with biotinylated horse anti-goat (1:2000; BA-9500; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) or donkey anti-rabbit (1:2000; BA-1000; Vector Laboratories), and incubation with avidin-biotin complex (Vector Laboratories) followed by Streptavidin fluorochrom Alexa594 (1/1000; Molecular Probes, ThermoFisher Scientific). Sections were mounted with Vectashield mounting medium with

4,6-diamidino-2-phenylindole (H1200; Vector Laboratories). Sections labeled with anti-XBP1s were incubated with Alexa594 anti-mouse IgG secondary antibody (1:1000; Molecular Probes, ThermoFisher Scientific) and mounted onto slides for analysis with a laser-scanning confocal microscope (LSM 780, Zeiss, Marly-le-Roi cedex, France). The relative numbers of XBP1s neurons were determined by counting positive granule or pyramidal cells in every 5th serial sagittal sections throughout the entire medial-lateral axis of the hippocampus. Confocal images of XBP1s immunoreactivity was analyzed with NIH Image software. All sections were blind coded for analysis.

Human brain sections. Human hippocampal sections embedded in paraffin were immunostained after a dewaxing procedure comprising sequential washing steps with xylene, ethanol and PBS. Sections were immunostained after antigen retrieval in a buffer (Tris, 50 mM; ethylenediaminetetraacetic acid, 5 mM; pH 8) containing proteinase K (5 μ g ml⁻¹) at 37 °C for 30 min. Non-specific binding was blocked by incubation for 2 h in blocking solution (5% BSA in 0.5% TBS-Triton X-100). Sections were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-Kal7 (1:500 in blocking buffer; Ab-2958 or Ab-2959 (ref. 24)). Biotinylated anti-rabbit secondary antibody (Vector Laboratories) was similarly diluted and applied to the sections for 1 h at room temperature. Sections were revealed as described above.

Imaging of spine density

Imaging was performed on a laser-scanning microscope (LSM 780, Zeiss) by using GFP signal. All dendritic spine counting were done manually with Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Sections from lentivirus-injected mice were imaged for dendritic arborization with a $\times$ 62 objective and $\times$ 3.0 optical zoom. Thickness of z-stack was varied to accommodate the dendritic span of labeled granule or pyramidal cells, with 0.25 μ m distance between image planes. Dendritic spines were imaged and analyzed in the outer molecular layers of the dentate gyrus (DG) and in the *stratum radiatum* of CA1 region. Laser intensity and gain were adjusted between sections to accommodate staining efficiency, but the same microscope settings were used within the same section. 4',6'-diamidino-2-phenylindole fluorescent immunoreactivity was determined by counting the number of cells stained in four sections each 150 μ m apart. The average number of 4',6'-diamidino-2-phenylindole-positive cells was defined as 1.0. The infectivity efficiency rate corresponds to the number of GFP-expressing cells reported to 4',6'-diamidino-2-phenylindole staining.

Human brain tissue

Frozen tissue. Frozen hippocampal tissue from AD cases and nondemented controls were obtained from the *Lille NeuroBank* collection (Centre de Ressources Biologiques du CHRU de Lille). Nine nondemented individuals (age: 22–80 years; six males, three females; Braak stages 0) and nine AD patients (three males, six females; age: 59–86 years; Braak stages V–VI) were included. Brain pH, postmortem intervals were similar in AD cases and nondemented controls.

Paraffin-embedded tissue. Sections of paraffin-embedded post-mortem brain tissues containing hippocampus from people without cognitive impairments (controls, $n=5$, 53–92 years) and from patients with AD ($n=12$, 60–92 years) were obtained from Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris, France). Cases met the following criteria: controls, clinical dementia rating (CDR) 0 and Braak stage 0 and AD cases, CDR ≥ 4 and Braak stages V–VI.

Animal models

Mice from line 3xTg-AD are triple transgenic model that are knocked-in for PS1M146V and overexpress Swedish mutated β APP and P301L tau.²¹ We used 3-month-old 3xTg-AD females and control nontransgenic littermates. We used a female-only cohort based on our experience with the 3xTg-AD line and evidence in the literature that females exhibit more extensive amyloid, but similar tau, pathology in this model relative to males.²⁹ Furthermore, there is an age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD model, with females performing worse than males shortly after 4 months of age in the MWM task.³⁰ The transgenic CRND8 is a mouse model of AD-like amyloid pathogenesis that overexpresses an amyloid precursor protein containing the Swedish and Indiana familial AD mutations (K670N/M671L and V717F).²⁰ We used CRND8 females for biochemical analysis. Naive mice used for knockdown experiments are females from line 1295 (Charles River; <http://www.criver.com>).

com/products-services/basic-research/find-a-model/129-mice, Saint Germain sur l'Arbresle, Lyon, France). All mouse experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of the France Ministry of research under authorization number 00656.02.

Lentivirus production

Lentiviral vectors were based on FUGW.³¹ To increase expression of XBP1s or EphB2, a sequence encoding XBP1s or EphB2-Flag was inserted between the NotI sites of the FUGW backbone. PCR was carried out to amplify the mouse XBP1s target sequence inserted within a pcDNA3 vector backbone and driven by a cytomegalo virus promoter as previously described.³² The pcDNA3-XBP1s vector was a generous gift from Dr Ling Qi laboratory (Michigan Medical School, Ann Arbor, MI, USA). Then, the PCR-amplified sequence encoding XBP1s mouse gene was inserted between the NotI sites of the FUGW vector backbone.³¹ Within FUGW vector, the XBP1s sequence is driven by a cytomegalo virus promoter. The same strategy was used to subclone EphB2 into FUGW backbone.

Kal7 or EphB2 expression was reduced with shRNA sequences targeting mouse Kal7 or EphB2 under the U6 promoter. Target sequences were 5'-AGTCTGCAACTCAAGTAGA-3' for Kal7 and 5'-ACGAGAACATGAACACTAT-3' for EphB2.³³ The U6-shRNA expression cassette (pSilencer 2.0, Ambion, ThermoFisher Scientific) was inserted between the *PacI* and *NheI* sites of a modified FUGW lentiviral backbone, placing the shRNA cassette upstream of a ubiquitin C promoter directing expression of enhanced GFP. A similar construct expressing a scrambled shRNA was used as a control. Active lentiviral particles were generated by cotransfecting the transfer vector with two helper plasmids, delta8.9 (packaging vector) and VSV-G (envelope vector) into Lenti-X 293 T cell line (632180; Clontech, Mountain View, CA, USA). To prevent contamination by bacteria and mycoplasma, cells were pretreated with Nanomycopolitine reagent (L-X16-010; Biowest, Nuaille, France). The viral particles were purified from the culture medium by ultracentrifugation. An empty virus was used as control. Viral titers were determined by p24 ELISA (VPK-107; Cell Biolabs, San Diego, CA, USA).

Stereotaxic injection

Two to three-month-old naive, nontransgenic and triple transgenic (3xTg-AD) mice were anesthetized by intraperitoneal injection with a mixture of ketamine (75 mg kg⁻¹) and medetomidine (1 mg kg⁻¹). Mice were placed in a mouse head holder, and lentiviral vectors were stereotactically injected bilaterally into the DG and CA1 region (2–3 µl per site; two sites per hemisphere) with high titers of viral particles (1 × 10¹⁰ to 4 × 10¹⁰ viral particles) at the following coordinates DG: a/p, –2.1, m/l ± 1, d/v, –2.0; CA1: a/p, –2.1, m/l ± 1, d/v, –1.5. Viruses expressing XBP1s or EphB2 were mixed at 1:1 ratio with GFP-expressing viruses. We chose this co-infection procedure because large GFP inserts can lead to very low viral titers that are useless for stereotaxic injections and to avoid artifacts on the proper function and trafficking of our proteins of interest that could result from a fusion to GFP. After surgery, anesthetics were reversed with atipamezole (1 mg kg⁻¹). Behavioral assays were carried out 3 months (experiments in naive mice) or 6 months (experiments in transgenic mice) after lentiviral injections.

Protein extraction from tissues

Total tissue lysates from mouse or human brain were obtained by homogenizing isolated hippocampus or microdissected hippocampus (CA1 region and DG) in ice-cold lysis buffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 5 mM EDTA) supplemented with a protease inhibitor mixture (Sigma). Samples were centrifuged at 1000 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was placed on ice and the pellets were re-homogenized in 0.5 ml of lysis buffer and centrifuged at 1000 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was combined with the first supernatant collected and centrifuged at 100 000 g for 1 h at 4 °C. Supernatant from this last centrifugation was then collected and used to determine the protein concentration of the samples and for western blot analyses.

Immunoblotting

For detection of Kal7, EphB2, total Rac1 and NR1, 50 µg of protein was loaded into each well of a 8% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis gel. For detection of XBP1s and tubulin, 50 µg of protein was loaded into each well of a 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis gel. Active Rac1 was detected in brain homogenates

from lentivirus-injected mice or human tissues with Active Rac1 Pull-Down and Detection Kit (17283; Millipore). For active Rac1 detection, 200–300 µg proteins were pulled-down using 10 µl of PAK1-agarose beads per manufacturer's instructions and loaded into each well of a 16.5% tris tricine gel. Gels were transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted with rabbit anti-Kal7 (1:1000, ab-2958 or ab-2959 (ref. 25)) mouse anti-NR1 (1:1000, Millipore), mouse anti-EphB2 (1:1000, Invitrogen, ThermoFisher Scientific), rabbit anti-XBP1s (1:500; Ab-M186; Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-Rac1 (1:1000, Millipore), mouse anti-tubulin (1:1000, SIGMA). Goat anti-rabbit or anti-mouse antibodies (1:5000, Chemicon) were used as secondary antibodies. Protein bands were visualized with SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) and quantified densitometrically with Image J software (National Institutes of Health).

ELISA analysis of Aβ levels

Hippocampi were isolated from mice injected with lentiviral particles and homogenized in RIPA buffer (50 mM Tris, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate and protease inhibitor mixture). Samples underwent steps of lysis with a Dounce homogenizer and sonication. After ultracentrifugation (100 000 g, 1 h, 4 °C), supernatants were recovered as the soluble fractions. Pellets containing insoluble material were mechanically dissociated in formic acid (70%) and by ultracentrifugation (100 000 g, 1 h, 4 °C). Supernatants were stored as the insoluble fraction. Before further analysis, soluble and insoluble fractions were neutralized to pH 7.5 with 1 M Tris-HCl, pH 10.8, containing 25 mM betaine. Sample from insoluble fraction were then homogenized in 5 M guanidine buffer and analyzed by ELISA for levels of human Aβ1-x and Aβ1-42.³⁴

qRT-PCR

For quantitative fluorogenic RT-PCR, total RNA was isolated from frozen brain tissues with an RNA shredder and RNeasy Mini kits (74104; Qiagen, Valencia, CA, USA) and stabilized in RNA later buffer (76104; Qiagen). RT reactions containing 120 ng of total RNA were treated with RNase-free DNase (AM2222; Invitrogen, Ambion) for 30 min at 37 °C and each reaction was reverse transcribed with random hexamers and oligo(dT) primers. Diluted reactions were analyzed with SYBR green PCR reagents and a sequence detector (Rotor-gene 6000, Corbett Research, Qiagen). Mouse XBP1s, EphB2, GluN1, or Kal7 mRNA levels were normalized to GAPDH (forward 5'-TGTCCTGCTGGATCTGAC-3' and reverse 5'-CCTGCTTCACACCTTCTTG-3') or topoisomerase 2 (forward 5'-TGCCTCCATCACACTACAGG-3' and reverse 5'-CGCTGGTACATTCTCATCAGG-3'). The slope of standard curves, control reactions without RT, and dissociation curves of products indicated adequate PCR quality. The following primers were used to evaluate the levels of various mouse genes: for mEphB2 forward 5'-TTCATGGAGA ACGATCTCTG-3' and reverse 5'-GACTGTGAAGTGAACGCCCATCG-3'; for mKal7 (ref. 35) forward 5'-GATACCATATCCATTGCCTCCAGGACC-3' and reverse 5'-CCAGGCTGCGCGCGCGTAAACGTAAG-3'; for mGluN1 forward 5'-TGTCATCCCAAATGACAGGA-3' and reverse 5'-GGGTTCTTGGTGGATT GTC-3'; for mXBP1s forward 5'-AGCTTTTACGGGAGAGAAACTCA-3' and reverse 5'-GCCTGCACCTGCTGCG-3'.

Generation of Kal7 and EphB2 promoter constructs

To clone rat *EphB2* promoter, 100 ng of rat cortex genomic DNA (<http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/sprague-dawley-rat>) were extracted by using the kit QIAamp DNA mini kit (51304; Qiagen) and added to a high fidelity PCR reaction mix (Promega, Madison, WI, USA) with the forward primer 5'-CTAGCTAGCCTGCTGGGTG GTTCTCATAGG-3' containing *NheI* restriction site (underlined) and the reverse primer 5'-CCGCTCGAGCATTGATACGCTGCCGGAG-3' containing a *XhoI* restriction site (underlined). The 1203 nucleotides long amplicon (corresponding to a rat *EphB2* DNA fragment immediately upstream the translation initiation codon of the reference sequence NM_001127319.1, gene ID: 313633 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/313633>) has been cloned between the *NheI* and *XhoI* sites of the pGL3 basic vector (containing the sequence coding for luciferase) (E1751; Promega). We used the same strategy to clone rat Kal7 promoter C³⁵ (100 ng of rat cortex genomic DNA) with the forward primer: 5'-CTAGCTAGCCTTCCACGTGG AAAGGTGTG-3' containing a *NheI* restriction site (underlined) and the reverse primer: 5'-CCGCTCGAGCATCCACCCTGAACATCATCTTC-3' containing *XhoI* restriction site (underlined). We generated a 1213 nucleotides long fragment containing the promoter C of rat Kal7 and corresponding to a

DNA fragment immediately upstream of the translation initiation codon of the reference sequence AF230644.1, gene ID: 84009 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/84009>). The DNA fragment was inserted between the *NheI* and *XhoI* sites of the pGL3 basic vector. All the constructs were verified by sequencing.

Luciferase assay

A β oligomers toxicity assay. SH-SY5Y human neuroblastoma cells (ATCC, CLR-2266) (5–7 day *in vitro*) were transfected using lipofectamine (Invitrogen) with 2.0 μ g of the proximal promoter region of rat *Kal7* or *EphB2* subcloned into the pGL3 basic vector (Promega) according to the manufacturer's instructions or empty pGL3 vector as control. Twenty-four hours later, cells were treated with CHO-derived A β oligomers or vehicle for indicated times and analyzed for luciferase activity by using a luciferase assay system (E1500; Promega).

Transcription activity assay. SH-SY5Y human neuroblastoma cells (5–7 day *in vitro*) were cotransfected using lipofectamine (Invitrogen) with 1.0 μ g of the proximal promoter region of *Kal7* or *EphB2* subcloned into the pGL3 reporter vector with FUGW vector encoding XBP1s or empty FUGW control vector. PCR was carried out to amplify the XBP1s target sequence inserted within a pcDNA3 vector backbone and driven by a cytomegalo virus promoter as previously described.³² The pcDNA3-XBP1s was a generous gift from Dr Ling Qi laboratory (Michigan Medical School). Then, the PCR-amplified sequence encoding XBP1s mouse gene was inserted between the *NotI* sites of the FUGW vector backbone.³¹ Within FUGW vector, the XBP1s sequence is driven by a cytomegalo virus promoter.

Cells were analyzed for luciferase activity 24 h later by using a luciferase assay system (E1500; Promega).

Electrophysiology

Mice injected with lentiviral particles were anesthetized with isoflurane and then decapitated. Brains were quickly removed and placed in ice-cold solution containing (in mM) 2.5 KCl, 1.25 NaPO₄, 10 MgSO₄, 0.5 CaCl₂, 26 NaHCO₃, 11 glucose and 234 sucrose (pH, ~7.4; 305 mOsmol). Acute sagittal slices (350 μ m thick) were cut with a vibratome (VT 1000S; Leica Microsystems, Bannockburn, IL, USA) and transferred for recovery to a holding chamber containing oxygenated artificial cerebrospinal fluid consisting of 211 mM sucrose, 3.3 mM KCl, 1.3 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 26 mM NaHCO₃ and 11 mM glucose. Hippocampal slices 124 mM NaCl, 3.3 mM KCl, 1.3 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.5 mM MgCl₂, 26 mM NaHCO₃ and 11 mM glucose (290 mOsmol; gassed with 95% O₂-5% CO₂, pH ~7.4) at 28–30 °C for 30 min before recording. Individual slices were transferred to a submerged recording chamber, where they were maintained at 30 °C and perfused with artificial cerebrospinal fluid at a rate of 1–2 ml min⁻¹. No recordings were made on slices > 5 h after dissection. To record fEPSPs, a monopolar electrode was placed in the Schaffer collaterals, and stimulation was applied at 0.066 Hz (every 20 s) with stimulus intensity ranging from 5 to 100 μ A, yielding evoked fEPSPs of 0.2–0.5 V. The recording electrode was placed in the stratum radiatum and fEPSPs recorded with a borosilicate micropipette filled with artificial cerebrospinal fluid. Baseline was recorded for a minimum of 30 min or until stable. LTP was induced by stimulation with 100 Hz with three trains of a 1-s tetanus separated by 20 s. Signals were amplified with an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Union City, CA, USA) digitized by a Digidata 1322A interface (Axon Instruments, Molecular Devices) and sampled at 10 kHz. Recordings were acquired using Clampex (Molecular Devices) and analyzed with Clampfit (Molecular Devices). The initial fEPSP slope in mV ms⁻¹ was determined by the software. All experiments were performed by an experimenter blind to treatment or genotype groups. Data on slices from each mouse were averaged, so that measurement on animals and not slices are considered biological replicates.

MWM

For MWM tests and subsequent analyses with AnyMaze software (Stoelting, Wood Dale, IL, USA), experimenters were blinded to the genotype and treatment of mice. Each experiment was replicated one time with two separate cohorts with 1-month interval between tests. The MWM consisted of a pool (90-cm diameter) filled with water (21 $\pm$ 1 °C) made opaque with nontoxic white tempera paint powder; the pool was located in a room surrounded by distinct extra-maze cues. Before hidden-platform training, mice were given four pre-training trials in which they had to swim in a rectangular channel and mount a platform hidden 1.5 cm below the

surface in the middle of the channel. Mice that did not mount the platform were gently guided to it and were allowed to sit on it for 10 sec before being removed by the experimenter. The maximum time allowed per trial in this task was 90 s. The day after pre-training, mice were trained in the circular water maze. For hidden-platform training, the platform (4 cm radius) was submerged 1.0 cm below the surface. The platform location remained the same throughout hidden-platform training, but the drop location varied semi-randomly between trials. Mice received four trials with 15-min intertrial interval per day for 5 consecutive days. The maximum time allowed per trial in this task was 60 s. If a mouse did not find the platform, it was guided to it and allowed to sit on it for 15 s. A probe trial was performed 72 h after training. The platform was removed and mice were allowed to swim for 60 s. The drop location for probe trials was 180° from where the platform was located during hidden-platform training. After a probe trial, mice were allowed to rest for 1 day before visible platform training was performed. In the latter task, the platform location was marked with a visible cue (10 cm tall black-painted pole) placed on top of the platform. Mice received four training trials in one day. The maximum time allowed per trial in this task was 60 s. For each trial, the platform was moved to a new location, and the drop location varied semi-randomly between trials.

Blind coding and statistical analyses

Investigators who obtained data were blinded to the disease state of human samples and to the genotype and treatment of mice and cell cultures. Sample sizes were chosen on the basis of pilot experiments and our experience with similar experiments. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism, R (R Development Core Team), or Statistica (Statsoft, Round Rock, TX, USA). Normal distribution of the data was verified with Shapiro-Wilk's test. Differences between two groups were estimated by two-sided Mann-Whitney test. Differences between more than two groups were assessed by Kruskal-Wallis test. Pairwise comparisons were performed using a Mann-Whitney test with false discovery rate correction or a Nemenyi test. Differences between groups during the learning phase of the MWM test were assessed by repeated measures two-way analysis of variance, followed by Tukey's *post hoc* test. For analysis of variance tests, data were log10-transformed in order to respect homoscedasticity assumptions as assessed by Levene test. When appropriate, univariate Mann-Whitney test was used to test the groups' performances versus chance. Error bars represent s.e.m. Null hypotheses were rejected at the 0.05 level. Statistical significances are represented by the following *P*-values in all figures: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

RESULTS

XBP1s ameliorates synaptic plasticity and memory in 3 $\times$ Tg-AD mice

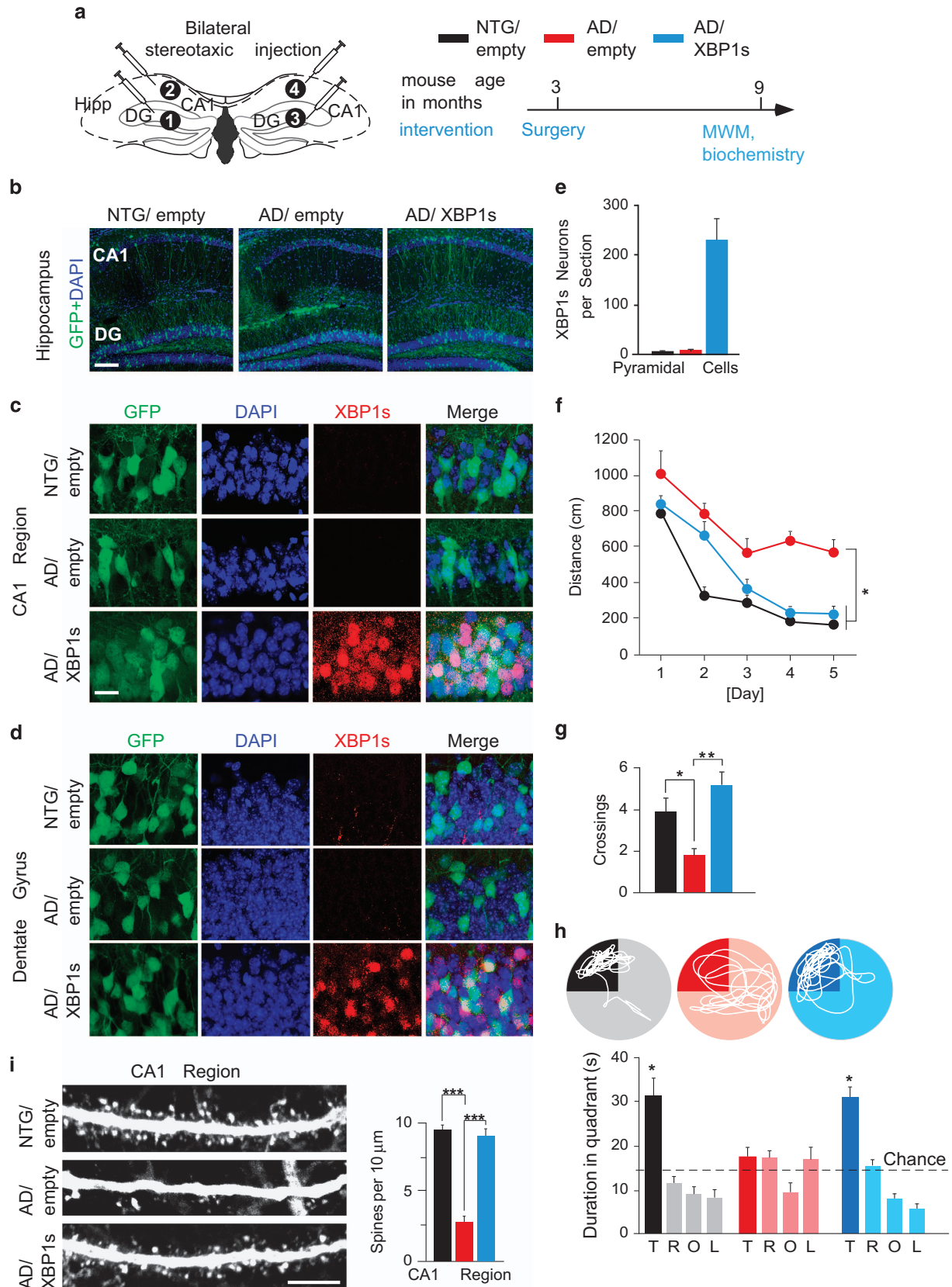
To determine whether XBP1s ameliorates memory function, we bilaterally injected viral particles expressing XBP1s into the hippocampus of a triple transgenic mouse model of AD (3xTg-AD,²¹ referred to as AD hereafter) (Figure 1a). Comparable levels of GFP transduction were observed throughout the hippocampus across all groups (60–75% of neurons were transduced in CA1 region and DG) (Figure 1b and Supplementary Figure 1a–e). Further, XBP1s was highly expressed in neuronal nuclei in CA1 region and DG of AD/XBP1s mice (Figure 1c–e and Supplementary Figure 1f). However, endogenous XBP1s was undetectable in NTG/empty and AD/empty mice, at least by immunohistochemistry, indicating that XBP1s is expressed at very low levels in basal conditions.

Next, we examined whether XBP1s affects spatial learning and memory in the MWM. Remarkably, NTG/empty and AD/XBP1s displayed a normal learning behavior, whereas AD/empty mice showed poor learning performances (Figure 1f). Similarly, in a probe trial, only AD/empty mice did not remember the platform location (Figure 1g) and did not show a persistent memory for the target quadrant (Figure 1h). Overall, AD/XBP1s and NTG/empty mice had comparable learning curves and performed equally well during a probe trial, suggesting that XBP1s ameliorates spatial learning and memory in AD mice. Body weight and swim speeds during the probe trial were comparable among all groups (Supplementary Figure 1g, h). Moreover, all groups performed equally well in the cued MWM (Supplementary Figure 1i),

indicating that learning deficits were not caused by impairments in vision or motor function.

Because neuronal communication and synapses underlie brain activity and as synaptic spines are dynamic structures that

regulate neuronal plasticity, we next assessed whether XBP1s ameliorates spatial learning through a positive regulation of spine density. We found that spine density along individual dendrites of CA1 pyramidal neurons was markedly increased in AD/XBP1s and



comparable to that of NTG/empty mice. In contrast, AD/empty mice showed a decrease in number of spines (Figure 1i). Thus, expressing XBP1s prevents spine loss in AD mice. Taken together, these data indicate that changes in spine density elicited by XBP1s might underlie the facilitated synaptic plasticity and normal spatial learning behavior of AD mice expressing XBP1s.

Opposite effects of XBP1s and A β oligomers on Kal7 signaling

Rho-GEF Kal7 has a major role in the regulation of synapse formation, maturation and maintenance through Rac1 signaling.^{24,25,36,37} To gain further insight into the mechanisms by which XBP1s ameliorates neuronal plasticity and memory, we examined XBP1s capacity to modulate Kal7 in neuronal systems. We found that XBP1s significantly increased Kal7 promoter activity in SH-SY5Y cells (Figure 2a), and mRNA and protein levels in primary neurons (Figure 2b, c), suggesting that XBP1s transcriptionally regulates Kal7 *in vitro*.

Evidence suggests that abnormal Kal7 expression may contribute to AD pathogenesis,^{38,39} although a direct causal link between A β oligomers (A β os) levels, the alteration of the Kal7 pathway, reduction in spine density and memory deficits has not yet been established. This prompted us to examine hippocampal levels of Kal7 in 3xTg-AD mice. We found that protein and mRNA levels of Kal7 and its activator EphB2⁴⁰ were significantly and similarly reduced in AD mice (Figure 2d, e and Supplementary Figure 2). Active Rac1, a downstream molecular mediator of Kal7 signaling, but not total Rac1, was concomitantly reduced (Figure 2f). Similar alterations of the Kal7/Rac1 cascade were observed, starting at 6 months of age, in the hippocampus of CRND8 mice (Supplementary Figure 3a–h), a distinct AD model that displays an overload of A β peptides by expressing amyloid precursor protein bearing two familial AD mutations.²⁰ Together, these results suggest that alterations of the Kal7/Rac1 pathway occur in distinct AD models through mechanisms likely associated to A β os neurotoxicity.

To test this possibility, we exposed hippocampal primary neuronal cultures to CHO cells-conditioned medium that contains A β os²² (Supplementary Figure 4) and assessed the effects on Kal7 signaling. One hour treatment with A β os, but not vehicle, reduced protein expressions (Figure 2g) and transcripts (Figure 2h) of Kal7 and EphB2, but not GluN1, with a subsequent decrease in active Rac1 levels (Figure 2g). Furthermore, A β os inhibited by 50% activities of EphB2 (Figure 2i) or Kal7 (Figure 2j) promoter. These results identify A β os as the likely culprit for alterations of the Kal7/Rac1 pathway observed in AD models.

Kal7 pathway is impaired in patients with AD

To examine the relevance of these findings in humans, we compared Kal7 and EphB2 abundance in post-mortem brain samples from patients with Braak and Braak stages V–VI of non-familial AD with samples from healthy control brains. Levels of both proteins were significantly reduced in hippocampal DG and CA1 region in AD cases (Figure 3a–i). In addition, hippocampal samples from AD cases showed a similar decrease in active Rac1

levels (Figure 3j–l). Thus, our data support the notion that alterations of the Kal7/Rac1 pathway underlie synaptic deficits and cognitive decline in AD pathogenesis.

Knockdown of Kal7 levels impairs memory function in naive mice
Next, we sought to determine pathophysiological consequences of reduced Kal7 levels in the hippocampus. To this end, we modulated Kal7 levels in naive mice by generating lentiviral particles carrying shRNAs directed against Kal7 (shKal7)³⁵ or EphB2 (shEphB2),³³ and a scrambled sequence (shSCR) as control. We separately injected or co-administered these viral particles bilaterally into CA1 region and DG of naive mice (Figure 4a). We observed similar GFP transduction efficiencies in CA1 region and DG across all groups (Supplementary Figure 5a–e). Further comparative analysis showed a selective twofold reduction in Kal7 and/or EphB2 mRNA (Figure 4b) and protein (Supplementary Figure 6) levels in shKal7, shEphB2 and shKal7/shEphB2 mice relative to shSCR control mice.

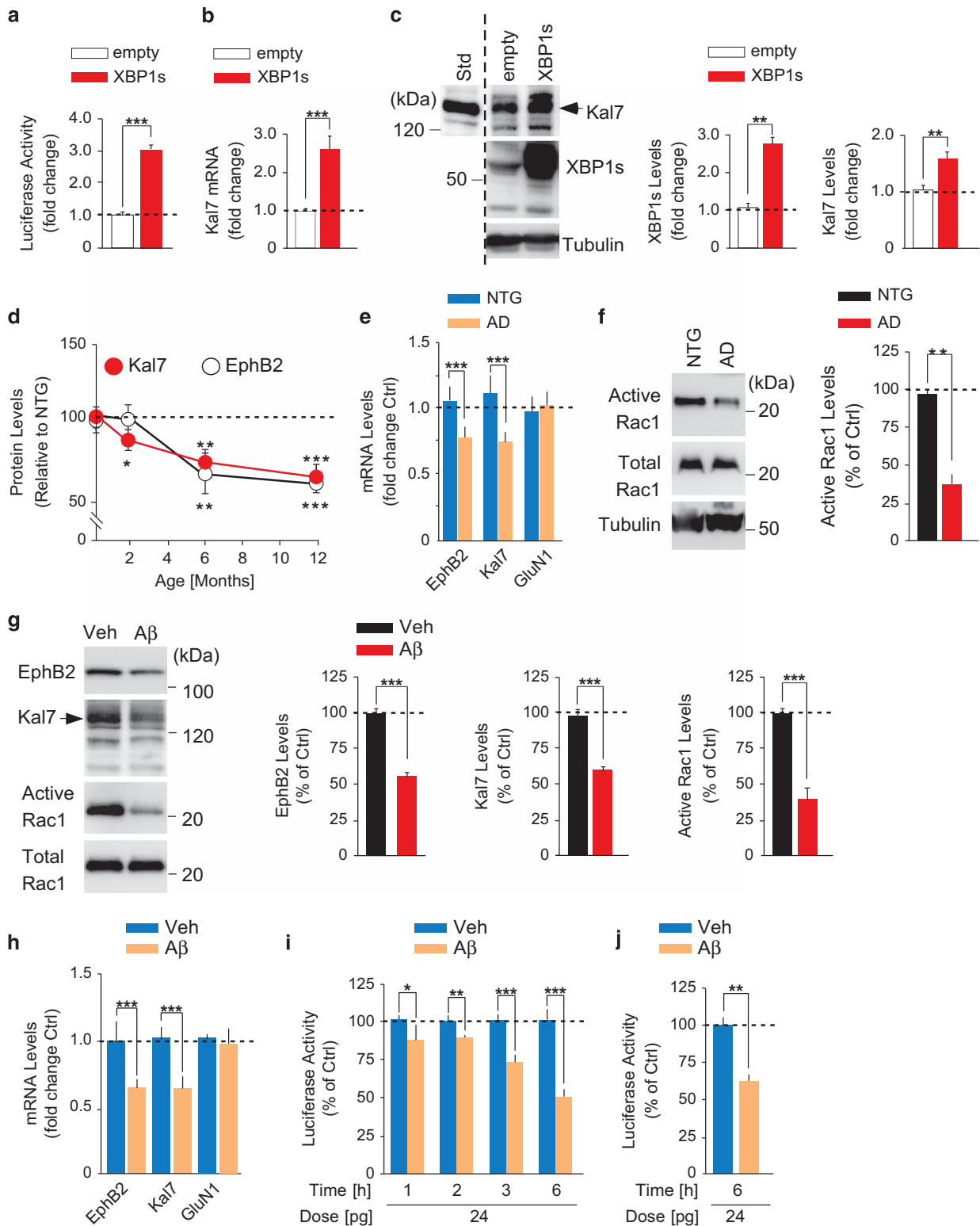
Because Kal7 has an essential role in spinogenesis,⁴¹ we measured spine density in CA1 region of the hippocampus. We found a significant decrease of spine numbers in the *stratum radiatum* of shKal7 and shEphB2 mice relative to shSCR control mice (Figure 4c). Notably, the density of dendritic spines was not decreased further in shKal7/shEphB2 mice, demonstrating that EphB2 and Kal7 act along the same pathway as previously reported.⁴⁰ Together, these results reveal that knockdown of Kal7 or EphB2 *per se* is sufficient to reduce spine density. We next assessed synaptic plasticity by measures of LTP at Schaffer collaterals to CA1 pyramidal cells. A robust LTP was induced and sustained in shSCR, but not in shKal7, shEphB2 or shKal7/shEphB2 mice (Figure 4d). Basal synaptic transmission was not altered by reduction in Kal7, EphB2 or both (Supplementary Figure 5f). Thus, depletion of endogenous Kal7 and/or EphB2 impairs synaptic plasticity through a reduction in spine density.

We evaluated the functional impact of Kal7 or EphB2 knockdown on hippocampus-dependent memory formation in the MWM. shSCR mice traveled shorter distances to reach the platform location (Figure 4e) and showed reduced escape latencies (Supplementary Figure 4a) relative to shKal7, shEphB2 or shKal7/shEphB2 mice. Likewise, only shSCR mice remembered the platform location (Figure 4f and Supplementary Figure 7b, c) and showed a persistent memory for the target quadrant (Figure 4g) during a probe trial. Visible platform training revealed no altered visual or sensorimotor function (Supplementary Figure 7d). Body weight and swim speed during a probe trial were comparable across all groups (Supplementary Figure 7e, f). Altogether, our data suggest that a reduction of Kal7 expression alters synaptic transmission and thereby impairs hippocampal-dependent spatial memory.

XBP1s ameliorates memory function through Kal7 in 3xTg-AD mice

On the basis of the well-established functional interaction between EphB2 and Kal7,^{40,42} we asked whether XBP1s prevents

Figure 1. Expressing XBP1s in the hippocampus rescues cognitive function in 3xTg-AD mice. (a) Left, stereotaxic injection of lentiviral vectors into the hippocampus of 3xTg-AD (AD) and nontransgenic (NTG) control mice. Right, timeline of Morris water maze (MWM) test and subsequent biochemical analysis of mice. (b) Representative immunofluorescence (IF) images showing GFP-positive cells (green) and DAPI staining (blue). Scale bar, 100 μ m. (c, d) Representative IF images showing XBP1s expression in CA1 region (c) and DG (d) at high magnification. Scale bar, 20 μ m. (e) Quantitation of XBP1s expression by IF in the CA1 region. (f) Spatial learning curves in the MWM showing distance traveled to reach the hidden platform ($n = 8$ mice per group). Kruskal–Wallis test on day 1: $H = 5.066$, $P > 0.05$; Kruskal–Wallis test on day 5: $H = 10.6082$, $P < 0.001$. Mann–Whitney *post hoc* test: AD/empty versus all other groups on Day 5, $*P < 0.05$. (g) A probe trial showing crossings of the platform location. Kruskal–Wallis test: $H = 10.2162$, $P < 0.001$. Mann–Whitney *post hoc* test. (h) A probe trial showing time spent per quadrant in the MWM (T, target; R, right; O, opposite; L, left). Univariate Mann–Whitney test (versus chance): NTG/empty, $U = 21$, $P < 0.05$; AD/empty, $U = 11$, $P > 0.05$; AD/XBP1s, $U = 21$, $P < 0.05$. (i) Spine density in CA1 region (Number of slices per mouse/number of mice: 5/7 per group). Kruskal–Wallis test: $H = 40.5554$, $P < 0.001$. Nemenyi *post hoc* test. Scale bar, 10 μ m. All values are mean $\pm$ s.e.m.



Aβ₂₅₋₃₅-induced spine loss and cognitive deficits through EphB2/Kal7 signaling. To answer this question, we first determined if increasing EphB2 levels *per se* in the hippocampus rescues cognitive function in 3xTg-AD mice as it did in the J20-hAPP line.³³ To this end, we generated lentiviral particles which significantly increased EphB2, its tyrosine phosphorylated active form pYephB2, and active Rac1 levels in primary neurons

(Supplementary Figure 8). We injected these viral particles into the hippocampus of 3xTg-AD (AD) and NTG control mice (Supplementary Figure 9a). Protein and mRNA levels of EphB2 were reduced in AD/empty mice and increased in AD/EphB2 mice relative to NTG/empty mice (Supplementary Figure 9b–e). More importantly, expression of EphB2 in AD mice restored Kal7 protein (Supplementary Figure 10a, b) and transcripts (Supplementary

Figure 2. XBP1s and A β differently affect Kalirin-7 signaling. **(a)** Luciferase activity of SH-SY5Y human neuroblastoma cells cotransfected with Kalirin-7 (Kal7) promoter and XBP1s or empty vector. Mann–Whitney test: $U = -3.4879$, $P < 0.001$. **(b, c)** Kal7 mRNA **(b)** and protein **(c)** levels in hippocampal primary neuronal cultures infected with viral particles expressing XBP1s or no transgene product (empty). Mann–Whitney test: Kal7 mRNA: $U = -3.182$, $P < 0.001$; XBP1s levels: $U = -2.8823$, $P < 0.01$; Kal7 levels: $U = -2.7222$, $P < 0.01$. **(d)** Western blot analysis revealed the timecourse of Kal7 and EphB2 expression in the hippocampus of 3xTg-AD (AD) and nontransgenic (NTG) mice ($n = 9–11$ mice per group). **(e)** qRT-PCR results showing mRNA levels of Kal7, EphB2 and GluN1 in the hippocampus of 6-month-old AD and NTG mice ($n = 9–11$ mice per group). Mann–Whitney test: EphB2: $U = -3.0253$, $P < 0.001$; Kal7: $U = -3.2205$, $P < 0.001$; GluN1: $U = 0.488$, $P > 0.05$. **(f)** Representative western blot images and quantification of total and active Rac1 levels in the hippocampus of 6-month-old AD and NTG mice ($n = 8–12$ mice per group). Mann–Whitney test: $U = -3$, $P < 0.01$. **(g)** Representative western blot images and quantification of EphB2, Kal7, active Rac1 levels in primary neurons exposed to A β or vehicle (veh). Mann–Whitney test: EphB2: $U = 2.8924$, $P < 0.001$; Kal7: $U = 2.8824$, $P < 0.001$; active Rac1: $U = -3.0027$, $P < 0.001$. **(h)** qRT-PCR results showing mRNA levels of EphB2, Kal7 and GluN1 in hippocampal primary neuronal cultures exposed to A β or vehicle (veh). Mann–Whitney test: EphB2: $U = -2.8868$, $P < 0.001$; Kal7: $U = -3.1044$, $P < 0.001$; GluN1: $U = -0.2312$, $P > 0.05$. **(i, j)** Luciferase activity of SH-SY5Y cells transfected with EphB2 **(i)** or Kal7 promoter **(j)**, and treated with CHO cells-derived A β or vehicle (veh) for indicated times. Mann–Whitney test: EphB2 promoter 1 h, $U = 2.2517$, $P < 0.05$; EphB2 promoter 2 h, $U = 2.9581$, $P < 0.01$; EphB2 promoter 3 h, $U = 3.5762$, $P < 0.001$; EphB2 promoter 6 h, $U = 3.5762$, $P < 0.001$; Kal7 promoter, $U = 2.8823$, $P < 0.01$. For all experiments, $n = 12$ wells per condition from at least five independent experiments. All values are mean $\pm$ s.e.m.

Figure 10c) to levels comparable to NTG/empty mice. EphB2-mediated rescue was further evidenced by normal levels of active Rac1 (Supplementary Figure 10d) and dendritic spines in CA1 region (Supplementary Figure 10e, f) and DG (Supplementary Figure 10g, h) in AD/EphB2 mice. There was no difference in spine numbers between NTG/empty and NTG/EphB2 mice, which might indicate a ceiling effect. Consistent with these findings, normalization of spine density by EphB2 resulted in improved synaptic plasticity. Indeed, we found that LTP was impaired in AD/empty mice, but undistinguishable between NTG/empty, NTG/EphB2 and AD/EphB2 mice (Supplementary Figure 11a).

We assessed whether the facilitated synaptic plasticity mediated by EphB2 ameliorates memory function in AD mice. AD/empty mice showed severe deficits in the spatial, hidden-platform component of the MWM, whereas AD/EphB2 mice were protected and performed at NTG/empty control levels (Supplementary Figure 11b). Notably, EphB2 expression did not affect learning in NTG mice. In a probe trial, NTG/empty, NTG/EphB2 and AD/EphB2 mice performed better than AD/empty mice in several outcome measures (Supplementary Figure 11c–e). These results strongly suggest that EphB2 prevents memory deficits in AD mice by restoring Kal7 signaling and further demonstrate that beneficial effects exerted by EphB2 in the J20-hAPP line³³ extend to another transgenic mouse model of AD.

To further characterize XBP1s, we examined protein and mRNA levels in 3xTg-AD, CRND8 and in human brains. At the mRNA level, we observed an increase of XBP1s within 3 months of age in CRND8 and 3xTg-AD mice relative to controls (Supplementary Figure 12a, b). Interestingly, XBP1s mRNAs were reduced to normal levels by 8 months of age. This suggests that a compensatory mechanism might be triggered early during the course of the pathology by A β neurotoxicity, but not sustained over time. This hypothesis is supported by experiments showing an increase of XBP1s mRNA in primary neurons acutely treated with exogenous A β (Supplementary Figure 12c) and a recent study demonstrating a transient increase with a subsequent decrease of XBP1s in an age-dependent manner in distinct AD models.⁴³ Meanwhile, we failed to detect endogenous XBP1s protein at either 3- or 8 months of age in CRND8 mice or in AD patients (Supplementary Figure 13). However, XBP1s was previously shown to be altered in AD brains.⁴³

As both XBP1s and EphB2 regulate synaptic plasticity and memory function and control Kal7 function in mice, we next assessed whether Kal7 is the main mediator of XBP1s beneficial effects, with EphB2 acting as an intermediate signaling molecule in this cascade. We reasoned that if both EphB2 and Kal7 are downstream effectors of a process initiated by XBP1s to rescue neuronal function, knockdown of endogenous Kal7 or EphB2 would equally reduce or block the neuroprotective effects exerted by XBP1s in AD mice. To test this hypothesis, we designed and

tested two different shRNA sequences directed against Kal7 in primary neuronal cultures and chose the most efficient at selectively reducing Kal7 levels for stereotaxic injection (not shown). We co-delivered viral particles expressing no gene product or XBP1s and GFP in combination with shKal7, shEphB2³³ or shSCR into hippocampal CA1 region and DG (Figure 5a) in mice. Number of neurons expressing GFP was comparable in the pyramidal (Figure 5b) and granule cell (Supplementary Figure 14a–c) layers across all groups. Further, XBP1s was efficiently and selectively expressed in these hippocampal regions (Supplementary Figure 14d–e) as assessed by western blot (Supplementary Figure 15) and immunohistochemistry (Supplementary Figure 16), with transcripts of XBP1s and Kal7, but not EphB2 or GluN1, significantly increased in XBP1s-injected mice (Supplementary Figure 17a–d). As expected, EphB2 was significantly reduced in shEphB2-injected mice. However, levels of Kal7 transcripts were comparable between AD/empty/shSCR and AD/XBP1s/shKal7 mice. This likely reflects the opposite effects elicited by XBP1s and shKal7 on Kal7 transcripts.

Further analysis revealed substantially restored dendritic spine numbers in CA1 region (Figure 5c, d) and DG (Supplementary Figure 17e, f) in AD/shSCR/XBP1s mice. Similarly, deficits in LTP were ameliorated in these mice (Figure 5e, f). Strikingly, these rescues were blocked by knockdown of endogenous Kal7, but not EphB2. These data indicate that unlike EphB2, Kal7 is a major downstream mediator of XBP1s-dependent control of synaptic plasticity.

Because AD-related synaptic and cognitive deficits appear to be closely related to A β os, it is important to determine whether XBP1s, in addition to positively regulate Kal7 function, affects A β levels as well. AD mice expressing XBP1s showed a marked decrease in A β levels in the hippocampus (Supplementary Figure 18a). At analysis, hAPP mice were 8–9-months old and had not yet formed plaques (not shown), excluding potential effects of XBP1s on plaque formation by sequestering soluble circulating forms of A β . This suggests that XBP1s might likely affects A β levels by reducing its formation or promoting its clearance. However, XBP1s-injected mice had similar levels of hAPP C-terminal fragments C99 or C83 (Supplementary Figure 18b), hinting that XBP1s could promote a protease activity that degrades A β . Several proteases degrade A β , including neprilysin,^{44–47} insulin-degrading enzyme,^{46,47} endothelin-converting enzyme⁴⁸ and cathepsin B.⁴⁹ We also examined Somatostatin, a neuropeptide that was shown to indirectly modulate A β levels through Neprilysin.⁵⁰ Alterations in the activities of these proteases or Somatostatin could have profound effects on A β accumulation and AD. Therefore we examined these proteases at the mRNA level in the hippocampus of XBP1-injected mice and found no significant differences relative to control mice (Supplementary Figure 18c).

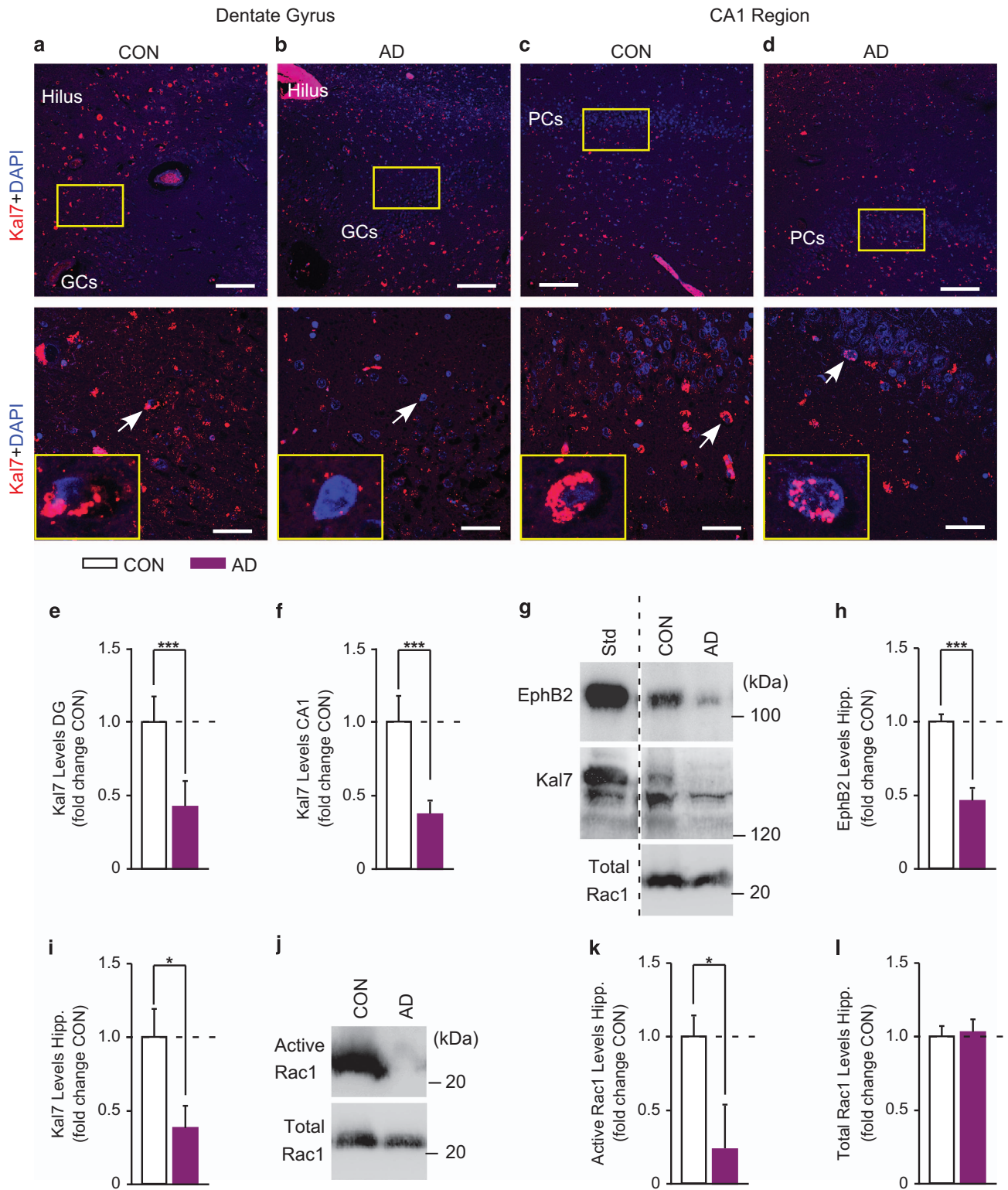
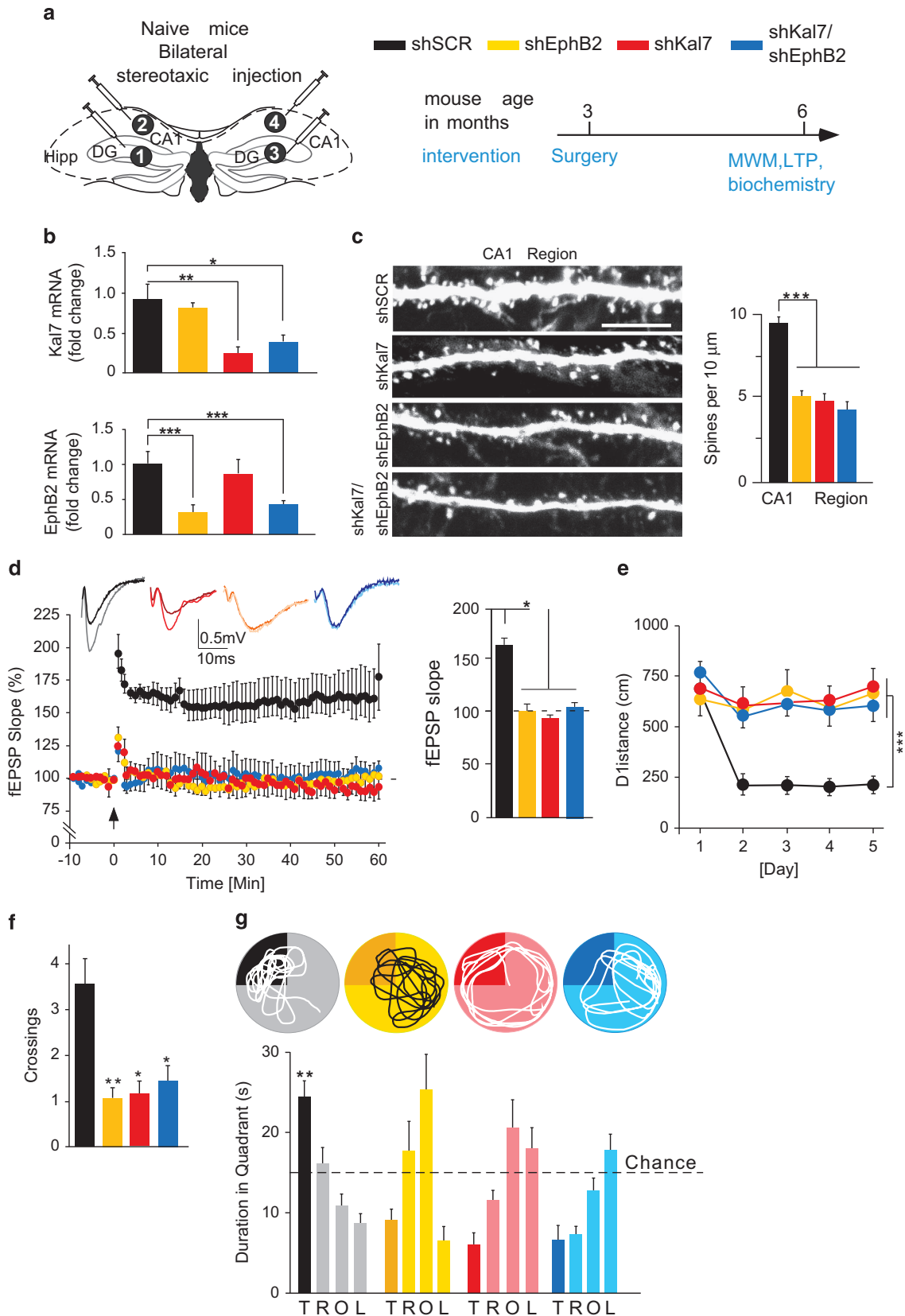


Figure 3. Kalirin-7 levels are reduced in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease. (a–d) Representative immunohistochemical images depicting cytoplasmic Kalirin-7 (Kal7) in neurons of hippocampal dentate gyrus (DG) (a, b) and CA1 region (c, d) from patients with Braak and Braak (BB) stages V–VI ($n = 12$) compared with healthy BB0 control brains (CON, $n = 5$). Scale bar: 100 μm (upper images), 20 μm (lower images). PCs, pyramidal cells; GCs, granule cells. (e, f) Quantitative assessment of Kal7 levels in a–d. Mann–Whitney test: Kal7 levels DG: $U = -3.5529$, $P < 0.001$; Kal7 levels CA1: $U = -3.5529$, $P < 0.001$. (g–l) Western blot analysis and quantitation of EphB2 (g, h), Kal7 (g, i), active and total Rac1 (j–l) in hippocampal lysates from patients with BBV–VI ($n = 9$) compared with healthy BB0 control brains (CON, $n = 9$). Mann–Whitney test: EphB2: $U = 3.0565$, $P < 0.001$; Kal7: $U = -2.313$, $P < 0.05$; active Rac1: $U = -2.3834$, $P < 0.05$; total Rac1: $U = -0.751$, $P > 0.05$. All values are mean $\pm$ s.e.m.

Behaviorally, knockdown of Kal7, but not EphB2, prevented XBP1s-mediated rescue of spatial learning behavior in AD mice (Figure 5g and Supplementary Figure 19a). Likewise, AD/empty/

shSCR and AD/XBP1s/shKal7 mice had fewer platform area crossings (Figure 5h), and spent less time in the target quadrant during a probe trial (Figure 5i). These mice also spent more time to



reach the platform and gravitated farther from its location (Supplementary Figure 11b, c). Again, shKal7, but not shEphB2, blocked XBP1s-dependent rescue of memory function, indicating that Kal7 is essential to XBP1s-mediated rescue of neuronal plasticity and cognitive function in AD mice. Learning curves during the cued MWM, body weight and swim speeds during a probe trial were similar among all groups (Supplementary Figure 19d-g), excluding experimental biases that could confound the MWM measures.

DISCUSSION

In this study, we have uncovered a key function of XBP1s in the brain, and, we believe, showed for the first time evidence that it alleviates deficits in neuronal plasticity and memory associated with AD pathology. Notably, we have revealed that XBP1s is beneficial through the functional activation of Kal7 that leads to ameliorations of spine density, neuronal plasticity and cognitive function.

An interesting feature is that Kal7 acts as a molecular mediator for both XBP1s and EphB2 to elicit a long-lasting rescue of synaptic plasticity and memory in AD mice. EphB2 is primarily localized at central glutamatergic synapses,^{51,52} thus requiring the generation of intracellular fragments or recruitment of an additional molecular partner to mediate a transcriptional activation of Kal7 gene. Meanwhile, XBP1s was mainly detected in the nucleus of principal neurons of CA1 region and DG, consistent with previous reports indicating that XBP1s can function as a transcription factor^{53,54} and with our data showing a regulation of Kal7 gene by XBP1s. An intriguing aspect is that endogenous levels of XBP1s were barely detectable in the hippocampus even in the presence of high levels of A β os. This could be explained by *in vivo* kinetic features underlying a transient expression of the unspliced inactive form of XBP1. This notion is supported by a recent study showing that XBP1 was transiently induced across different ages and AD models.⁴³ It is also conceivable that expression of XBP1 or its activation by IRE1 α occurs under very specific circumstances, stimuli or stress that require certain type of A β os assemblies but not others. Alternatively, A β os could repress XBP1 activation and fuel a vicious circle by attenuating the neuronal response to a punctual pathological stress, which over time would overwhelm the neuronal network and compromise its integrity. This is in line with a study showing a dysregulation of XBP1 in human AD brains.⁴³ Notwithstanding A β os potential effects on XBP1s, it is remarkable that hippocampal delivery of XBP1s was accompanied by a full amelioration of several AD-related functional and anatomical deficits, including alterations in spine density, synaptic plasticity and memory. In a similar vein, the recent work by Martinez *et al.*⁵⁵ elegantly showed that expressing XBP1s in wild-type animals enhances neuronal plasticity and hippocampal-dependent memory through a mechanism involving BDNF, as assessed by multiple electrophysiological and behavior outcome measures.

A recent report suggests that XBP1 activates the non-amyloidogenic pathway through the major α -secretase ADAM10

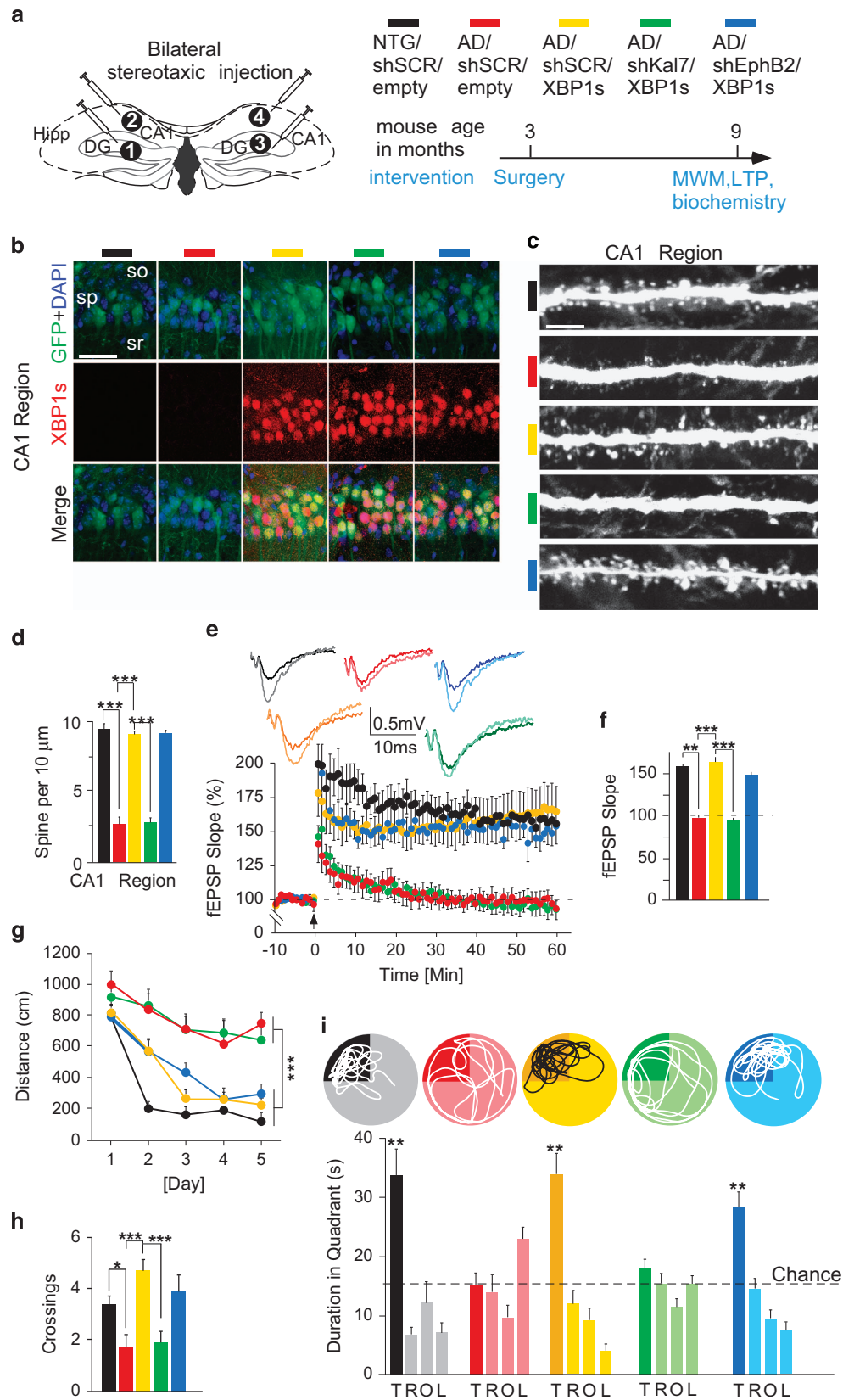
in two distinct animal models.⁴³ Indeed, an increase in ADAM10 expression/activity could reduce soluble A β levels, reduce A β plaques and additionally restore learning deficits in AD mice.⁵⁶ However, in the current study, AD mice had not yet formed plaques or developed tau pathology^{21,57} and did not differ with respect to A β levels or APP-derived fragments C83 and C99, excluding the possibility of indirect XBP1s effects, through ADAM10, on plaque load or formations of A β and APP carboxy-terminal fragments. Future studies will determine whether XBP1s regulates A β levels through alternates routes such as lysosomal pathway or modulation of β -secretase BACE1 activity/trafficking.

A β os interacts with and alters the physiological function of several proteins involved in synaptic plasticity and memory, among which α 7-nAChR nicotinic receptor,⁵⁸ cellular prion protein,⁵⁹ EphB2 kinase,³³ human LirB2⁶⁰ or Reelin.⁶¹ The current study revealed that Kal7 depletion in animal models and human AD brains is induced, at least partly, by A β os neurotoxicity. Nonetheless, it is unclear whether this effect exclusively depends on a direct interaction between A β os and Kal7 or implicates EphB2 depletion induced by A β os, which subsequently reduces Kal7 transcripts. These possibilities are not mutually exclusive.

Although we cannot rule out the possibility that other Kalirin family members might have a role in synaptic function and memory, evidence from this study suggest that Kal7 constitutes the main molecular mediator of XBP1s-dependent amelioration of cognitive function: a partial reduction of endogenous Kal7 mimicked A β os-induced hippocampal neuronal dysfunction and memory deficits; expressing XBP1s in the hippocampus restored Kal7 function and ameliorated several A β os-associated neuronal alterations in mice; and a knockdown of Kal7 completely blocked XBP1s beneficial effects on synaptic plasticity and memory. This is consistent with previous reports showing that Kal7 promotes spine formation and maturation in different model systems and is critical for hippocampal-based learning and memory.^{24,25,37} Interestingly, we showed that Kal7 is reduced in the hippocampus of human AD cases, which has been hinted at by previous studies showing a reduction at the mRNA level,^{38,39} indicating that alterations in Kal7 function might genuinely contribute to the human pathology. Local delivery of XBP1s was proved efficient as a potential therapeutic mean in several neurodegenerative diseases. Indeed, XBP1s alleviated pathologies in Parkinson's and Huntington's models,^{62,63} demonstrating that artificial engagement of XBP1s-dependent responses may have therapeutic potential to treat a variety of pathological conditions.

A β os from different sources^{64,65} have been shown to affect spine density through a myriad of signaling pathways that ultimately activate cofilin through LIMK, Rac1 and calcineurin,⁶⁴ the G(q) protein-coupled P2Y(2) nucleotide receptor,⁶⁶ murine PirB (paired immunoglobulin-like receptor B) and its human ortholog LirB2.⁶⁰ Therefore, we expect that treatment with A β os would likely activate most if not all of these different pathways. It would be interesting in future studies to determine whether XBP1s

Figure 4. Reducing Kalirin-7 levels induces synaptic and cognitive deficits in naive mice. (a) Left, bilateral stereotaxic injection of lentiviral vectors into the hippocampus of naive mice. Right, timeline of Morris water maze (MWM) test and subsequent biochemical analysis of mice. (b) qRT-PCR analysis of EphB2 and Kal7 transcripts in the whole hippocampus ($n=5-6$ mice per group). Kruskal-Wallis test: EphB2: $H=14.4855$, $P<0.001$; Kal7: $H=14.3666$, $P<0.001$. Mann-Whitney *post hoc* test. (c) Spine density in CA1 region (Number of slice per mouse/number of mice: 5/7 per group). Kruskal-Wallis test: $H=50.0822$, $P<0.001$. Nemenyi *post hoc* test. Scale bar, 10 μ m. (d) Field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) slopes in CA1 region ($n=3-4$ slices per mouse from 6-7 mice per group). Kruskal-Wallis test: $H=9.5095$, $P<0.05$. Mann-Whitney *post hoc* test on the last 10 min of data. (e) Spatial learning curves in the MWM showing distance traveled to reach the hidden platform ($n=12$ mice per group). Repeated measures two-way ANOVA: $F_{12,176}=4.09$, $P<0.001$. Tukey HSD *post hoc* test: shSCR versus all other groups on Day 5, $***P<0.001$. (f) A probe trial showing number of platform location crossings. Kruskal-Wallis test: $H=12.7346$, $P<0.001$. Mann-Whitney *post hoc* test: NTG/shSCR versus all other groups, $*P<0.05$; $**P<0.01$. (g) A probe trial showing the time spent per quadrant (T, target quadrant; R, right; O, opposite; L, left of target). Univariate Mann-Whitney test (versus chance): $U=65$, $P<0.01$. All values are mean $\pm$ s.e.m.



beneficial effects are specifically controlled by a cofilin-mediated regulation.

In conclusion, we propose a model (Supplementary Figure 19h) in which XBP1s protects against A β s-induced pathology and

pinpoint Ka7 as a key molecular mediator of these beneficial effects. This uncovers a potential new strategy for therapeutic intervention of human conditions associated with memory impairment.

Figure 5. Depletion of Kalirin-7, but not EphB2, abolishes XBP1s-associated rescue of synaptic plasticity and memory in 3xTg-AD mice. **(a)** Left, stereotaxic injection of lentiviral vectors into the hippocampus of 3xTg-AD (AD) and nontransgenic (NTG) control mice. Right, timeline of Morris water maze (MWM) test and subsequent biochemical analysis of mice. **(b)** Immunofluorescence images depicting GFP-positive cells with DAPI and XBP1s stainings in CA1 region. Scale bar, 20 μ m. **(c, d)** Spine density in CA1 region (number of slice per mouse/number of mice: 5/7 per group). Kruskal–Wallis test: $H=74.2712$, $P<0.001$. Nemenyi *post hoc* test. Scale bar, 10 μ m. **(e, f)** Field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) slopes and average slopes of fEPSP during the last 10 min in CA1 region ($n=2$ –3 slices per mouse from 6–7 mice per group). Kruskal–Wallis test: $H=25.6637$, $P<0.001$. Mann–Whitney *post hoc* test on the last 10 min of data. **(g)** Spatial learning curves in the MWM showing distances traveled to reach the hidden-platform location ($n=12$ mice per group). Repeated measures two-way ANOVA: $F_{16,220}=4.385$, $P<0.001$. Tukey HSD *post hoc* test on day 5: NTG/shSCR/empty, AD/shSCR/XBP1s, AD/shEphB2/XBP1s versus AD/shSCR/empty, AD/shKal7/XBP1s, *** $P<0.001$. **(h)** A Probe trial showing platform location crossings. Kruskal–Wallis test: $H=21.114$, $P<0.001$. Mann–Whitney *post hoc* test. **(i)** A Probe trial showing the time spent per quadrant (T, target quadrant; R, right; O, opposite; L, left of target). Univariate Mann–Whitney test (versus chance); NTG/shSCR: $U=75$, $P<0.01$; AD/XBP1s: $U=78$, $P<0.01$; AD/XBP1s/shEphB2: $U=78$, $P<0.01$. All values are mean $\pm$ s.e.m.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank BA Eipper for providing antibodies and vectors encoding Kal7, P Frazer and P St George-Hyslop for providing CRND8 mice, F Brau for assistance with confocal microscopy, N Robakis for providing vector encoding EphB2 receptor, Paris GIE Neuro-CEB and Lille NeuroBank for human tissues, Ephy-Science for electrophysiology recordings, L Qi for providing vector encoding XBP1s, F Aguila for preparation of graphics. This work was supported by the LABEX (Laboratory of Excellence, investment for the future program) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to AD), by FHU OncoAge, by 'Conseil Départemental des Alpes Maritimes', and by a grant from France Alzheimer's Association.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MC designed the research. MC, ED, JD, CD, XM, YG and IL performed experiments. TL helped design behavioral tests and conducted statistical analysis. All authors provided comments on the manuscript. MC and FC wrote and edited the paper. MC and FC supervised the project.

REFERENCES

- Busquets-Garcia A, Gomis-Gonzalez M, Guegan T, Agustin-Pavon C, Pastor A, Mato S et al. Targeting the endocannabinoid system in the treatment of fragile X syndrome. *Nat Med* 2013; **19**: 603–607.
- Mukai J, Dhilla A, Drew LJ, Stark KL, Cao L, MacDermott AB et al. Palmitoylation-dependent neurodevelopmental deficits in a mouse model of 22q11 microdeletion. *Nat Neurosci* 2008; **11**: 1302–1310.
- Hayashi-Takagi A, Takaki M, Graziane N, Seshadri S, Murdoch H, Dunlop AJ et al. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nat Neurosci* 2010; **13**: 327–332.
- Jimenez-Mateos EM, Engel T, Merino-Serrais P, McKiernan RC, Tanaka K, Mouri G et al. Silencing microRNA-134 produces neuroprotective and prolonged seizure-suppressive effects. *Nat Med* 2012; **18**: 1087–1094.
- Wei W, Nguyen LN, Kessels HW, Hagiwara H, Sisodia S, Malinow R. Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat Neurosci* 2010; **13**: 190–196.
- Zhou YD, Lee S, Jin Z, Wright M, Smith SE, Anderson MP. Arrested maturation of excitatory synapses in autosomal dominant lateral temporal lobe epilepsy. *Nat Med* 2009; **15**: 1208–1214.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006; **368**: 387–403.
- Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, DeKosky ST, Mufson EJ. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Neurology* 2007; **68**: 1501–1508.
- Um JW, Kaufman AC, Kostylev M, Heiss JK, Stagi M, Takahashi H et al. Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer abeta oligomer bound to cellular prion protein. *Neuron* 2013; **79**: 887–902.
- Mairet-Coello G, Courchet J, Pieraut S, Courchet V, Maximov A, Polleux F. The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of Abeta oligomers through Tau phosphorylation. *Neuron* 2013; **78**: 94–108.
- Li S, Jin M, Zhang D, Yang T, Koeglsparger T, Fu H et al. Environmental novelty activates beta2-adrenergic signaling to prevent the impairment of hippocampal LTP by Abeta oligomers. *Neuron* 2013; **77**: 929–941.

- Segal M. Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2005; **6**: 277–284.
- Chen Y, Rex CS, Rice CJ, Dube CM, Gall CM, Lynch G et al. Correlated memory defects and hippocampal dendritic spine loss after acute stress involve corticotropin-releasing hormone signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 13123–13128.
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001; **107**: 881–891.
- Hetz C, Mollereau B. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2014; **15**: 233–249.
- Paschen W, Yatsiv I, Shoham S, Shohami E. Brain trauma induces X-box protein 1 processing indicative of activation of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *J Neurochem* 2004; **88**: 983–992.
- Hayashi A, Kasahara T, Iwamoto K, Ishiwata M, Kametani M, Kakiuchi C et al. The role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced XBP1 splicing during brain development. *J Biol Chem* 2007; **282**: 34525–34534.
- Sutton MA, Schuman EM. Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. *J Neurobiol* 2005; **64**: 116–131.
- Mandela P, Ma XM. Kalirin, a key player in synapse formation, is implicated in human diseases. *Neural Plast* 2012; **2012**: 728161.
- Chishti MA, Yang DS, Janus C, Phinney AL, Horne P, Pearson J et al. Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J Biol Chem* 2001; **276**: 21562–21570.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 2003; **39**: 409–421.
- Guillot-Sestier MV, Sunyach C, Druon C, Scarzello S, Checler F. The alpha-secretase-derived N-terminal product of cellular prion, N1, displays neuroprotective function in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2009; **284**: 35973–35986.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 2002; **416**: 535–539.
- Ma XM, Kiraly DD, Gaier ED, Wang Y, Kim EJ, Levine ES et al. Kalirin-7 is required for synaptic structure and function. *J Neurosci* 2008; **28**: 12368–12382.
- Ma XM, Wang Y, Ferraro F, Mains RE, Eipper BA. Kalirin-7 is an essential component of both shaft and spine excitatory synapses in hippocampal interneurons. *J Neurosci* 2008; **28**: 711–724.
- Penzes P, Johnson RC, Alam MR, Kambampati V, Mains RE, Eipper BA. An isoform of kalirin, a brain-specific GDP/GTP exchange factor, is enriched in the post-synaptic density fraction. *J Biol Chem* 2000; **275**: 6395–6403.
- Xin X, Wang Y, Ma XM, Rompolas P, Keutmann HT, Mains RE et al. Regulation of Kalirin by Cdk5. *J Cell Sci* 2008; **121**: 2601–2611.
- Kiraly DD, Lemtiri-Chlieh F, Levine ES, Mains RE, Eipper BA. Kalirin binds the NR2B subunit of the NMDA receptor, altering its synaptic localization and function. *J Neurosci* 2011; **31**: 12554–12565.
- Hirata-Fukae C, Li HF, Hoe HS, Gray AJ, Minami SS, Hamada K et al. Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain Res* 2008; **1216**: 92–103.
- Clinton LK, Billings LM, Green KN, Caccamo A, Ngo J, Oddo S et al. Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiol Dis* 2007; **28**: 76–82.
- Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 2002; **295**: 868–872.
- Duplan E, Giaime E, Viotti J, Sevalle J, Corti O, Brice A et al. ER-stress-associated functional link between Parkin and DJ-1 via a transcriptional cascade involving the tumor suppressor p53 and the spliced X-box binding protein XBP-1. *J Cell Sci* 2013; **126**: 2124–2133.

- 33 Cisse M, Halabisky B, Harris J, Devidze N, Dubal DB, Sun B *et al*. Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model. *Nature* 2011; **469**: 47–52.
- 34 Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bauer C, Brigham E, Abraham JD, Rinaldi S *et al*. The beta-secretase-derived C-terminal fragment of betaAPP, C99, but not Abeta, is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J Neurosci* 2012; **32**: 16243–16255a.
- 35 Mains RE, Kiraly DD, Eipper-Mains JE, Ma XM, Eipper BA. Kalrn promoter usage and isoform expression respond to chronic cocaine exposure. *BMC Neurosci* 2011; **12**: 20.
- 36 Penzes P, Johnson RC, Sattler R, Zhang X, Huganir RL, Kambampati V *et al*. The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis. *Neuron* 2001; **29**: 229–242.
- 37 Xie Z, Srivastava DP, Photowala H, Kai L, Cahill ME, Woolfrey KM *et al*. Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines. *Neuron* 2007; **56**: 640–656.
- 38 Youn H, Jeoung M, Koo Y, Ji H, Markesbery WR, Ji I *et al*. Kalirin is under-expressed in Alzheimer's disease hippocampus. *J Alzheimers Dis* 2007; **11**: 385–397.
- 39 Murray PS, Kirkwood CM, Gray MC, Ikonomic MD, Paljug WR, Abrahamson EE *et al*. beta-Amyloid 42/40 ratio and kalirin expression in Alzheimer disease with psychosis. *Neurobiol Aging* 2012; **33**: 2807–2816.
- 40 Penzes P, Beeser A, Chernoff J, Schiller MR, Eipper BA, Mains RE *et al*. Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron* 2003; **37**: 263–274.
- 41 Ma XM, Huang J, Wang Y, Eipper BA, Mains RE. Kalirin, a multifunctional Rho guanine nucleotide exchange factor, is necessary for maintenance of hippocampal pyramidal neuron dendrites and dendritic spines. *J Neurosci* 2003; **23**: 10593–10603.
- 42 Murata Y, Constantine-Paton M. Postsynaptic density scaffold SAP102 regulates cortical synapse development through EphB and PAK signaling pathway. *J Neurosci* 2013; **33**: 5040–5052.
- 43 Reinhardt S, Schuck F, Grosen S, Riemenschneider M, Hartmann T, Postina R *et al*. Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB J* 2014; **28**: 978–997.
- 44 Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP *et al*. Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 2001; **292**: 1550–1552.
- 45 Shirotani K, Tsubuki S, Iwata N, Takaki Y, Harigaya W, Maruyama K *et al*. Neprilysin degrades both amyloid beta peptides 1–40 and 1–42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *J Biol Chem* 2001; **276**: 21895–21901.
- 46 Leissring MA, Farris W, Chang AY, Walsh DM, Wu X, Sun X *et al*. Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 2003; **40**: 1087–1093.
- 47 Caccamo A, Oddo S, Sugarman MC, Akbari Y, LaFerla FM. Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders. *Neurobiol Aging* 2005; **26**: 645–654.
- 48 Choi DS, Wang D, Yu GQ, Zhu G, Kharazia VN, Paredes JP *et al*. PKCepsilon increases endothelin converting enzyme activity and reduces amyloid plaque pathology in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 8215–8220.
- 49 Mueller-Stainer S, Zhou Y, Arai H, Roberson ED, Sun B, Chen J *et al*. Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron* 2006; **51**: 703–714.
- 50 Saito T, Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Takano J, Huang SM *et al*. Somatostatin regulates brain amyloid beta peptide Abeta42 through modulation of proteolytic degradation. *Nat Med* 2005; **11**: 434–439.
- 51 Nolt MJ, Lin Y, Hruska M, Murphy J, Sheffler-Colins SI, Kayser MS *et al*. EphB controls NMDA receptor function and synaptic targeting in a subunit-specific manner. *J Neurosci* 2011; **31**: 5353–5364.
- 52 Kayser MS, McClelland AC, Hughes EG, Dalva MB. Intracellular and trans-synaptic regulation of glutamatergic synaptogenesis by EphB receptors. *J Neurosci* 2006; **26**: 12152–12164.
- 53 He Y, Sun S, Sha H, Liu Z, Yang L, Xue Z *et al*. Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor. *Gene Expr* 2010; **15**: 13–25.
- 54 Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha. *Physiol Rev* 2011; **91**: 1219–1243.
- 55 Martinez G, Vidal RL, Mardones P, Serrano FG, Ardiles AO, Wirth C *et al*. Regulation of Memory Formation by the Transcription Factor XBP1. *Cell Rep* 2016; **14**: 1382–1394.
- 56 Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E *et al*. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 2004; **113**: 1456–1464.
- 57 Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2003; **24**: 1063–1070.
- 58 Dineley KT, Bell KA, Bui D, Sweatt JD. beta -Amyloid peptide activates alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors expressed in Xenopus oocytes. *J Biol Chem* 2002; **277**: 25056–25061.
- 59 Lauren J, Gimbel DA, Nygaard HB, Gilbert JW, Strittmatter SM. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* 2009; **457**: 1128–1132.
- 60 Kim T, Vidal GS, Djuricic M, William CM, Birnbaum ME, Garcia KC *et al*. Human LILRB2 is a beta-amyloid receptor and its murine homolog PirB regulates synaptic plasticity in an Alzheimer's model. *Science* 2013; **341**: 1399–1404.
- 61 Pujadas L, Rossi D, Andres R, Teixeira CM, Serra-Vidal B, Parcerisas A *et al*. Reelin delays amyloid-beta fibril formation and rescues cognitive deficits in a model of Alzheimer's disease. *Nat Commun* 2014; **5**: 3443.
- 62 Valdes P, Mercado G, Vidal RL, Molina C, Parsons G, Court FA *et al*. Control of dopaminergic neuron survival by the unfolded protein response transcription factor XBP1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; **111**: 6804–6809.
- 63 Zuleta A, Vidal RL, Armentano D, Parsons G, Hetz C. AAV-mediated delivery of the transcription factor XBP1s into the striatum reduces mutant Huntingtin aggregation in a mouse model of Huntington's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **420**: 558–563.
- 64 Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci* 2007; **27**: 2866–2875.
- 65 Heredia L, Helguera P, de Olmos S, Kedikian G, Sola Vigo F, LaFerla F *et al*. Phosphorylation of actin-depolymerizing factor/cofilin by LIM-kinase mediates amyloid beta-induced degeneration: a potential mechanism of neuronal dystrophy in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2006; **26**: 6533–6542.
- 66 Peterson TS, Camden JM, Wang Y, Seye CI, Wood WG, Sun GY *et al*. P2Y2 nucleotide receptor-mediated responses in brain cells. *Mol Neurobiol* 2010; **41**: 356–366.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

© The Author(s) 2016

Supplementary Information accompanies the paper on the Molecular Psychiatry website (<http://www.nature.com/mp>)

VI. Discussion

L'agrégation protéique pathologique et non pathologique

Les défauts de repliement, d'agrégation et d'accumulation protéique sont des événements communs à de nombreuses pathologies et en particulier aux maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, de Parkinson, ALS, de Huntington, maladies à Prion) (**Chiti F. et al., 2006**). Ces différentes démences, plus encore la maladie d'Alzheimer, sont fortement corrélées au vieillissement, bien que la biologie à l'œuvre derrière cette corrélation reste souvent spéculative (**Kikis et al., 2010 ; Lott I. T., 2001**). D'autre part, de nombreuses études réalisées depuis les deux dernières décennies ont également relevé une diminution normale de l'ensemble des mécanismes liés à la protéostasie dans les différents tissus de l'organisme, y compris le cerveau (**Douglas P. M. et al., 2010 ; Ben-Zvi A et al., 2009 ; Naidoo N., 2009 ; Taylor R. C. et al., 2011 ; Carrard G. et al., 2002**). L'activité des chaperonnes, du protéasome, du contrôle de la traduction ainsi que du transport des protéines natives sont autant de fonctions négativement affectées par le vieillissement. En échos à ces altérations, l'agrégation et l'accumulation protéique au cours de l'âge sont des phénomènes observés dans de nombreuses espèces, y compris en l'absence de processus pathologiques (**Kikis et al., 2010 ; David D. C. et al., 2010**). Cependant, il est difficile d'affirmer si ce sont les agrégations protéiques qui sont responsables de la diminution des mécanismes de la protéostasie, ou s'il s'agit de l'inverse. Des travaux ont montré que la suppression génétique de protéines sensibles à l'agrégation augmente l'espérance de vie chez certaines espèces comme *C. elegans*, suggérant un rôle premier de ces agrégats dans la dégénérescence cellulaire due au vieillissement (**David D. C. et al., 2010 ; Alavez S. et al., 2011**).

Ces observations plus fondamentales sur les processus du vieillissement rappellent certaines caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Différents rapports ont révélé la présence de peptides et de plaques amyloïde- β dans le cerveaux de personnes ne présentant pas les

symptômes associés à la pathologie, suggérant que la présence d'agrégats protéiques est une résultante du vieillissement avant tout (**Nordberg A., 2008 ; Villemagne V. L., 2008**). De la même façon, les thérapies visant à réduire la quantité de peptide amyloïde- β dans le cerveau des patients touchés par la maladie ont échoué à supprimer définitivement les symptômes de la démence (**Karran E., 2011**). Pourtant, les formes familiales, qui sont les formes les plus sévères et précoces de la maladie d'Alzheimer sont toutes liées à une augmentation de l'accumulation du peptide amyloïde- β , en affectant les gènes de l'APP ou des présénilines (**Price D. L., 1998**). De nombreux modèles animaux exhibant plusieurs symptômes et lésions associés à la maladie sont également générés via la production exacerbée de peptide amyloïde- β (**Price D. L., 1998 ; Webster S. J. et al., 2014**). Une première réponse à cette dichotomie apparente entre l'accumulation de peptide amyloïde- β pathologique ou non pathologique apparaît dans le niveau d'agrégation ainsi que dans la localisation du peptide. En effet, les formes oligomériques du peptide amyloïde- β sont extrêmement délétères en comparaison aux fibrilles ou aux plaques, qui sont avancées comme un moyen de séquestration des espèces les plus toxiques. Ces oligomères peuvent être capturés par les neurones et infiltrer différents compartiments cellulaires, perturbant les processus nécessaires à leur fonction, dont ceux associés à la protéostasie. Les oligomères précipitent alors le déclin de certains mécanismes déjà diminués par le vieillissement, provoquant finalement la dégénérescence et l'apoptose.

Un système UPR submergé et pro-apoptotique

En réponse au stress protéique exacerbé par la prolifération des oligomères de peptides amyloïde- β la cellule engage l'UPR, un système de régulation actif dans le cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer (**Scheper W. et al., 2015**). Cette réponse dispose de nombreux outils cellulaires pour tenter de résoudre le stress protéique, et échoue pourtant à accomplir son rôle, la dégénérescence neuronale continuant jusqu'à la mort du patient. La raison de cet échec se trouve peut-être sous un aspect évolutif. En effet, si l'on analyse l'UPR de plus près on remarque qu'il s'agit d'une réponse très inadaptée au stress aigu ou chronique : son activité basale est faible et son activation transitoire (**Ron D. et al., 2011a**).

Les variations physiologiques de la synthèse protéique (division ou différenciation cellulaire), ou les dégâts provoqués par l'oxydation courante des protéines sont absorbés par l'UPR et ses systèmes homéostatiques, mais dans le cas d'un stress protéique important, ces systèmes sont rapidement abandonnés en faveur de l'apoptose (**Ron D. et al., 2011b**). L'activation prolongée de certains membres de l'UPR dans les cerveaux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer est très certainement délétère (Perk, CHOP, Ire1, voir les sections correspondantes), alimentant le stress provoqué par les agrégats protéiques. Ces analyses biochimiques comportent cependant un biais, puisqu'elles sont réalisées de façon post-mortem, sur des cerveaux exposés à la pathologie depuis plusieurs années ; elles ne peuvent que difficilement révéler les facteurs adaptatifs mis en place au commencement de la maladie.

Ire1 et XBP-1s comme signaux de la protéostasie cellulaire

L'inaptitude de l'UPR à contrôler le stress protéique prolongé ne doit cependant pas occulter l'ensemble des mécanismes homéostatiques sous son contrôle. Bien que l'UPR soit un système complexe disposant de différentes branches parfois contradictoires, la voie Ire1-XBP-1s apparaît comme la plus prometteuse et la plus impliquée dans la survie et l'adaptation cellulaire. Une étude fondamentale a montré que l'activation de XBP-1s accroît l'espérance de vie de *C. elegans* en augmentant la résistance au stress réticulaire des individus âgés (**Henvis-Korenblit S. et al., 2009**). D'autres travaux révèlent que l'activation pharmacologique constitutive d'Ire1 augmente la prolifération cellulaire, contrairement à l'activation constitutive de Perk qui favorise l'apoptose (**Lin J. H. et al., 2009**). Au niveau neurophysio-pathologique, la modulation *in vivo* de XBP-1s dans certains modèles de maladies neurodégénératives est également récente. Les premiers résultats obtenus ont été surprenants, puisque l'invalidation conditionnelle de XBP-1s dans un modèle murin de l'ALS ou de la maladie de Huntington n'a pas aggravé les lésions des deux pathologies, mais favorisé la survie des animaux (**Vidal R. L. et al., 2012 ; Hetz C. et al., 2009**). Cet effet inattendu est très probablement provoqué par la communication étroite entre le protéasome, l'UPR et les processus autophagiques (**Matus S. et al., 2009**). En effet, la réduction de

l'activité de l'ERAD et du protéasome est associée à l'augmentation des mécanismes autophagiques, notamment via le système IRE1-TRAF2-JNK (**Matus S. et al., 2009**). Opposé à ces approches suppressives de XBP-1s, sa sur-expression virale entraîne un phénotype positif dans un modèle de la maladie de Huntington, mais aussi de maladie de Parkinson (**Zuleta A. et al., 2012 ; Sado M. et al., 2009**). Les mécanismes engagés dans cette régulation ne sont pas élucidés, mais semblent liés à l'ERAD et au protéasome.

Le protéasome : une interface entre les lésions de la maladie d'Alzheimer

La réduction notable de la dégradation protéasomique observée dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ainsi que dans différents modèles murins, joue probablement un rôle important dans le développement de la pathologie (**Keller J. N. et al., 2000 ; de Vrij F. M. S. et al., 2004 ; Tseng B. P. et al., 2008**). Cette observation est appuyée par l'accumulation d'ubiquitine mutée (UBB+1) dans les tissus cérébraux humains touchés par la maladie, qui est elle-même inhibitrice du protéasome et faiblement dégradée par celui-ci (**Fischer D. F. et al., 2003 ; van Tijn P. et al., 2007**). Des modèles murins surexprimant de façon constitutive ces formes d'ubiquitine reproduisent certaines caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, comme les altérations mémorielles et cognitives, ainsi qu'un dysfonctionnement de la régulation respiratoire courant chez les personnes affectées par la pathologie (**Fischer D. F. et al., 2009 ; Irmeler M. et al., 2012**). Un autre point critique est la dépendance de la dégradation de la protéine Tau par le protéasome, l'inhibition de ce système aggravant la cytotoxicité induite par l'agrégation de Tau dans des modèles *in vivo* de la pathologie (**Tseng B. P. et al., 2009**). Le peptide amyloïde- β pouvant perturber les différentes activités protéolytiques du protéasome, on peut alors imaginer une situation où ces deux lésions s'alimentent et entraînent des réponses cellulaires de plus en plus extrêmes et délétères, jusqu'à la mort neuronale. Il est important de souligner que l'inhibition du protéasome mène à l'induction d'une UPR altérée, où XBP-1s n'est que peu ou faiblement épissé par Ire1 (**Lee A. H. et al., 2003 ; Sado M. et al., 2009**). Cependant, la surexpression de XBP-1s par des moyens extérieurs protège efficacement de l'apoptose cellulaire induite dans ces conditions (**Sado M. et al., 2009**).

XBP-1s, un acteur majeur de la vie neuronale

XBP-1s apparaît alors comme un facteur central pouvant moduler les différents aspects moléculaires de la maladie d'Alzheimer. Les travaux réalisés au cours de ma thèse exposent une voie de compensation cellulaire limitant la production du peptide amyloïde- β via la diminution de l'activité de la β -sécrétase. Cette signalisation sous contrôle de XBP-1s empêche le peptide amyloïde- β d'augmenter sa propre production en régulant les sécrétases. L'implication du système ERAD dans cette voie s'accorde avec les précédentes études montrant que l'ubiquitine ligase HRD1 peut également réduire l'expression de l'APP ainsi que de Tau (Kaneko M. et al., 2010 ; Shen Y. X. et al., 2012). Durant la même période au laboratoire, le projet de recherche du Dr. M. Cissé a révélé que la surexpression de XBP-1s améliore la plasticité synaptique et peut pallier certains déficits cognitifs et mémoriels observés dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer. Une autre étude du Dr. Martinez G. et al. montre que XBP-1s agit comme un facteur favorisant l'expression du BDNF dans des conditions physiologiques, augmentant la formation de la mémoire hippocampique. XBP-1s agit donc sur de nombreux tableaux : il limite la production des différentes protéines agrégantes de la pathologie (Peptide amyloïde- β et Tau), active l'ERAD et certaines chaperonnes déficientes dans la maladie (PDI, Erdj, HRD1), favorise la plasticité synaptique et l'induction de facteurs de croissance neuronaux (BDNF, sAPP α). La question de sa valeur en tant que cible thérapeutique possible apparaît alors légitime.

L'UPR comme cible thérapeutique

L'UPR contrôlant de nombreux axes de régulations cellulaires, sa modulation à des fins thérapeutiques a récemment reçu beaucoup d'intérêt. Cependant, dans le cadre des maladies neurodégénératives, aucun travail définitif n'a encore été réalisé. Deux cibles de l'UPR apparaissent comme 'facilement' traitables par des méthodes pharmacologiques : Ire1 et Perk (Maly D. J. et al., 2014). ATF6 α étant plus difficile à cibler de par la nature de sa structure (Maly D. J. et al., 2014). L'axe Ire1-XBP-1s a été analysé extensivement dans le

cadre de traitements anti-cancéreux (**Koong A. C. et al., 2006**). XBP-1s stimulant plusieurs processus favorisant la division cellulaire, son activation dans les tumeurs est associée à une résistance accrue aux chimiothérapies (**Shajahan A. N. et al., 2009**). Différents travaux suggèrent que des inhibiteurs de la fonction endoribonucléase d'Ire1, et donc de l'épissage de XBP-1u, apparaîtraient comme une stratégie pharmacologique crédible (**Sanches M. et al., 2014 ; Wang L. et al., 2012 ; Wiseman R. L. et al., 2010**). Deux classes de composés sont en développement :

- Les bloqueurs de la fixation de l'ATP essentiel à l'autophosphorylation d'Ire1, ce qui permet d'empêcher les changements de conformation nécessaires à son activité endoribonucléase (**Wang L. et al., 2012**).
- Les bloqueurs directs de l'entrée des ARNs ciblés par Ire1, via une interaction avec la poche permettant leur fixation (**Sanches M. et al., 2014**).

Cette dernière classe de composés inhibant spécifiquement l'activité endoribonucléase d'Ire1 s'est montrée prometteuse contre certains myélomes, réduisant de façon notable la taille des tumeurs tout en étant bien tolérés *in vivo* (**Mimura N. et al., 2012**). D'autres résultats dans un modèle d'arthrite rhumatoïde ont aussi été plutôt positifs (**Qiu Q. et al., 2013**). De façon intéressante, les approches modulant l'activation d'Ire1 via la fixation de son ATP peuvent également produire des composés qui miment la présence de l'ATP, activant alors sa fonction kinase et donc son activité endoribonucléase (**Wang L. et al., 2012**). Ce type de drogue n'a pas encore été étudié dans le cadre de la maladie d'Alzheimer à ce jour, mais présente une perspective de premier intérêt.

Les recherches sur l'autre cible pharmacologique plausible de l'UPR, la voie Perk, ont mené à la mise au point du composé Salubrinal (**Boyce M. et al., 2005**). Le Salubrinal est capable d'inhiber la déphosphorylation de eIF2 α après l'activation de Perk, permettant de prolonger l'atténuation protéique de la traduction induite par cette signalisation. Des résultats intéressants ont montré que cette réponse prolongée pouvait être bénéfique, augmentant la résistance des cellules au stress réticulaire provoqué par certains agrégats protéiques ou par le stress oxydatif (**Boyce M. et al., 2005**). Des expériences menées dans des modèles de la maladie de Parkinson et de l'ALS se sont également montrées relativement encourageantes

(**Smith W. W. et al., 2005 ; Reijonen S. et al., 2008**). Néanmoins l'utilisation de ce composé dans le cadre de la maladie d'Alzheimer paraît moins évidente, l'activation de Perk favorisant la traduction de la β -sécrétase et limitant la potentialisation de la mémoire à long terme (**O'Connor T. et al., 2008 ; Costa-Mattioli M. et al., 2008**). De plus, l'invalidation génétique de certaines kinases ciblant eIF2 α , comme Perk ou GCN2, diminue les déficits cognitifs présents dans un modèle murin de la pathologie, suggérant que l'inhibition de Perk serait préférable à son activation (**Ma T., et al., 2013**).

D'autres composés induisant directement l'expression de différentes chaperonnes (Grp94, BiP, Calréticuline) sont également utilisés depuis plusieurs années dans le traitement de certaines pathologies. Le Valproate et le Lithium, prescrits dans le cadre de l'épilepsie ou de désordres bipolaires protègent les cellules de l'apoptose provoquée par le stress réticulaire (**Bown C. D. et al., 2002 ; Hiroi T. et al., 2006**). Le composé expérimental BiX (BiP inducer X) augmente BiP *in vitro* et *in vivo* sans déclencher de réponse UPR généralisée (**Kudo T. et al., 2008**). Le bénéfice d'une telle approche par rapport à la maladie d'Alzheimer reste à étudier, mais BiP est l'une des chaperonnes déficientes de la pathologie et se trouve au centre de nombreux processus liés à l'homéostasie protéique.

Étant donné que certains membres de l'UPR apparaissent comme des cibles thérapeutiques potentielles de la maladie d'Alzheimer, différentes interrogations concernant le rationnel de telles approches peuvent être discutées. La régulation des sécrétases, de l'APP et de Tau par l'ERAD et XBP-1s est dépendante du système UPS et donc du protéasome, mais il est clair que l'activité protéasomique est fortement diminuée dans les neurones touchés par la pathologie. Stimuler ces voies peut alors paraître voué à l'échec. Ce fait est d'autant plus renforcé par certaines observations suggérant que la réponse UPR présente dans la maladie d'Alzheimer active des processus autophagiques plutôt que protéasomique (**Nijholt D. A. T. et al., 2011**), le protéasome étant présenté comme une voie de dégradation empruntée dans des conditions physiologiques (**Nijholt D. A. T. et al., 2011**). Cependant la maladie d'Alzheimer est une neurodégénérescence progressive, qui s'étend pendant plusieurs années et n'affecte pas spontanément l'ensemble des tissus cérébraux. La stimulation des facteurs

homéostatiques de la réponse UPR, comme XBP-1s, pourrait permettre aux cellules saines voisines des cellules malades de se protéger efficacement contre le stress généré par le relargage des différents agrégats et oligomères de peptide amyloïde- β ou de Tau. Elles agiraient alors comme une barrière empêchant la progression de la maladie dans les zones encore peu affectées. En parallèle, l'induction de la formation des dendrites ainsi que l'amélioration de la plasticité synaptique par XBP-1s est une fonction probablement indépendante du protéasome, reposant sur la transcription directe d'autres facteurs comme BDNF. Ce point suggère une action bénéfique de XBP-1s y compris dans les neurones déjà touchés par la dégénérescence.

Les approches visant à réduire la quantité d'agrégats protéiques dans les cerveaux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, comme les essais de vaccins anti-amyloïde, se sont montrées mitigées avec des améliorations transitoires (**Karran E. et al., 2011**). L'une des raisons possibles à ces échecs serait la chronologie de la pathologie. Les immunothérapies étant administrées trop tardivement, certains processus pro-apoptotiques ne seraient pas réversibles. Sous un aspect plus fondamental, si la forme sporadique de la pathologie est initialement causée par un ensemble de facteurs (environnementaux ou génétiques) menant à un déclin progressif des fonctions du maintien de la protéostasie cellulaire, alors l'élimination seule des différents agrégats protéiques ne ferait que retarder une issue inévitable. Le renforcement par des moyens extérieurs des mécanismes d'homéostasie protéique, normalement transitoires, pourrait permettre aux cellules de faire pencher la balance vers des voies adaptatives plutôt qu'apoptotiques, ainsi que compenser la diminution de certaines activités physiologiques (chaperonnes, ERAD, protéasome). La maladie d'Alzheimer possédant une étiologie complexe affectant de nombreux aspects cellulaires, il est probable que le traitement d'une telle pathologie requiert également une approche plurielle visant les différents points critiques de la maladie.

Index des tables et figures

Figure 1 : Les isoformes et paralogues de l'APP.....	9
Figure 2 : Les différentes voies de catabolisme de l'APP.....	11
Figure 3 : Structure de BACE1.....	14
Figure 4 : Les différentes coupures de la partie intramembranaire de l'APP.....	17
Figure 5 : Assemblage du complexe γ-sécrétase.....	19
Figure 6 : Les étapes de contrôle de la traduction protéique du RE.....	32
Figure 7 : La glycosylation dirige l'export des protéines du RE.....	34
Figure 8 : Activation et transfert de l'ubiquitine.....	38
Figure 9 : Structure et interactions du rétro-translocon avec les complexes ERAD.....	39
Figure 10 : Activation de l'UPR sous contrôle de BiP.....	45
Figure 11 : L'activation et la régulation de Perk.....	46
Figure 12 : L'activation et la régulation d'ATF6α.....	49
Figure 13 : La fonction kinase d'Ire.....	52
Figure 14 : L'épissage atypique de XBP-1u par Ire1.....	53
Figure 15 : Modèle possible de la régulation de BACE1 par le peptide amyloïde-β.....	70
 Table 1 : Liste des récepteurs membranaires pouvant interagir avec le peptide amyloïde-β.....	 23
Table 2 : Liste des enzymes E1-E2-E3 modulées dans la maladie d'Alzheimer.....	42-43

Références

A

Acosta-Alvear D., Zhou Y., Blais A., Tsikitis M., Lents N. H., Arias C., Lennon C. J., Kluger Y., Dynlacht B. D., **XBP1 control diverse cell type and condition-specific transcriptional regulatory networks**, Mol. Cell., July 2007 Vol 27 p53-66

Ahner A., Brodsky J. L., **Checkpoints in ER-associated degradation : excuse me, which way to the proteasome ?** Trends. Cell. Biol., Sept. 2004, Vol 14 p474-478

Alavez S., Vantipalli M. C., Zucker D. J., Klang I. M., Lithgow G. J., **Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing and extend lifespan**, Nature, April 2011, Vol 14 p226-229

Alberdi E., Wyssenback A., Alberdi M., Sanchez-Gomez M. V., Cavaliere F., Rodriguez J. J., Verkhratsky A., Matute C., **Ca²⁺ dependent endoplasmic reticulum stress correlates with astrogliosis in oligomeric amyloid β -treated astrocytes and in a model of Alzheimer's disease**, Aging Cell, April 2013, Vol 12 p292-302

Almeida C. G., Takahashi R. H., Gouras G. K., **Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system**, J. Neurosci., April 2006, Vol 26 p4277-4288

Alves da Costa C., Sunyach C., Pardossi-Piquard R., Sévalle J., Vincent B., Boyer N., Kawarai T., Girardot N., St George-Hyslop P., Checler F., **Presenilin-dependent gamma-secretase mediated control of p53-associated death in Alzheimer's disease**, J. Neurosci., June 2006, Vol 23 p6377-6385

Alzheimer's Association, **2014 Alzheimer's disease facts and figures**, Alzheimer's & Dementia, March 2014, Vol 10 p42-92

Aragon T., van Anken E., Pincus D., Serafimova I. M., Korennykh A. V., Rubio C. A., Walter P., **Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites**, Nature, Feb. 2009, Vol 457 p736-739

Argon Y., Simen B. B., **GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties**, Current Op. in Immunology, Oct. 1999, Vol 10 p495-505

Arriagada P. V., Marzloff K., Hyman B. T., **Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in non-demented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease**, Neurology, Sept. 1992, Vol 42 p1681-1688

B

Bemporad F., Chiti F., **Protein misfolded oligomers : experimental approaches, mechanism of formation, and structure-toxicity relationship**, Chemistry & Biology, March 2012, Vol 19 p315-327

- Ben-Zvi A., Miller E. A., Morimoto R. I., **A collapse of proteostasis represents an early molecular event in *C. elegans* aging**, PNAS, 2009, Vol 106 p14914-14919
- Bence N. F., Sampat R. M., Kopito R. R., **Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation**, Science, May 2001, Vol 292 p1552-1555
- Benilova I., Karran E., De Strooper B., **The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease : an emperor in need of clothes**, Nat. Neurosci., Jan. 2012, Vol 15 p349-357
- Bertolotti A., Zhang Y. H., Hendershot L. M., Harding H. P., Ron D., **Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response**, Nature Cell Biol., June 2000, Vol 2 p326-332
- Bi X., Gall C. M., Zhou J. Lynch G., **Uptake and pathogenic effects of amyloid beta peptide 1-42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists**, The J. of Neurosci., 2002, Vol 112 p827-840
- Biederer T., Volkwein C., Sommer T., **Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface**, Science, Dec 1997, Vol 278 p 1806-1809
- Bitan G., Fradinger E. A., Spring S. M., Teplow D. B., **Neurotoxic protein oligomers - what you see is not always what you get**, Amyloid, June 2005, Vol 12 p88-95
- Bitan G., Kirkitadze M. D., Lomakin A., Vollers S. S., Benedek G. B., Teplow D. B., **Amyloid β -protein (A β) assembly : A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways**, PNAS, Jan. 2007, Vol 100 p330-335
- Blurton-Jones M., Laferla F. M., **Pathways by which Abeta facilitates tau pathology**, Curr. Alzheimer Res., Dec. 2006, Vol 3 p437-448
- Borchelt D. R., Thinakaran G., Eckman C. B., Lee M. K., Davenport F., Ratovitsky T., Prada C. M., Kim G., Seekins S., Yager D., Slunt H. H., Wang R., Seeger M., Levey A. I., Gandy S. E., Copeland N. G., Jenkins N. A., Price D. L., Younkin S. G., Sisodia S. S., **Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevates A β 1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo**, Neuron, Nov. 1996, Vol 17 p1005-1013
- Bordji D., Becerril-Ortega J., Nicole O., Buisson A., The journal of Neuroscience, **Activation of extrasynaptic, but not synaptic, NMDA receptors modifies amyloid precursor protein expression pattern and increases amyloid- β production**, Nov. 2010, Vol 30 p15927-42
- Bown C. D., Wang J. F., Chen B., Young T. L., **Regulation of ER stress proteins by valproate : therapeutic implications**, Bipolar disorders, April 2002, Vol 4 p145-151
- Boyce M., Bryant K. F., Jousse C., Long K., Harding H. P., Scheuner D., Kaufman R. J., Ma D., Coen D. M., Ron D., Yuan J., **A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress**, Feb. 2005, Vol 307 p935-939
- Broquet A. H., Thomas G., Masliah J., Trugnan G., Bachelet M., **Expression of the molecular chaperone Hsp70 in detergent-resistant microdomains correlates with its membrane delivery and release**, J. Biol. Chem., June 2003, Vol 278 p21601-21606

Brown M. S., Ye J., Rawson R. B., Goldstein J. L., **Regulated Intramembrane Proteolysis : A control mechanism conserved from Bacteria to Humans**, Cell, Feb. 2000, Vol 100 p391-398

Brown R. E., Wong A. A., **The influence of visual ability on learning and memory performance in 13 strains of mice**, Learn Mem., March 2007, Vol 14 p134-144.

Bu G., Cam J., Zerbinatti C., **LRP in amyloid-beta production and metabolism**, Ann. N. Y. Acad. Sci., Nov. 2006, Vol 1086 p35-53

Bukau B., Horwich A. L., **The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines**, Cell, Feb. 1998, Vol 92 p351-366

Buxbaum J. D., Liu K. N., Luo Y., Slak J., Stocking K. L., Peschon J. J., Johnson R. S., Castner B. J., Cerretti D. P., Black R. A., **Converting Enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor**, The Journal of Biological Chemistry, Oct 1998, Vol 273 p27765-67

C

Cabral C. M., Liu Y., Moremen K. W., Sifers R. N., **Organizational diversity among distinct glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation programs**, Mol. Biol. Cell., Aug. 2002, Vol 13 p2639-2650

Cacabelos R., Fernandez-Novoa L., Lombardi V., Kubota Y., Takeda M., **Molecular genetics of Alzheimer's disease and aging**, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., July 2005, Vol 27

Cacace R., Slegers K., Broeckhoven C., **Molecular genetics of early-onset Alzheimer disease revisited**, Alzheimer's & Dementia, March 2016.

Calfon M., Zeng H., Urano F., Till J. H., Hubbard S. R., Harding H. P., Clark S. G., Ron D., **IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA**, Nature, Jan. 2002, Vol 415 p92-96

Cao X. , Sudhof T. C., **A transcriptively active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60**, Science, Jul. 2001, Vol 293 p115-120

Caramelo J. J., Castro O. A., Prat-Gay G., Parodi A. J., **The endoplasmic reticulum glucosyltransferase recognize nearly native glycoprotein folding intermediates**, J. B. C., Oct. 2004, Vol 279 p46280-46285

Carrard G., Bulteau A. L., Petropoulos I., Friquet B., **Impairment of proteasome structure and function in aging**, Int. J. Biochem. Cell. Biol., Nov. 2002, Vol 34 p1461-1474

Carvalho P., Goder V., Rapoport T. A., **Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins**, Cell, July 2006, Vol 126 p361-373

Casas-Tinto S., Zhang Y., Sanchez-Garcia J., Gomez-Velazquez M., Rincon-Limas D. E., Fernandez-Funez P., **The ER stress factor XBP1s prevents amyloid-beta neurotoxicity**, Hum. Mol. Genet., June 2011, Vol 20 p2144-2160

Castillo-Carranza D. L., Zhang Y., Guerrero-Munoz M. J., Kayed R., Rincon-Limas D. E., Fernandez-Funez P., **Differential activation of the ER stress factor XBP1 by oligomeric assemblies**, Neurochem. Res., Aug. 2012, Vol 37 p1707-1717

Chami L., Checler F., **BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and β -amyloid production in Alzheimer's disease**, Mol. Neurodegen., Oct. 2012, Vol 7

Chang R. C., Wong A. K., Ng H. K., Hugon J., **Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α (eIF2 α) is associated with neuronal degeneration in Alzheimer's disease**, Neuroreport, Dec. 2002, Vol 13 p2429-2432

Chawla A., Chakrabarti S., Ghosh G., Niwa M., **Attenuation of yeast UPR is essential for survival and is mediated by IRE1 kinase**, J. C. B., March 2011, Vol 193 p41-50

Chen A., Muzzio I. A., Malleret G., Bartsch D., Verbitsky M., Pavlidis P., Yonan A. L., Vronskaya S., Grody M. B., Cepeda I., Gilliam T. C., Kandel E. R., **Inducible enhancement of memory storage and synaptic plasticity in transgenic mice expressing an inhibitor of ATF4 (CREB-2) and C/EBP proteins**, Neuron, Aug. 2003, Vol 39 p655-669

Chen H., Qi L., **SUMO modification regulates the transcriptional activity of XBP1**, Biochemical J., July 2010, Vol 429 p92-102

Chiti F., Dobson C. M., **Protein misfolding, functional amyloid, and human disease**, Annu. Rev. Biochem., 2006; Vol 75 p333-366

Chui D. H., Dobo E., Makifuchi T., Akiyama H., Kawakatsu S., Petit A., Checler F., Araki W., Takahashi K., Tabira T., **Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular Abeta42 labeling**, J. Alzheimers Dis., Apr. 2001, Vol 3 p231-239

Chung K. T., Shen Y., Hendershot L. M., **BAP, a mammalian BiP associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP**, J. Biol. Chem., 2002, Vol 277 p47557-47563

Chyung J. H., Selkoe D. J., **Inhibition of Receptor-mediated Endocytosis Demonstrates Generation of Amyloid β -Protein at the Cell Surface**, The journal of biological chemistry, Oct. 2003, Vol 278 p51035-43

Cornejo V. H., Hetz C., **The unfolded protein response in Alzheimer's disease**, Seminars in Immunopathology, April 2013, Vol 35 p277-292

Costa-Mattioli M., Gobert D., Stern E., Gamache K., Colina R., Cuello C., Sossin W., Kaufman R. J., Pelletier J., Rosenblum K., Krnjevec K., Lacaille J-C., Nader K., Sonenberg N., **eIF2 α phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short to long term synaptic plasticity and memory**, Cell, April 2007, Vol 129 p195-206

Costa-Mattioli M., Sossin W. S., Klann E., Sonenberg N., **Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory**, Neuron, Jan. 2008, Vol 61 p10-26

Cummings J., **What can be inferred from the interruption of the semagacestat trial for treatment of Alzheimer's disease ?** Biol. Psychiatry, Nov.

Cunningham T. J., Hodge L., Speicher D., Reim D., Tyler-Polsz C., Levitt P., Eagleson K., Kennedy S., Wang Y., **Identification of a survival-promoting peptide in medium conditioned by oxidatively stressed cell lines of nervous system origin**, J. Neurosci., 1998, Vol 18 p7047-7060

Cunningham T. J., Jing H., Wang Y., Hodge L., **Calreticulin binding and other biological activities of survival peptide Y:P30 including effects of systemic treatment of rats**, Exp. Neurol., 2000, Vol 163 p457-468

Cuozzo J. W., Kaiser C. A., **Competition between glutathione and protein thiols for disulphide-bond formation**, Nat. Cell Biol., July 1999, Vol 1p130-135

D

Dahlgren K. N., Manelli A. M., Stine W. B., Baker L. K., Krafft G. A., LaDu M. J., **Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability**, J. Biol. Chem., Aug. 2002, Vol 277 p32046-53

Dahms S. O., Hoefgen S., Roeser D., Schlott B., Guhrs K. H., Than M. E., **Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein**, Proc Natl Acad Sci, March 2010, Vol 107 p5381-86

David D. C., Ollikainen N., Trinidad J. C., Cary M. P., Burlingame A. L., Kenyon C., **Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in C. elegans**, PLoS Biol., Aug. 2010, Vol 8
de Vrij F. M. S., Fischer D. F., van Leeuwen F. W., Hol E. M., **Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin-proteasome system**, Prog. Neurobiol., Dec. 2004, Vol 74 p249-270

Deane R., Yan S. D., Subramanyam R. K., LaRue B., Jovanovic S., Hogg E., Welch D., Manness L., Lin C., Yu C., Zhu H., Ghiso J., Frangione B., Stern A., Schmidt A. M., Armstrong D. L., Arnold B., Liliensiek B., Nawroth P., Hofman F., Kindy M., Stern D., Zlokovic B., **RAGE mediates amyloid- β peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain**, Nature Medicine, June 2003, Vol 9 p907-913

Deibel M. A., Ehmann W. D., Markesbery W. R., **Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease : possible relation to oxidative stress**, J. Neurol. Sci., Nov. 1996, Vol 143 p137-142

Denic V., Quan E. M., Weissman J. S., **A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation**, Cell, July 2006, Vol 126 p349-359

Denzel A., Molinari M., Trigueros C., Martin J. E., Velmurgan S., Brown S., Stamp G., Owen M. J., **Early postnatal death and motor disorder in mice congenitally deficient in calnexin expression**, Mol. Cell. Biol., Nov. 2002, Vol 22 p7398-7404

Deuss M., Reiss K., Hartmann D., **Part-Time α -Secretase : The functional biology of ADAM 9, 10 and 17**, Current Alz. Research, 2016, Vol 16

Di Fede G., Catania M., Morbin M., Rossi G., Suardi S., Mazzoleni G., Merlin M., Giovagnoli A. R., Prioni S., Erbetta A., Falcone C., Gobbi M., Colombo L., Bastone A., Beeg M., Manzoni C., Francescucci B., Spagnoli A., Cantu L., Del Favero E., Levy E., Salmona M., Tagliavini F., Science, **A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis**, 2009, Vol 323 p 1473-1477

Dickson D. W., Crystal H. A., Bevona C., Honer W., Vincent I., Davies P., **Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly**, Neurobiol. Aging, June 1995, Vol 16 p298-304

Dickson D. W., Farlo J., Davies P., Crystal H., Fuld P., Yen S. H., **Alzheimer's disease. A double-labeling immunohistochemical study of senile plaques**, Am. J. Pathol., July 1988, Vol 132 p86-101

Ding L., Yan J., Zhu J., Zhong H., Lu Q., Wang Z., Huang C., Ye Q., **Ligand-independent activation of estrogen receptor alpha by XBP-1**, Nucleic Acids Res., Sept 2003, Vol 15 p5266-74

Ding W. X., Ni H. M., Gao W., Yoshimori T., Stolz D. B., Ron D., Yin X. M., **Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability**, The American J. of Pathology, Aug. 2007, Vol 171 p513-524

Dominguez D., Tournoy J., Hartmann D., Huth T., Cryns K., Deforce S., Serneels L., Camacho I. E., Marjaux E., Craessarets K., Roebroek A. J., Schwake M., D'Hooze R., Bach P., Kalinke U., Moechars D., Alzheimer C., Reiss K., Saftig P., De Strooper B., **Phenotypic and biochemical analyses of BACE1- and BACE2- deficient mice**, J. Biol. Chem., Sep. 2005, Vol 280 p30797-806

Donald J. M. M., Savva G. M., Brayne C., Welzel A. T., Forster G., Shankar G. M., Selkoe D. J., Ince P. G., Walsh D. M., **Cognitive function and ageing study : the presence of sodium dodecyl sulphate-stable A β dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia**, Brain, 2010, Vol 133 p1328-1341

Dongping L., Yang X., **p53, Oxidative stress, and aging**, Sep 2011, Antioxid Redox Signal Vol 15 p1669-1678

Dorner A. J., Wasley L. C., Kaufman R. J., **Protein dissociation from GRP78 and secretion are blocked by depletion of cellular ATP levels**, PNAS, July 1990, Vol 87 p7429-7432

Douglas P. M., Dillin A., **Protein homeostasis and aging in neurodegeneration**, J. Cell. Biol., Sept. 2010, Vol 190 p719-729

Dries D. R., Yu G., **Assembly, maturation, and trafficking of the γ -secretase complex in Alzheimer's disease**, Current Alzheimer Res., Apr. 2008, Vol 5 p132-146

Du Yan S., Zhu H., Fu J., Yan S. F., Roher A., Tourtelotte W. W., Rajavashisth T., Chen X., Godman G. C., Stern D., Schmidt A. M., **Amyloid-beta peptide-receptor for advanced glycation endproduct interaction elicits neuronal expression of macrophage-colony stimulating factor : a proinflammatory pathway in Alzheimer disease**, PNAS., May 1997, Vol 94 p5296-301

Dudek J., Pfeiffer S., Lee P. H., Jung M., Cavalié A., Helms V., Forster F., Zimmermann R., **Protein transport into the human endoplasmic reticulum**, J. Mol. Biol., March 2015, Vol 427 p1159-1175

DuRose J. B., Tam A. B., Niwa M., **Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress**, Mol. Biol. Cell., July 2006, Vol 17 p3095-3107

E

Ehehalt R., Michel B., De Pietri Tonelli D., Zacchetti D., Simons K., Keller P., **Splice variants of the beta-site APP cleaving enzyme BACE1 in human brain and pancreas**, Biochem. Biophys. Commun, April 2002, Vol 293 p30-37

Ellgaard L., Helenius A., **Quality control in the endoplasmic reticulum**, Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., March 2003, Vol 4 p181-191

Eriksson K. K., Vago R., Calanca V., Galli C., Paganetti P., Molinari M., **EDEM contributes to maintenance of protein folding efficiency and secretory capacity**, The J. of Biological Chem., Oct 2004, Vol 279 p44600-605

Ermolieff J., Loy J. A., Koelsch G., Tang J., **Proteolytic activation of recombinant pro-memapsin 2 (pro-beta-secretase) studied with new fluorogenic substrates**, Biochemistry, Oct. 2000, Vol 39 p12450-6

Esch F. S., Keim P. S., Beattie E. C., Blacher R. W., Culwell A. R., Oltersdorf T., McClure D., Ward P. J., **Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor**, Science, June 1990, Vol 248 p1122-24

Farzan M., Schnitzler C. E., Vasilieva N., Leung D., Choe H., **BACE2, a β -secretase homolog, cleaves at the β -site and within the amyloid- β region of the amyloid- β precursor protein**, PNAS, Aug. 2000, Vol 97 p9712-9717

Fawcett T. W., Martindale J. L., Guyton K. Z., Hai T., Holbrook N. J., **Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive element binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response**, Biochemical J., April 1999, Vol 339 p135-141

Ferri C. P., Prince M., Brayne C., Brodaty H., Fratiglioni L., Ganguli M., Hall K., Hasegawa K., Hendrie H., Huang Y., Jorm A., Mathers C., Menezes P. R., Rimmer E., Sczufca M., **Alzheimer's Disease International, Global prevalence of dementia : a Delphi Consensus study**, Lancet, Dec. 2005, Vol 366 p2112-2117

Fischer D. F., de Vos A. I. R., van Dijk R., de Vrij F. M. S., Proper E. A., Sonnemans M. A., Verhage M. C., Sluijs J. A., Hobo B., Zouambia M., Steur E. N. H. J., Kamphorst W., Hol E. M., van Leeuwen F. W., **Disease-specific accumulation of mutant ubiquitin as a marker for proteasomal dysfunction in the brain**, The FASEB J., Nov. 2003, Vol 17 p2014-2014

Flynn G. C., Pohl J., Flocco M. T., Rothman J. E., **Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP**, Nature, Oct. 1991, Vol 353 p726-730

Fotenos A. F., Snyder A. Z., Girton L. E., Morris J. C., Buckner R. L., **Normative estimates of cross-sectional and longitudinal brain volume decline in aging and AD**, Neurology, March

F

Frenkel Z., Gregory W., Kornfeld S., Lederkremer G. Z., **Endoplasmic reticulum-associated degradation of mammalian glycoproteins involves sugar chain trimming to Man6-5GlcNac2**, J. C. B., Sept. 2003, Vol 278 p34119-34124

Funata H., Enya M., Yoshimura M., Morishima-Kawashima M., Ihara Y., **Presence of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid β -protein dimers in the hippocampus CA1 not exhibiting neurofibrillary tangle formation**, Am. J. Pathol., July 1999, Vol 155 p23-28

Furukawa K., Sopher B. L., Rydel R. E., Begley J. G., Pham D. G., Martin G. M., Fox M., Mattson M. P., **Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of α -secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-domain**, Journal of neurochemistry, Nov. 1996, Vol 67 p1882-1896

G

Gabuzda D., Busciglio J., Chen L. B., Matsudaira P., Yankner B. A., **Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative**, J. Biol., May 1994, Vol 269 p13623-8

Gakhar K. N., Hundeshagen P., Mandi C., Weyer S. W., Alliquant B., Muller U., Ciccolini F., **Activity requires soluble amyloid precursor protein α to promote neurite outgrowth in neural stem cell-derived neurons via activation of the MAPK pathway**, Eur. J. Neurosci., Sept. 2008, Vol 28 p871-882

Galehdar Z., Swan P., Fuerth B., Callaghan S. M., Park D. S., Cregan S. P., **Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA**, J. Neurosci., Dec. 2010, Vol 30 p16938-48

Ganoza M. C., Williams C. A., **In vitro synthesis of different categories of specific protein by membrane-bound and free ribosomes**, PNAS, 1969, Vol 63 p1370-1376

Gauss R., Sommer T., Jarosch E., **The HRD1p ligase complex forms a linchpin between ER-lumenal substrate selection and Cdc48p recruitment**, EMBO, April 2004, Vol 25 p1827-1835

Gendron T. F., Petrucelli L., **The role of tau in neurodegeneration**, Mol. Neurodegener., March 2009

Glennner G. G., Wong C. W., **Alzheimer's diseases : initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein**, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, Vol 120 p885-890

Glickman M. H., Ciechanover A., **The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway : Destruction for the sake of construction**, Phys. Reviews, April 2002, Vol 82 p373-428

Goedert M., **Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease**, Ann. N. Y., Acad. Sci., Jan. 1996, Vol 17 p121-131

Gouras G. K., Tsai J., Naslund J., Edgar M., Checler F., Greenfield J. P., Haroutunian V., Buxbaum H., Greengard P., Relkin N. R., **Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain**, Am. J. Pathol., Jan. 2000, Vol 156 p15-20

Green K. N., Billings L. M., Roozendaal B., McGaugh J. L., LaFerla F. M., **Glucocorticoids Increase Amyloid- β and Tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease**, The J. of Neurosci., Aug 2006, Vol 26 p9047-9056

Grenfell S. J., Trausch-Azar J. S., Handley-Gearhart P. M., Ciechanover A., Schwartz A. L., **Nuclear localization of the ubiquitin-activating enzyme, E1, is cell-cycle dependent**, J. Biochem., 1994, Vol 300 p701-708

Grundke-Igbal I., Igbal K., George L., Tung Y. C., Kim K. S., Wisniewski H. M., **Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease**, PNAS, Apr. 1989, Vol 86 p2853-7

Gruninger-Leitch F., Schlatter D., Kung E., Nelbock P., Dobeli H., **Substrate and Inhibitor Profile of BACE (β -Secretase) and Comparison with Other Mammalian Aspartic Proteases**, The journal of biological chemistry, Feb. 2002, Vol 277 p4687-4693

Gu F., Nguyen D. T., Stuible M., Dubé N., Tremblay M. L., Chevet E., **Protein-tyrosine phosphatase 1B potentiates IRE1 signaling during endoplasmic reticulum stress**, J. Biol. Chem., Oct. 2004, Vol 279 p49689-93

Guëll-Bosch J., Montoliu-Gaya L., Esquerda-Canals G., Villegas S., **A β immunotherapy for Alzheimer's disease : where are we ?** Neurodegenerative Disease Management, June 2016, Vol 6 p179-181

Gyure K. A., Durham R., Stewart W. F., Smialek J. E., Troncoso J. C., **Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrom**, Arch. Pathol. Lab. Med., Apr. 2001, Vol 125 p489-492

H

Haass C., Hung A. Y., Shlossmacher M. G., Oltersdorf T., Teplow D. B., Selkoe D. J., **Normal cellular processing of the β -amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid β peptides and related molecules**, Ann. N. Y. Acad. Sci., Dec. 2006, Vol 695 p109-116

Haifeng J., Nobuo S., Thoshiki U., Kazuhiko W., St. George-Hyslop P., Fraser P. E., Hidehiro M., **Presenilin-1 holoprotein is an interacting partner of Sarco endoplasmic reticulum calcium ATPase and confers resistance to endoplasmic reticulum stress**, The J. of Alzheimer's Disease, 2010, Vol 20 p261-273

Hammond C., Braakman I., Helenius A., **Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control**, PNAS, Feb. 1994, Vol 91 p913-917

Hammond C., Helenius A., **Quality control in the secretory pathway : retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus**, J. Cell. Biol., July 1994a, Vol 126 p41-52

Han D., Lerner A. G., Walle L. V., Upton J. P., Xu W., Hagen A., Backes B. J., Oakes S. A., Papa F. R., **IRE1 α kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates**, Cell, Aug. 2009, Vol 138 p562-575

Haniu M., Denis P., Young Y., Mendiaz E. A., Fuller J., Hui J. O., Bennett B. D., Kahn S., Ross S., Burgess T., Katta V., Rogers G., Vassar R., Citron M., **Characterization of Alzheimer's beta-secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties**, J. Biol. Chem., Jul. 2000, Vol 275 p21099-106

Harding H. P., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M., Ron D., **Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells**, Mol. Cell., Nov. 2000, Vol 6 p1099-1108

Harding H. P., Zhang Y., Ron D., **Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase**, Nature, Jan. 1999, Vol 397 p271-274

Harding H. P., Zhang Y., Zeng H., Novoa I., Lu P. D., Calton M., Sadri N., Yun C., Popko B., Paules R., Stojdl D. F., Bell J. C., Hettmann T., Leinden J. M., Ron D., **An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress**, Mol. Cell, March 2003, Vol 11 p619-633

Hardy J. A., Higgins G. A., **Alzheimer's disease : the amyloid cascade hypothesis**, April 1992, Science, Vol 10 p184-185.

Harman D., **Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry**, Jul 1956, J. Gerontol., Vol 11 p298-300

Harountunian V., Davies P., Vianna C., Buxbaum J. D., Purohit D. P., **Tau protein abnormalities associated with the progression of alzheimer disease type dementia**, Neurobiology of Aging, Jan. 2007, Vol 28 p1-7

Hasegawa T., Ukai W., Jo D. G., Xu X., Mattson M. P., Nakagawa M., Araki W., Saito T., Yamada T., **Homocysteic acid induces intraneuronal accumulation of neurotoxic Abeta42 : implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease**, J. Neurosci. Res., June 2005, Vol 80 p869-876

Haze K., Yoshida H., Yanagi H., Yura T., Mori K., **Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress**, Mol. Biol. Cell, Nov. 1999, Vol 10 p3787-3799

Heber S., Herms J., Gajic V., Hainfellner J., Aquzzi **Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members**, A., Rulicke T., Kretschmar H., Koch C. Sisodia S. Tremml P., Lipp H. P., Wolfer D. P., Muller U., J. Neuroscience, 2000, Vol 21 p7951-63

Hebert D. N., Molinari M., **In and out of the ER : Protein folding, quality control, degradation, and related human diseases**, Physiological Reviews, Oct. 2007, Vol 87 p1377-1408

- Hebert D. N., Zhang J. X., Chen W., Foellmer B., Helenius A., **The number and location of glycans on influenza hemagglutinin dermine folding and association with calnexin and calreticulin**, J. C.B., Nov. 1997, Vol 139 p613-623
- Hébert S. S., Serneels L., Dejaegere T., Horré K., Dabrowski K., Baert V., Annaert W., Hartmann D., De Strooper B., **Coordinated and widespread expression of γ -secretase in vivo : evidence for size and molecular heterogeneity**, Neurobiology of disease, Nov. 2004, Vol 17 p260-272
- Heden T., Gabrieli J. D., **Insights into the ageing mind : a view from cognitive neuroscience**, Feb 2004, Nature review Neuroscience, Vol 5 p87-96.
- Henis-Korenblit S., Zhang P., Hansen M., McCormick M., Lee S. J., Cary M., Kenyon C., **Insulin/IGF-1 signaling mutants reprogram ER stress response regulators to promote longevity**, PNAS, Dec. 2009, Vol 107 p9730-9735
- Herreman A., Hartmann D., Annaert W., Saftig P., Craessaerts K., Serneels L., Umans L., Schijvers V., Checler F., Vanderstichele H., Baekelandt V., Dressel R., Cupers P., Huylebroeck D., Zwijsen A., Van Leuven F., De Strooper B., **Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency**, PNAS, July 1999, Vol 96 p11872-77
- Hetz C., Bernasconi P., Fisher J., Lee A. H., Bassik M. C., Antonsson B., Brandt G. S., Iwakoshi N. N., Schinzel A., Glimcher L. H., Korsmeyer S. J., **Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1 α** , Science, April 2006, Vol 312
- Hetz C., Martinon F., Rodriguez D., Glimcher L. H., **The Unfolded Protein Response: Integrating Stress Signals Through the Stress Sensor IRE1 α** , Physiological Reviews, Oct. 2011, Vol 91 p1219-1243
- Hetz C., Thielen P., Matus S., Nassif M., Court F., Kiffin R., Martinez G., Cuervo A. M., Brown R. H., Glimcher L. H., **XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy**, Genes & Dev., Sept. 2009, Vol 23 p2294-2306
- Hirao K., Natsuka Y., Tamura T., Wada I., Morito D., Natsuka S., Romero P., Tremblay L. O., Herscovics A., Nagata K., Hosokawa N., **EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming**, J. Biol. Chem., April 2006, Vol 281 p9650-9658
- Hiroi T., Wei H., Hough C., Leeds P., Chuang D. M., **Protracted lithium treatment protects against the ER stress elicited by thapsigargin in rat PC12 cells : roles of intracellular calcium, Grp78 and Bcl-2**, Pharmacogenomics J., 2005, Vol 5 p102-111
- Hitt B. D., Jaramillo T. C., Chetkovitch D. M., Vassar R., **BACE1 -/- Mice exhibit seizure activity that does not correlate with sodium channel level or axonal localization**, Mol. Neurodegener., Aug. 2010, Vol 37
- Ho A., Sudhof T. C., **Binding of F-spondin to amyloid- β precursor protein : A candidate amyloid- β precursor protein ligand that modulates amyloid- β precursor protein cleavage**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Feb 2004, Vol 8 p2548-2553

- Hoglinger G. U., Melhem N. M., Dickson D. W., Sleiman P. M. A., Wang L. S., Klei L., Rademakers R., de Silva R., Litvan I., Riley D. E., van Swieten J. C., Heutink P., Wszolek Z. K., Uitti R. J., Vandrovcsa J., Hurtig H. I., et al., **Identification of common variants influencing risk of the tauopathy progressive supranuclear palsy**, Nature genetics, May 2011, Vol 43 p699-705
- Hollien J., Lin J. H., Li H., Stevens N., Walter P., Weissman J. S., **Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells**, J. C. B., Aug. 2009, Vol 196 p323-331
- Hollien J., Weissman J. S., **Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response**, Science, July 2006, Vol 313 p104-107
- Holsinger D. R. M., Goense N., Bohorquez J., Strappe P., **Splice variants of the Alzheimer's disease beta-secretase, BACE1**, Neurogenetics, Nov. 2012, Vol 14 p1-9
- Honarnejad K., Herms J., **Presenilins : role in calcium homeostasis**, Int. J. Biochem. Cell Biol., Nov 2012, Vol 44 p1983-1986
- Hong L., Koelsch G., Lin X., Wu S., Terzyan S., Ghosh A. K., Zhang X. C., Tang J., **Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor**, Science, Oct. 2000, Vol 290 p150-153
- Hooli B. V., Mohapatra G., Mattheisen M., Parrado A., R., Roehr J., T., Shen Y., Gusella J. F., Moir R., Saunders A. J., Lange C., Tanzi R. E., Bertram L., **Role of common and rare APP DNA sequence variants in Alzheimer disease**, Journal of the American Academy of Neurology, April 2012, Vol 78 p1250-1257
- Hoozemans J. J. M., Haastert E. S., Nijholt D. A. T., Rozemuller A. J. M., Scheper W., **Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer's and Parkinson's disease**, Neurodegenerative Dis., 2012, Vol 10 p212-215
- Hoozemans J. J. M., Veerhuis R., Haastert E. S., Rozemuller J. M., Baas F., Eikelenboom P., Scheper W., **The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease**, Acta Neuropathologica, Aug. 2005, Vol 110 p165-172
- Hoozemans J. J., Haastert E. S., Nijholt D. A. T., Rozemuller J., Eikelenboom P., Scheper W., **The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus**, Acta Neuropathol., April 2009, Vol 174 p1241-1251
- Hosokawa N., Wada I., Hasegawa K., Yorihuzi T., Tremblay L. O., Herscovics A., Nagata K., **A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation**, EMBO Rep., May 2001, Vol 2 415-422
- Houen G., Duus K., Hansen P. R., **Interaction of calreticulin with amyloid beta peptide 1-42**, Protein & Peptide letters, 2008, Vol 15 p103-107
- Hsia A. Y., Masliah E., McConlogue L., YU G. Q., Tatsuno G., Hu K., Kholodenko D., Malenka R. C., Nicoll R. A., Mucke L., **Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models**, PNAS, March 1999, Vol 96 p3228-3233

Hu P., Han Z., Couvillon A. D., Kaufman R. J., Exton J. H., **Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1 α -mediated Nf-kB activation and down-regulation of TRAF2 expression**, Mol. Cell. Biol., April 2006, Vol 26 p3071-3084

Huse J. T., Liu K., Pijak D. S., Carlin D., Lee V. M. Y., Doms R. W., **β -Secretase Processing in the Trans-Golgi Network Preferentially Generates Truncated Amyloid Species That Accumulate in Alzheimer's Disease Brain**, The Journal of Biological Chemistry, Feb 2002, Vol 277 p16278-84

Hwang C., Sinskey A. J., Lodish H. F., **Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum**, Science, Sept. 1992, Vol 257

I

Ida N., Hartmann T., Pantel J., Schroder J., Zerfass R., Forstl H., Sandbrink R., Masters C. L., Beryreuther K., **Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive western blot assay**, J. Bio. Chem., 1996, Vol 271 p22908-14

Iribarren P., Zhou Y., Le Y., Wang J. M., **Role of formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1/FPR2) in mononuclear phagocyte responses in Alzheimer's disease**, Immunologic research, Apr. 2005, Vol 31 p165-176

Irmeler M., Gentier R. J., Denisseen F. J., Schulz H., Bolle I., Holter S. M., Kallnik M., Cheng J. J., Klingenspor M., Rozman J., Ehrhardt N., Hermes D. J., Gailus-Durner V., Fuchs H., de Angelis H. M., Meyer H. E., Hopkins D. A., van Leeuwen F. W., Beckers J., **Long-term proteasomal inhibition in transgenic mice by UBB(+1) expression results in dysfunction of central respiration control reminiscent of brainstem neuropathology in Alzheimer patients**, Acta Neuropathol., Aug. 2012, Vol 124 p187-197

Iwatsubo T., Hasegawa M., Ihara Y., **Neuronal and glial tau-positive inclusions in diverse neurologic diseases share common phosphorylation characteristics**, Acta Neuropathol., 1994, Vol 88 p129-136

Iwatsubo T., Odaka A., Suzuki N., Mizusawa H., Nukina ., Ihara Y., **Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals : evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)**, Neuron, July 1994, Vol 13 p45-53

Iwawaki T., Akai R., Kohno K., **Ire1 α disruption causes histological abnormality of exocrine tissues, increase blood glucose level, and decrease of serum immunoglobulin level**, PLOSone, Sept. 2010

Iwawaki T., Akai R., Yamanaka S., Kohno K., **Function of IRE1 alpha in the placenta is essential for placental development and embryonic viability**, PNAS, April 2009, Vol 106 p16657-16662

J

J. Busciglio, D. H. Gabuzda, Matudaira P., Yankner B. A., **Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells**, PNAS, March 1993, Vol 90 p2092-2096

Jarret J. T., Berger E. P., Lansbury P. T., **The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation : implication for the pathogenesis of Alzheimer's disease**, Biochemistry, May 1993, Vol 32 p4693-4697

Jiang Y., Rigoglioso A., Peterhoff C. M., Pawlik M., Sato Y., Bleiwas C., Starvrides P., Smiley J. F., Ginsberg S. D., Mathews P. M., Levy E., Nixon R. A., **Partial BACE1 reduction in a Down syndrome mouse model blocks Alzheimer-related endosomal anomalies and cholinergic neurodegeneration : role of APP-CTF**, Neurobiol. aging, March 2016, Vol 39 p90-98

Jonsson T., Atwal K. J., Steinberg S., Snaedal J., Jonsson P. V., Bjornsson S., Stefansson H., Sulem P., Gudbjartsson D., Maloney J., Hoyte K., Gustafson A. Liu Y., Lu Y., Bhangale T., Graham R. R., et al., **A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age related cognitive decline**, Nature, Aug. 2012, Vol 488 p96-99

Jungsu K., Chakrabarty P., Hanna A., March A., Dickson D. W., Borchelt D. R., Golde T., Janus C., **Normal cognition in transgenic BRI2-Ab mice**, Feb 2013, Molecular Neurodegeneration.

K

Kaether C., Schmitt S., Willem M., Haass C., **Amyloid precursor protein and Notch intracellular domains are generated transport of their precursors to the cell surface**, Traffic., Apr. 2006, Vol 7 p408-415

Kakimura J., Kitamura Y., Takata K., Umeki M., Suzuki S., Shibagaki K., Taniguchi T., Nomura Y., Gebicke-Haerter P. J., Smith M. A., Perry G., Shimohama S., **Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins**, FASEB J., Apr. 2002, Vol 16 p601-603

Kakimura J., Kitamura Y., Taniguchi T., Shimohama S., Gebicke-Haerter P. J., **BiP/GRP78-induced production of cytokines and uptakes of amyloid-beta(1-42) peptide in microglia**, Biochem. Biophys., Res., Commun., Feb. 2001, Vol 281 p6-10

Kaneko H., Kakita A., Kasuga K., Nozaki H., Ishikawa A., Miyashita A., Kuwano R., Ito G., Iwatsubo T., Takahashi H., Nishizawa M., Onodera O., Sisodia S. S., Ikeushi T., **Enhanced accumulation of phosphorylated alpha-synuclein and elevated beta-amyloid 42/40 ratio caused by expression of the presenilin-1 T440 mutant associated with familial Lewy body disease and variant Alzheimer's disease**, J. Neurosci., Nov. 2007, Vol 27 p13902-7

Kaneko M., Koike H., Saito R., Kitamura Y., Okuma Y., Nomura Y., **Loss of HRD1-Mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid- β generation**, J. Neurosci., March 2010, Vol 30 p3924-3932

Kaneko M., Nomura Y., **ER signaling in unfolded protein response**, Life Sci., Dec. 2003, Vol 74 p199-205

Kaneko M., Saito R., Okuma Y., Nomura Y., **Possible involvement of ubiquitin ligase HRD1 insolubilization in Amyloid β generation**, Biol. Pharm. Bull., Feb. 2012, Vol 35 p269-272

- Kapoor M., Srinivas H., Kandiah E., Gemma E., Ellgaard L., Oscarson S., Helenius A., Surolia A., **Interaction of substrate with calreticulin, an endoplasmic reticulum chaperone**, J. B. C., Feb. 2003, Vol 278 p6194-6200
- Karran E., Mercken M., De Strooper B., **The amyloid cascade hypotheses for Alzheimer's disease : an appraisal for the development of therapeutics**, Sept. 2011, Nature Review drug discovery, Vol 10 p698-712.
- Kassenbrock C. K., Kelly R. B., **Interaction of heavy chain binding protein (BiP/GRP78) with adenine nucleotides**, EMBO J., 1989, Vol 8 p1461-1467
- Katayama T., Imaizumi K., Sato N., Miyoshi K., Kudo K., Hitomi J., Morihara T., Yoneda T., Gomi F., Mori Y., Nakano Y., Takeda J., Tsuda T., Itoyama Y., Murayama O., Takashima A., St. George-Hyslop P., Takeda M., Tohyama M., **Presenilin-1 mutations downregulate the signaling pathway of the unfolded protein response**, Nature Cell Biology, Oct. 1999, Vol 1 p479-485
- Kaufman R. J., **Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum : coordination of gene transcriptional and translation controls**, Genes & Dev., 1999, Vol 13 p1211-1233
- Keller J. N., Nanni K. B., Markesbery W. R., **Impaired proteasome function in Alzheimer's disease**, J. Neurochem., Jul. 2000, Vol 75 p436-439
- Kikis E. A., Gidalevitz T., Morimoto R. I., **Protein homeostasis in models of aging and age-related conformational disease**, Adv. Exp. Med. Biol., 2010, Vol 694 p138-159
- Kim H. S., Kim E. M., Lee J. P., Park C. H., Kim S., Seo J. H., Chang K. A., Yu E., Jeong S. J., Chong Y. H., Suh Y. H., **C-terminal fragments of amyloid precursor protein exert neurotoxicity by inducing glycogen synthase kinase-3 β expression**, FASEB J., Oct. 2003, Vol 17 p1951-1953
- Kim S., Sato Y., Mohan P. S., Peterhoff C., Pensalfini A., Rigoglioso A., Jiang Y., Nixon R. A., **Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP- β CTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer's disease**, Molecular psychiatry, July 2015, Vol 21 p707-716
- Kimata Y., Ishiwata-Kimata Y., Ito T., Hirata A., Suzuki T., Oikawa D., Takeuchi M., Kohno K., **Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins**, J. C. B., Oct. 2007, Vol 179 p75-86
- Kimata Y., Oikawa D., Shimizu Y., Ishiwata-Kimata Y., Kohno K., **A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1**, J. C. B., Nov. 2004, Vol 167 p445-456
- Koch C. S., Zheng H., Chen H., Trumbauer M., Thinakaran G., Ploegh L. H., Price D. L., Sisodia S., **Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice**, Neurobiol. Aging, 1997, Vol 6 p661-669
- Kodali R., Wetzel R., **Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly**, Curr. Opin. Struc. Biol., Feb. 2007, Vol 17 p48-57

Koike H., Tomioka S., Sorimachi H., Saido T. C., Maruyama K., Okuyama A., Fujisawa S. A., Ohno S., Suzuki K., Ishiura S., **Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an alpha-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein**, *Biochem. J.*, Oct 1999, Vol 343 p371-375

Kondo S., Murakami T., Tatsumi K., Ogata M., Kanemoto S., Otori K., Iseki K., Wanaka A., Imaizumi K., **OASIS a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes**, *Nat. Cell Biol.*, Jan. 2005, Vol 7 p186-194

Kondo S., Saito A., Hino S. I., Murakami T., Ogata M., Kanemoto S., Nara S., Yamashita A., Yoshinaga K., Hara H., Imaizumi K., **BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer**, *Mol. Cell Biol.*, March 2007, Vol 27 p1716-1729

Koong A. C., Chauhan V., Romero-Ramirez L., **Targeting XBP-1 as a novel anti-cancer strategy**, *Cancer Biol. Ther.*, July 2006, Vol 5 p756-759

Korrenykh A. V., Egea P. F., Korostelev A. A., Finer-Moore J., Zhang C., Shokat K. M., Stroud R. M., Walter P., **The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1**, *Nature*, Feb. 2009, Vol 457 p687-693

Kouchi Z., Barthet G., Serban G., Georgakopoulos A., Shioi J., Robakis N. K., **p120 catenin recruits cadherins to gamma-secretase and inhibits production of Abeta peptide**, *J. Biol. Chem.*, Jan. 2009, Vol 284 p1954-1961

Koyama A., Okereke O. I., Yang T., Blacker D., Selkoe D. J., Grodstein F., **Plasma amyloid- β as a predictor of dementia and cognitive decline : a systematic review and meta-analysis**, *Arch. Neurol.*, July 2012, Vol 69 p824-831

Kudo T., Iqbal K., Ravid R., Swaab D. F., Grundke-Iqbal I., **Alzheimer disease : correlation of cerebro-spinal fluid an brain ubiquitin levels**, *Brain Res.*, 1994, Vol 639 p1-7

Kudo T., Kanemoto S., Hara H., Morimoto N., Morihara T., Kimura R., Tabira T., Imaizumi K., Takeda M., **A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress**, *Cell Death Differ.*, Feb. 2008, Vol 15 p364-375

Kuhn P. H., Wang H., Dislich B., Colombo A., Zeitschel U., Ellwart J?, Kremmer E., Robner S., Lichtenthaler S. F., **ADAM 10 is the physiologically relevant, consitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons**, *EMBO*, Jul. 2010, Vol 29 p3020-3032

Kuo Y. M., Emmerling M. R., Vigo-Pelfrey C., Kasunic T. C., Kirkpatrick J. B., Murdoch G. H., Ball M. J., Roher A. E., **Water-soluble A β (N-40, N-42) oligomers in normal and Alzheimer disease brains**, *The journal of biological chemistry*, Feb. 1996, Vol 271 p4077-4081

L

Laferla F. M., Green K. N., Oddo S., **Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease**, July 2007, *Nature reviews Neuroscience*, Vol 8 p499-509.

- Lahiri D. K., Greig N. H., **Lethal weapon : amyloid β -peptide, role in the oxidative stress and neurodegeneration of Alzheimer's disease**, *Neurobiol. of Aging*, June 2004, Vol 25 p581-587
- Laifendeld D., Patzek L. J., McPhie D. L., Chen Y., Levites Y., Cataldo A. M., Neve R. L., J., **Rab5 mediates an amyloid precursor protein signaling pathway that leads to apoptosis**, *Neuroscience*, July 2007, Vol 27 p7141-7153
- Laird F. M., Cai H., Savonenko A. V., Farah M. H., He K., Melnikova T., Wen H., Chiang H. C., Xu G., Koliatsos V. E., Borchelt D. R., Price D. L., Lee H. K., Wong P. C., **BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the Brain to amyloid- β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions**, *J. Neurosci.*, Dec. 2004, Vol 25 p11693-11709
- Lambert M. P., Barlow A. K., Chromy B. A., Edwards C., Freed R., Liosatos M., Morgan T. E., Rozovsky I., Trommer B., Viola K. L., Wals P., Zhang C., Finch C. E., Krafft G. A., Klein W. L., **Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta 1-42 are potent central nervous system neurotoxins**, May 1998, Vol 95 p6448-6453
- Lammich S., Kojro E., Postina R., Gilbert S., Pfeiffer R., Jasionowski M., Haass C., Fahrenholz F., **Constitutive and regulation α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease**, *PNAS*, March 1999, Vol 96 p3922-3927
- Lauritzen I., Pardossi-Piquard R., Bourgeois A., Pagnotta S., Biferi M-G., Barkats M., Lacor P., Klein W., Bauer C., Checler F., **Intraneuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces A β -independent lysosomal-autophagic pathology**, *Acta Neuropath.*, April 2016
- Lee A. H., Chu G. C., Iwakoshi N. N., Glimcher L. H., **XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands**, *EMBO J.*, Dec. 2005, Vol 21 p4260-4270
- Lee A. H., Iwakoshi N. N., Anderson K. C., Glimcher L. H., **Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells**, Aug. 2003, Vol 100 p9946-9951
- Lee A. H., Iwakoshi N. N., Glimcher L. H., **XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperones genes in the unfolded protein response**, *Mol. Cell. Biol.*, Nov. 2003, Vol 23 p7448-7459
- Lee D. Y., Lee K. S., Lee H. J., Kim D. H., Noh D. H., Yu K., Jung H. Y., Lee S. H., Lee J. Y., Youn Y. C., Jeong Y., Kim D. K., Lee W. B., Kim S. S., **Activation of PERK signaling attenuates A β -mediated ER stress**, *PLOS one*, May 2010
- Lee J. H., Won S. M., Suh J., Son S. J., Moon G. J., Park U. J., Gwag B. **Induction of the unfolded protein response and cell death pathway in Alzheimer's disease, but not in aged Tg2576 mice**, *J., Exp. Mol. Med.*, May 2010, Vol 42 p386-394
- Lee M. K., Slunt H. H., Martin L. J., Thinakaran G., Kim G., Gandy S. E., Seeger M., Koo E., Price D. L., Sisodia S. S., **Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues**, *J. Neurosci.*, 1996, Vol 16 p7513-7525
- Lesné S. E., Sherman M. A., Grant M., Kuskowski M., Schneider J. A., Bennet D. A., Ashe K. H., **Brain amyloid- β oligomers in ageing and Alzheimer's disease**, *Brain*, May 2013, Vol 136 p1383-1398

- Li H., Korennykh, Behrman S. L., Walter P., **Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering**, PNAS, Sept. 2010, Vol 107 p16113-18
- Liang G., Audas T. E., Li Y., Cockram G. P., Dean J. D., Martyn A. C., Kokame K., Lu R., **Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum (ER) stress response protein Herp through an ER stress response element**, Mol. Cell Biol. Nov. 2006, Vol 26 p7999-8010
- Lin J. H., Li H., Zhang Y., Ron D., Walter P., **Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability**, PLOSone, Jan. 2009
- Lindsten K., de Vrij F. M., Verhoef L. G., Fischer D. F., van Leeuwen F. W., Hol E. M., Masucci M. G., Dantuma N. P., **Mutant ubiquitin found in neurodegenerative disorders is a ubiquitin fusion degradation substrate that blocks proteasomal degradation**, J. Cell. Biol., April 2002, Vol 157 p417-427
- Liou H. C., Boothby M. R., Finn P. W., Davidon R., Nabavi N., Zeleznik-Le N. J., Ting J. P., Glimcher L. H., **A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA DR alpha promoter**, Science, March 1990, Vol 247 p1581-1584
- Lisbona F., Hetz C., **Turning off the unfolded protein response : an interplay between the apoptosis machinery and ER stress signaling**, Cell Cycle, June 2009, Vol 8 p1643-1644
- Liu S. Y., Wang W., Cai Z. Y., Yao L. F., Chen Z. W., Wang C. Y., Zhao B., Li K. S., **Polymorphism -116C/G of human x-box-binding protein 1 promoter is associated with risk of Alzheimer's disease**, CNS Neuroscience & Therapeutics, April 2013, Vol 19 p229-234
- Lorenzo., Yuan M. Zhang Z., Paganetti P. A., Sturchler-Pierrat C., Staufenbiel M., Mautino J., Vigo F. S., Sommer B., Yankner B. A., **Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein : a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease**, Nat. Neuroscience, May 2000, Vol 5 p46°-464
- Loring J. F., Wen X., Lee J. M., Seilhamer J., Somogyi R., **A gene expression profile of Alzheimer's disease**, DNA Cell. Biol., 2001, Vol 20 p683-695
- Lott I. T., Head E., **Down syndrome and Alzheimer's disease : a link between development and aging**, 2001, Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev., Vol 7 p172-178
- Lourenço F. C., Galvan V., Fombonne J., Corset V., Llambi F., Muller U., Bredesen D. E., Mehlen P., **Netrin-1 interacts with amyloid precursor protein and regulates amyloid- β production**, Cell Death Differ, May 2009, Vol 5 p655-663
- Lu D. C., Rabizadeh S., Chandra S., Shayya R. F., Ellerby L. M., Ye X., Salvesen X. Y., Koo E. H., Bredesen D. E., **A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid β -protein precursor**, Nature Medecine, 2000, Vol 6 p397-404
- Lu T., Pan Y., Kao S. Y., Li C., Kohane I., Chan J., Yankner B. A., **Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain**, Nature, June 2004, Vol 429 p883-891
- Luo D., He Y., Zhang H., Yu L., Chen H., Xu Z., Tang S., Urano F., Min W., **AIP1 is critical in transducing IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress response**, The J. of Biol. Chem., Feb. 2008, Vol 283 p11905-11912

Luo X., Weber G. A., Zheng J., Gendelman H. E., Ikezu T., **C1q-Calreticulin induced oxidative neurotoxicity : relevance for the neuropathogenesis of Alzheimer's disease**, J. of Neuroimmunology, Feb. 2003, Vol 135 p62-71

Luo Y., Bolon B., Kahn S., Bennett B. D., Babu Khan S., Denis P., Fan W., Kha H., Zhang J., Gong Y., Martin L., Louis J. C., Yan Q., Richards G., Citron M., Vassar R., **Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β -secretase, have normal phenotype and abolished β -amyloid generation**, Nature Neuroscience, 2001, Vol 4 p231-232

M

Ma T., Trinh M. A., Wexler A. J., Bourbon C., Gatti E., Pierre P., Cavener D. R., Klann E., **Suppression of eIF2 α kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits**, Nature Neurosci., Aug. 2013, Vol 16 p1299-1305

Malhotra J. D., Randal J. K., **Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress : a vicious cycle or a double-edged sword**, Antioxid. Redox Signal, Nov. 2007, Vol 9

Maly D. J., Papa F. R., **Druggable sensors of the unfolded protein response**, Nature Chem. Biol., June 2014, Vol 10 p892-901

Marambaud P., Wen P. H., Dutt A., Shioi J., Takashima A., Siman R., Robakis N. K., **A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/epsilon-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations**, Cell., Sep. 2003, Vol 114 p635-645

Marciniak S. J., Yun C. Y., Oyadomari S., Novoa I., Zhang Y., Jungreis R., Nagata K., Harding H. P., Ron D., **CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum**, Genes & Dev., 2004, Vol 18 p3066-3077

Marin M. A., Ziburkus J., Jankowsky J., Rasband M. N., **Amyloid- β plaques disrupt axon initial segments**, Exp. Neurol., July 2016, Vol 281 p93-96

Marotta C. A., Majocha R. E., Tate B., **Molecular and cellular biology of Alzheimer amyloid**, J. Mol. Neurosci., 1992, Vol 3 p111-15

Martinez G. Vidal R. K., Mardones P., Serrano F. G., Ardiles A. O., Wirth C., Valdes P., Thielen P., Schneider B. L., Kerr B., Valdes J. L., Palacios A., Inestrosa N. C., Gilmcher L. H., Hetz C., **Regulation of memory formation by the transcription factor XBP1**, Cell reports, Feb. 2016, Vol 14 p1382-1394

Maruf M. U. A., Bagratuni T., Davenport E. L., Nowak P. R., Silva-Santisteban M. C., Hardcastle A., McAndrews C., Rowlands M. G., Morgan G. J., Aherne W., Collins I., Davies F. E., Pearl L. H., **Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implication for the unfolded protein response**, EMBO J., March 2011, Vol 30 p894-905

Masters C. L., Simms G., Weinman N. A., Multhaup G., McDonald B. L., Beyreuther K., **Amyloid plaque core protein disease and Down syndrome**, PNAS, June 1985, Vol 82 p4245-4249

Mattson M. P., Cheng B., Culwell A. R., Esch F. S., Lieberburg I., Rydel R. E., **Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-**

amyloid precursor protein, Neuron, Feb 1993, Vol 10 p243-254

Matus S., Nassif M., Glimcher L. H., Hetz C., **XBP-1 deficiency in the nervous system reveals a homeostatic switch to activate autophagy**, Autophagy, Nov. 2009, Vol 5

McCullough K. D., Martindale J. L., Klotz L. O., Aw T. Y., Holbrook N. J., **Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state**, Mol. and Cell. Biology, Feb. 2001, Vol 21 p1249-1259

Meilandt W. J., Cisse M., Ho K., Wu T., Esposito L. A., Searce-Levie K., Cheng I. H., Yu G. Q., Mucke L., **Neprilysin overexpression inhibits plaque formation but fails to reduce pathogenic A β oligomers and associated cognitive deficits in human amyloid precursor protein transgenic mice**, J. Neurosci., Feb. 2009, Vol 29 p1977-1986

Melnick J., Dul J. L., Argon Y., **Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP74 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum**, Nature, 1994, Vol 370 p373-375

Menéndez-Gonzalez M., Pérez-Pinera P., Matinez-Riviera M., Calatayud M. T., Blazquez M. B., **APP processing and the APP-KPI domain involvement in the amyloid cascade**, Neurodegener. Dis., 2005, Vol 2 p277-283

Meraz-Rios M. A., Franco-Bocanegra D. F., Rios D. T., Campos-Pena V., **Early Onset Alzheimer's disease and oxidative stress**, Oxid. Med. Cell. Longev., Jan. 2014

Mesaeli N., Nakamura K., Zvaritch E., Dickie P., Diazk E., Krause K. H., Opas M., MacLennan D. H., Michalak M., **Calreticulin is essential for cardiac development**, J. Cell. Biol., March 1999, Vol 144 p857-868

Meththa P. D., Perttila T., Patrick B. A., Barshatzky M., Meththa S. P., **Amyloid β protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer disease**, Neuroscience Letters, May 2001, Vol 304 p102-106

Mimura N., Fulciniti M., Gorgun G., Tai Y. T., Cirstea D., Santo L., Hu Y., Fabre C., Minami J., Ohguchi H., Kiziltepe T., Ikeda H., Kawano Y., French M., Blumenthal M., Tam V., Kertesz N. L., Malyankar U. M., Hokenson M., Pham T., Zeng Q., Patterson J. B., Richardson P. G., Munshi N. C., Anderson K. C., **Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1 α is a promising therapeutic option in multiple myeloma**, Blood., June 2012, Vol 119 p5772-5781

Misonou H., Morishima-Kawashima M., Ihara Y., **Oxidative stress induces intracellular accumulation of amyloid beta-protein (A β) in human neuroblastoma cells**, Biochemistry, June 2000, Vol 39 p6951-6959

Montine T. J., Amarnath V., Martin M. E., Strittmatter W. J., Graham D. G., **E-4-hydroxy-2-nonenal is cytotoxic and cross-links cytoskeletal proteins in P19 neuroglial cultures**, January 1996, American J. of Pathology, Vol 148 p89-93

Montoliu-Gaya L., Villegas S., **A β -immunotherapeutic strategies : a wide range of approaches for Alzheimer's disease treatment**, Expert Reviews in Mol. Med., June 2016, Vol 18

Morris J. A., Dorner A. J., Edwards C. A., Hendershot L. M., Kaufman R. J., **Immunoglobulin**

binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective protein, The J. of Biological Chemistry, Feb. 1997, Vol 272 p4327-4334

Morris J. C., **Mild cognitive impairment and preclinical Alzheimer's disease**, Geriatrics, June 2005, p9-14.

Mouton-Liger F., Paquet C., Dumurgier J., Bouras C., Pradier L., Gray F., Hugon J., **Oxidative stress increases BACE1 protein levels through activation of the PKR-eIF2 α pathway**, Biochim. Biophys. Acta, June 2012, Vol 1822 p885-896

Muchowski P. J., Wacker J. L., **Modulation of neurodegeneration by molecular chaperones**, Nature Neurosci., Jan. 2005, Vol 6 p11-22

Mucke L., Masliah E., Yu G. Q., Mallory M., Rockenstein E. M., Tatsuno G., Hu K., Kholodenko D., Johnson-Wood K., McConlogue L., **High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice : synaptotoxicity without plaque formation**, J. Neurosci., June 2000, Vol 20 p4050-4058

Munro S., Pelham R. B. H., **An hsp70-like protein in the ER : Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein**, Cell, July 1986, Vol 46 p291-300

N

Nagele R. G., D'Andrea M. R. D., Anderson W. J., Wang H. Y., **Intracellular accumulation of β -amyloid 1-42 in neurons is facilitated by the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease**, Neuroscience, Vol 110 p199-211

Naidoo N., **ER and aging - Protein folding and the ER stress response**, Organellar Aging, July 2009, Vol 8 p150-159

Naslund J., Haroutunian, V., Mohs R., Davis K. L., Davies P., Greengard P., Buxbaum J. D., **Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline**, March 2000, JAMA, Vol 283 p1571-1577

Navon A., Gatushkin A., Zelcbuch L., Shteingart S., Farago M., Hadar R., Tirosh B., **Direct proteasome binding and subsequent degradation of unspliced XBP-1 prevent its intracellular aggregation**, FEBS Letters, Jan. 2010, Vol 584 p67-73

Nichols J. T., Miyamoto A., Weinmaster G., **Notch signaling - constantly on the move**, Traffic, Aug. 2007, Vol 8 p959-969

Nijholt D. A. T., Graaf T. R., van Haastert E. S., Oliveira A. O., Berkers C. R., Zwart R., Ovaas H., Baas F., Hoozmans J. J. M., Scheper W., **Endoplasmic reticulum stress activates autophagy but not the proteasome in neuronal cells : implication for Alzheimer's disease**, Cell Death Differ., June 2011, Vol 18 p 1071-1081

Nikolaev A., McLaughlin T., O'Leary D. D., Tessier-Lavigne M., **APP bins DR6 to trigger axon**

pruning and neuron death via distinct caspases, Nature, Feb. 2009, Vol 457 p981-989

Nishikawa S. I., Fewell S. W., Kato Y., Brodsky J. L., Toshiya E., **Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation**, J. C. B., May 2001, Vol 153 p1061-1070

Nishitoh H., Matsuzawa A., Tobiume K., Saegusa K., Takeda K., Inoue K., Hori S., Kakizuka A., Ichijo H., **ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats**, Genes Dev., June 2002, Vol 16 p1345-1355

Niwa M., Sidrauski C., Kaufman R. J., Walter P., **A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded response**, Cell, Dec. 1999, Vol 99 p691-702

Nixon R. A., **Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer's disease**, J. Cell. Sci., Dec. 2007, Vol 120 p4081-4091

Nordberg A., **Amyloid plaque imaging in vivo : current achievement and future prospects**, Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, March 2008, Vol 35 p46-50.

Novoa I., Zeng H., Harding H. P., Ron D., **Feedback inhibition of the unfolded-protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2 α** , J. C. B., May 2001, Vol 153 p1011-1022

Nurzian I., Davis T. W., **Have you HRD ? Understanding ERAD is DOAble !** Cell, July 2006, Vol 126 p237-239

O

O'Connor T., Doherty-Sadleir K., Maus E., Velliquette R. A., Zhao J., Cole S. L., Eimer W. A., Hitt B., Bembinster L. A., Lammich S., Lichtenthaler S. F., Hébert S. S., De Strooper B., Haass C., Bennett D. A., Vassar R., **Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis**, Neuron, Dec. 2008, Vol 60 p988-1009

Oda T., Wals P., Osterburg H. H., Johnson S. A., Pasinetti G. M., Margan T. E., Rozovsky I., Stin W. B., Snyder S. W., Holzman T. F., et al., **Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress**, Nov. 1995, Exp. Neurol., Vol 136 p22-31

Oda Y., Hosokawa N., Wada I., Nagata K., **EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin**, Science, Feb. 2003, Vol 299 p1394-1397

Oda Y., Okada T., Yoshida H., Kaufman R. J., Nagata K., Mori K., **Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and required for ER-associated degradation**, J. Cell. Biol., Jan. 2006, Vol 172 p383-393

Oddo S., Caccamo A., Smith I. F., Green K. N., Laferla F. M., **A dynamic relationship between intracellular and extracellular pools of A β** , Am. J. Pathol., Jan. 2006, Vol 168 p184-194

Ogata M., Hino S. I., Saito A., Morikawa K., Kondo S., Kanemoto S., Murakami T., Taniguchi M., Tanii I., Yoshinaga K., Shiosaka S., Hammarback J. A., Urano F., Imaizumi K., **Autophagy is**

activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress, Mol. and Cell. Biol., Dec. 2006, Vol 26 p9220-9231

Ohsawa I., Takamura C., Morimoto T., Ishiguro M., Kohsaka S., **Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells**, Oct. 2008, Vol 11 p1907-1913

Oikawa D., Kimata Y., Kohno K., Iwawaki T., **Activation of mammalian IRE1 α upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded protein**, Exp. Cell Research, Sept. 2009, Vol 315 p2496-2504

Okazaki Y., Ohno H., Takase K., Ochiai T., Saito T., **Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum**, J. Biol. Chem., Nov. 2000, Vol 275 p35751-8

Olivari S., Galli C., Alanen H., Ruddock L., Molinari M., **A novel stress-induced EDEM variant regulation endoplasmic reticulum-associated glycoprotein degradation**, The J. of Biological Chem., Jan. 2005, Vol 280 p2424-2428

Onn A., Ron D., **Modeling the endoplasmic reticulum unfolded protein response**, Nature Struc. & Molecular Biol., 2010, Vol 17 p924-925

Ou W. J., Cameron P. H., Thomas D. Y., Bergeron J. J., **Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation**, Nature, Aug. 1993, Vol 364 p771-776

Oyadomari S., Mori M., **Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress**, Cell Death and Differentiation, Dec. 2003, Vol 11 p381-389

P

Pangalos M. N., Efthimiopoulos S., Shioi J., Robakis N. K., **The chondroitin sulfate attachment site of appican is formed by splicing out exon 15 of the amyloid precursor gene**, J. B. C., May 1995, Vol 270 p10388-10391

Pardossi-Piquard R., Petit A., Kawarai T., Sunyach C., Alves da Costa C., Vincent B., Ring S., D'Adamio L., Shen J., Muller U., St George-Hyslop P., Checler F., **Presenilin-Dependent Transcriptional control of the A β degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of β APP and APLP**, Neuron, Feb. 2007, Vol 53 p479-483

Park D. C., Smith A. D., Lautenschlager G., Earles J. L., Frieske D., Zwahr M., Gaines C. L., **Mediators of long-term memory performance across the life span**, Dec 1996, Psychology and Aging, Vol 11 p621-637.

Park J. H., Gimbel D. A., GrandPre T., Lee J. K., Kim J. E., Li W., Lee. D H. S., Strittmatter S. M., **Alzheimer Precursor Protein Interaction with the Nogo-66 receptor reduces amyloid- β plaque deposition**, J. neurosci., Feb. 2006 Vol 5 p1386-1395

Park S. W., Zhou Y., Lee J., Lu A., Sun C., Chung J., Ueki K., Ozcan U., **The regulatory subunits of PI3K, p85 α and p85 β interact with XBP-1 and increase its nuclear translocation**, Nature

Medicine, Jan. 2010, Vol 16 p429-437

Pasinetti G. M., **Use of cDNA microarray in the search for molecular markers involved in the onset of Alzheimer's disease dementia**, J. Neurosci. Res., 2001, Vol 65 p471-476

Pearl D. P., **Neuropathology of Alzheimer's disease**, Mt Sinai J. Med., Jan. 2010, Vol 77 p32-42

Perry G., Friedman R., Shaw G., Chau V., **Ubiquitin is detected in neurofibrillary tangles and senile plaque neurites of Alzheimer disease brains**, PNAS, May 1987, Vol 84 p3033-3036

Peschek J., Acosta-Alvear D., Mendez A. S., Walter P., **A conformational RNA zipper promotes intron ejection during non-conventional XBP1 mRNA splicing**, EMBO reports, 2015

Petersen R. C., **Mild cognitive impairment : transition between aging and Alzheimer's disease**, Neurologia, March 2000, Vol 15 p93-101

Phinney A. L., Horne P., Yang J., Janus C., Bergeron C., Westaway D., **Mouse models of Alzheimer's disease : The long and filamentous road**, Neurological research, July 2003, Vol 25 p590-600.

Pilon M., Schekman R., Romisch K., **Sec61 mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation**, The EMBO J., 1997, Vol 16 p4540-4548

Plant L. D., Boyle J. P., Smith I. F., Peers C., Pearson H. A., **The production of amyloid β peptide is a critical requirement for the viability of central neurons**, The Journal of Neuroscience, July 2003, Vol 23 p5531-5535

Postina R., Schroeder A., Dewatchter I., Bohl J., Schmitt U., Prinzen C., Endres K., Hiemke C., Blessing M., Flamez P., Dequenue A., Godaux E., van Leuven F., Fahrenholz F., J., **A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model**, Clin Invest., May 2004, Vol 113 p1456-64

Price D. L., Sisodia S. S., **Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models**, March 1998, Annual review of neuroscience, Vol 21 p479-505.

Prischi F., Nowak P. R., Carrara M., Maruf M. U. A., **Phosphoregulation of Ire1 RNase splicing activity**, Nature Com., March 2014, Vol 5

Puzzo D., Privitera L., Leznik E., Fa M., Staniszewski A., Palmeri A., Arancio O., **Picomolar amyloid- β positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus**, J. Neurosci., Dec. 2008, Vol 28 p14537-45

Q

Qahwash I., He W., Tomasselli A., Kletzien R. F., Yan R., **Processing Amyloid Precursor Protein at the β -Site Requires Proper Orientation to Be Accessed by BACE1**, The journal of Biological Chemistry, Sept. 2004, Vol 279 p33010-39016

Qiu Q., Zheng Z., Chang L., Zhao Y. S., Tan C., Dandekar A., Zhang Z., Lin Z., Gui M., Li X.,

Zhang T., Kong Q., Li H., Chen S., Chen A., Kaufman R. J., Yang W. L., Lin H. K., Zhang D., Perlman H., Thorp E., Zhang K., Fang D., **Toll-like receptor mediated IRE1 α activation as a therapeutic target for inflammatory arthritis**, EMBO J., Sept. 2013, Vol 32 p2477-2490

Querfurth H. W., LaFerla F. M., **Alzheimer's Disease**, N. Engl. J. Med., Jan. 2010, Vol 362 p329-344

R

Rabinovich E., Kerem A., Frohlich K. U., Diamant N., Bar-Nun S., **AAA-ATPase p97/Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation**, Mol. Cell. Biol., Jan. 2002, Vol 22 p628-634

Reijonen S., Putkonen N., Norremolle A., Lindholm D., Korhonen L., **Inhibition of endoplasmic reticulum stress counteracts neuronal cell death and protein aggregation caused by N-terminal mutant huntingtin proteins**, Exp. Cell Res., March 2008, Vol 314 p950-960

Reimold A. M., Etkin A., Clauss I., Perkins A., Friend D. S., Zhang J., Horton H. F., Scott A., Orkin S. H., Byrne M. C., Grusby M. J., Glimcher L. H., **An essential role in liver development for transcription factor XBP-1**, Genes & Dev., 2000, Vol 14 p152-157

Reinhardt S., Schuck F., Grosgen S., Riemenschneider M., Hartmann T., Postina R., Grimm M., Endres K., **Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease**, The FASEB J., Feb. 2014, Vol 28 p978-997

Ren Z., Schenk D., Basi G. S., Shapiro I. P., **Amyloid beta-protein precursor juxtamembrane domain regulates specificity of gamma-secretase-dependent cleavages**, J. Biol. Chem., Nov. 2007, Vol 48 p35350-60

Repetto E., Yoon I. S., Zheng H., Kang D. E., **Presenilin 1 regulates epidermal growth factor receptor turnover and signaling in the endosomal-lysosomal pathway**, J. Biol. Chem., Oct. 2007, Vol 282 p31504-16

Ring S., Weyer S. W., Kilian S. B., Waldron E., Pietrzik C. U., Filippov M. A., Herms J., Buchholz C., Eckman C. B., Korte M., Wolfer D. P., Muller U. C., **The secreted β -Amyloid precursor protein ectodomain APPs α is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-Deficient mice**, The Journal of neuroscience, July 2007, Vol 29 p7817-7826

Robakis N. K., **Mechanisms of FAD neurodegeneration may be independent of A β** , Neurobiol. Aging, March 2011, Vol 32 p372-379

Roher A. E., Chaney M. O., Kuo Y. M., Webster S. D., Stin W. B., Haverkamp L. J., Woods A. S., Cotter R. J., Tuohy J. M., Krafft G. A., Bonnell B. S., Emmerling M. R., **Morphology and toxicity of A β -(1-42) Dimer derived from neuritic and vascular amyloid deposits of Alzheimer's disease**, The journal of biological chemistry, Aug. 1996, Vol 271 p20631-36

Ron D., Tabas I., **Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress**, Nature Cell Biol., March 2011b, Vol 13 p184-190

Ron D., Walter P., **The unfolded protein response : From stress pathway to homeostatic regulation**, Science Nov. 2011a, Vol 334 p1081-1086

Rubio C., Pincus D., Korennykh A. V., Schuck S., El Samad H., Walter P., **Homeostatic adaptation to endoplasmic reticulum stress depends on Ire1 kinase activity**, J. C. B., March 2011, Vol 193 p171-184

S

Sado M., Yamasaki Y., Iwanaga T., Onaka Y., Ibuki T., Nishihara S., Mizuguchi H., Momota H., Kishibuchi R., Hashimoto T., Wada D., Kitagawa H., Watanabe T. K., **Protective effect against Parkinson's disease-related insults through the activation of XBP1**, Brain Research, Feb. 2009, Vol 1257 p16-24

Saifing P. Lichtenthaler S. F., **The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain**, Prog. Neurobiol., Dec. 2015, Vol 135 p1-20

Saito R., Kaneko M., Kitamura Y., Takata K., Kawada K., Okuma Y., Nomura Y., **Effects of oxidative stress on the solubility of HRD1, a ubiquitin ligase implicated in Alzheimer's disease**, PLoS one, May 2014

Saito R., Kaneko M., Okuma Y., Nomura Y., **Correlation between decrease in protein levels of ubiquitin ligase HRD1 and amyloid- β production**, J. Pharmacol. Sci., May 2010, Vol 113 p285-288

Salon M. L., Morelli L., Castao E. M., Soto E. F., Pasquini J. M., **Defective ubiquitination of cerebral proteins in Alzheimer's disease**, J. Neurosci. Res., Sept. 2000, Vol 62 p302-310

Sanches M., Duffy N. M., Talukdar M., Thevakumaran N., Chiovitti D., Canny M. D., Kenneth L., Kurinov I., Uehling D., Al-awar R., Poda G., Prakesch M., Wilson B., Tam V., Schweitzer C., Toro A., Lucas J. L., Vuga D., Lehmann L., Durocher D., **Structure and mechanism of action of the hydroxy-aryl-aldehyde class of IRE1 endoribonuclease inhibitors**, Nature Com., Aug. 2014, Vol 5

Sandbrink R., Masters L. C., Beyreuther K., **β A4-Amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neuron**, The Journal of Biochemistry, May 21, 1993, Vol 269 p1513-1517

Sandhu N., Duus K., Jorgensen C. S., Hansen P. R., Bruun S. W., Pedersen L. O., Hojrup P., Houen G., **Peptide binding specificity of the chaperone calreticulin**, Biochim. Biophys. Acta., June 2007, Vol 1774 p701-713

Sasaki N., Toki S., Chowei H., Saito T., Nakano N., Hayashi Y., Takeushi M., Makita Z., **Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease**, Brain Res., Jan. 2001, Vol 888 p256-262

Sato N., Urano F., Leem J. Y., Kim S. H., Li M., Donoviel D., Bernstein A., Lee A. S., Ron D., Veselits M. L., Sisodia S. S., Thinakaran G., **Upregulation of BiP and CHOP by the unfolded-protein response is independant of presenilin expression**, Nature Cell Biology, Nov. 2000, Vol 2

Savage M. J., Kalinina J., Wolfe A., Tugusheva K., Korn R., Cash-Mason T., Maxwell J. W., Hatcher N. G., Haugabook S. J., Wu G., Howell B. J., Renger J. J., Shughrue P. J., McCampbell A., **A sensitive ab oligomers assay discriminates Alzheimer's and aged control cerebro-spinal fluid**, J. Neurosci., Feb. 2014, Vol 34 p28884-97

Schauble N., Lang S., Jung M., Cappel S., Schorr S., Ulucan O., Linxweiler J., Dudek J., Blum R., Helms V., Paton A. W., Paton J. C., Cavalié A., Zimmermann R., **BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER**, EMBO J., Aug. 2012, Vol 31 p3282-3296

Scheff S. W., Price D. A., Spark D. L., **Quantitative assessment of possible age-related change in synaptic numbers in the human frontal cortex**, Neurobiol Aging, May 2001, Vol 22 p355-365

Scheper W., Hoozemans J. J. M., **The unfolded protein response in neurodegenerative disease : a neuropathological perspective**, Acta. Neuropatho., July 2015

Schroder M., Randal J. K., **The mamalian unfolded protein response**, Annual Review of Biochem., July 2004, Vol 74 p739-789

Schulze A., Standera S., Buerger E., Kikkert M., van Voorden S., Wiertz E., Koning F., Kloetzel P. M., Seeger M., **The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway**, J. biol. Chem., Dec. 2005, Vol 354 p1021-1027

Selkoe D. J., Jan 2006, **Toward a comprehensive theory for Alzheimer's disease. Hypothesis : Alzheimer's disease is caused by the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein**, Annals of the New York Acad. of sciences, Vol 924 p 17-25.

Selkoe D. J., **Folding proteins in fatal ways**, Dec. 2003, Nature, Vol 426 p900-904

Serneels L., Dejaegere T., Craessaerts K., Horré K., Jorissen E., Tousseyn T., Hébert S., Coolen M., Martens G., Zwijsen A., Annaert W., Hartmann D., De Strooper B., **Differential contribution of the three Aph1 genes to gamma-secretase activity in vivo**, PNAS, Feb. 2005, Vol 102 p1719-1724

Shaffer A. L., Shapiro-Shelef M., Iwakoshi N. N., Lee A. H., Qian S. B., Zhao H., Yu X., Yang L., Tan B. K., Rosenwald A., Hurt E. M., Petroulakis E., Sonenberg N., Yewdell J. W., Calame K., Glimcher L. H., Staudt L. M., **XBPI, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation**, Immunity, July 2004, Vol 21 p81-93

Shajahan A. N., Riggins R. B., Clarke R., **The role of X-box binding protein-1 in tumorigenicity**, Drug News Perspect., June 2009, Vol 22 p241-246

Shamu C. E., Walter P., **Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus**, EMBO, 1996, Vol 15 p3028-3039

Shen J., Bronson R. T., Chen D. F., Xia W., Selkoe D. J., Tonegawa S., **Skeletal and CNS defects**

in Presenilin-1-deficient mice, Cell., May 1997, Vol 89 p629-639

Shen X., Zhang K., Kaufman R. J., **The unfolded protein response - a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum**, J of Chemical Neuroanatomy, Sept. 2004, Vol 28 p79-92

Shen Y. X., Sun A. M., Fang S., Feng L. J., Li Q., Hou H. L., Liu C., Wang H. P., Shen J. L., Luo J., Zhou J. N., **HRD1 facilitates tau degradation and promotes neuron survival**, Curr. Mol. Med., Feb. 2012, Vol 12 p138-152

Shimura H., Schwartz D., Gygi S. P., Kosik K. S., **CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival**, J. Biol. Chem., Feb. 2004, Vol 279 p4869-4876

Shirotani K., Edbauer D., Prokop S., Haass C., Steiner H., **Identification of distinct gamma-secretase complexes with different APO-1 variants**, J. Biol. Chem., Oct. 2004, Vol 279 p41340-5

Sinha S., Anderson J. P., Barbour R., Basi G. S., Caccavello R., Davis D., Doan M., Dovey H. F., Frigon N., Hong J., Jacobson-Croak K., Jewett N., Keim P., Knops J., Lieberburg I., Power M., Tan H., Tatsuno G., et al., **Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain**, Nature, Dec. 1999, Vol 402 p537-540

Small D. H., Clarris H. L., Williamson T. G., Reed G., Key B., Mok S. S., Beyreuther K., Master C. L., Nurcombe V. J., **Neurite-outgrowth regulating functions of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease**, Alzheimers Dis., Nov. 1999, Vol 1 p275-285

Smith C. D., Carney J. M., Starke-Reed P. E., Oliver C. N., Stadtman E. R., Floyd R. A., Markesbery W. R., **Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease**, Dec 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88 p10540-10553

Smith M. A., Taneda S., Richey P. L., Miyata S., Yan S. D., Stern D., Sayre L. M., Monnier V. M., Perry G., **Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology**, June 1994, Proc Natl. Acad. Sci. USA, Vol 91 p 5710-5714

Smith W. W., Jiang H., Pei Z., Tanaka Y., Morita H., Sawa A., Dawson V. L., Dawson T. M., Ross C. A., **Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein induced toxicity**, Hum. Mol. Genet., Dec. 2005, Vol 14 p3801-3811

Snyder E. M., Nong Y., Almeida C. G., Paul S., Moran T., Choi E. Y., Nairn A. C., Salter M. W., Lombroso P. J., Gouras G. K., Greengard P., **Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β** , Nature Neurosci., July 2005, Vol 9 p1051-1058

Soba P., Eggert S., Wagner K., Zentgraf H., Siehl K., Kreger S., Lower A., Langer A., Merdes G., Paro R., Masters C. L., Muller U., Kins S., Beyreuther K., **Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion**, EMBO, Oct. 2005, Vol 24 p3624-34

Soejima N., Ohyagi Y., Nakamura N., Himeno E., Linuma K. M., Sakae N., Yamasaki R., Tabira T., Murakami K., Irie K., Kinoshita N., LaFerla F. M., Kiyohara Y., Iwaki T., Kira J., **Intracellular accumulation of toxic tau amyloid- β is associated with endoplasmic reticulum stress in Alzheimer's disease**, Curr. Alzheimer's Res., Jan. 2013, Vol 10 p11-20

Song S., Kim S. Y., Jo D. G., Lee J. Y., Shim S. M., Chung C. W., Seo S. J., Yoo Y. J., Koh J. Y., Lee

- M. C., Yates A. J., Ichijo H., Jung Y. K., **Essential role of E2-25K/Hip-2 in mediating amyloid- β neurotoxicity**, Molecular Cell, Sept. 2003, Vol 12 p553-563
- Song W., Nadeau P., Yuan M., Yang X., Shen J., Yankner B. A., **Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations**, PNAS, June 1999, Vol 96 p6959-63
- Soreghan B., Kosmoski J., Glabe C., **Surfactant properties of Alzheimer's A beta peptides and the mechanism of amyloid aggregation**, J. B. C., Nov. 1994, Vol 269 p28551-4
- Sousa M. C., Ferrero Garcia M. A., Parodi A. J., **Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc-glycoprotein glycosyltransferase**, Biochemistry, 1992, Vol 31 p97-105
- Spriggs K. A., Bushell M., Willis A. E., **Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress**, Mol. Cell, Oct. 2010, Vol 40 p 228-237
- Sriburi R., Bommiasamy H., Buldak G. L., Robbins G. R., Frank M., Jackowski S., Brewer J. W., **Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1s induced endoplasmic reticulum biogenesis**, Jan. 2007, Vol 282 p7024-7034
- Sriburi R., Jackowski S., Mori K., Brewer J. W., **XBP1 a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum**, J. C. B., Oct. 2004, Vol 167 p35-41
- Stefani M., **Structural polymorphism of amyloid oligomers and fibrils underlies different fibrilization pathways : immunogenicity and cytotoxicity**, Curr. Protein & Peptide Sci., 2016, Vol 11 p343-354
- Stege G. J., Renkawek K., Overkamp P. S., Verschuure P., van Rijk A. F., Reijnen-Aalbers A., Boelens W. C., Bosman G. J., de Jong W. W., **The molecular chaperone alphaB-crystallin enhances amyloid-beta neurotoxicity**, Biochem. Biophys. Res. Commun, 1999, Vol 262 p152-156
- Steiner H., Duff K., Capell A., Romig H., Grim M. G., Lincoln S., Hardy J., Yu X., Picciano M., Fechteler K., Citron M., Kopan R., Pesold B., Keck S., Baader M., Tomita T., Iwatsubo T., Baumeister R., Haass C., **A loss of function mutation of presenilin-2 intergeres with amyloid β -peptide production and notch signaling**, The Joournal of biological chemistry, Oct. 1999, Vol 274 p28669-28673
- Stevens F. J., Argon Y., **Protein folding in the ER**, Seminars in Cell & Developmental Biology, Oct. 1999, Vol 10 p443-454
- Stirling J., O'Hare P., **CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by S1P**, MBoC, Jan. 2006, Vol 17 p413-426
- Swerdlow R. H., **Is aging part of Alzheimer's disease, or is Alzheimer's disease part of aging ?** Neurobiol. of aging, June 2007, Vol 28 p1465-1480
- Szathmary R., Biemann R., Nita-Lazar M., Burda P., Jakob C. A., **Yos9 protein is essential for degradation of misfolded glycoproteins and may function as lectin in ERAD**, Mol. Cell., Sept.

T

Taguchi J., Fujii A., Fujino Y., Tsujioka Y., Takahashi M., Tsuboi Y., Wada I., Yamada T., **Different expression of calreticulin and immunoglobulin binding protein in Alzheimer's disease brain**, Acta Neuropathol., Aug. 2000, Vol 100 p153-160

Takahashi R. H., Milner T. A., Li F., Nam E. E., Edgar M. A., Yamaguchi H., Beal M. F., Xu H., Greengard P., Gouras G. K., **Intraneuronal Alzheimer abeta42 accumulates in multivesicular bodies and is associated with synaptic pathology**, Am. J. Pathol., Nov. 2002, Vol 161 p1869-1879

Tanzi R. E., Gusella J. F., Watkins P. C., St George-Hyslop P., Van Keuren M. L., Patterson D., Pagan S., Kurnit D. M., Neve R. L., **Amyloid beta protein gene : cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus**, Science, Feb 1987, Vol 235 p880-884

Taylor R. C., Dillin A., **Aging as an event of proteostasis collapse**, Cold Spring Harb. Perspect. Biol., May 2011

Terry R. D., Masliah E., Salmon D. P., Butters N., DeTeresa R., Hill R., Hansen L. A., Katzman R., **Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease : synapse loss is the major correlate of cognitive impairment**, Ann. Neurol., Oct. 1991, Vol 30 p572-80

Thuerauf D. J., Morrison L., Glembotski C. C., **Opposing roles for ATF6alpha and ATF6beta in endoplasmic reticulum stress response gene induction**, J. Biol. Chem., May 2004, Vol 279 p21078-84

Tirasophon W., Lee K., Callaghan B., Welihinda A., Kaufman R. J., **The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response**, Genes Dev., Nov. 2000, Vol 14 p2725-2736

Tirasophon W., Welihinda A. A., Kaufman R. J., **A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells**, Genes Dev., June 1998, Vol 12 p1812-1824

Tomasselli A. G., Qahwash I., Emmons T. L., Lu Y., Leone J. W., Lull J. M., Fok K. F., Bannow C. A., Smith C. W., Bienkowski M. J., Heinrichson R. L., Yan R., **Employing a superior BACE1 cleavage sequence to probe cellular APP processing**, Journal of Neurochemistry, March 2003, Vol 84 p1006-1017

Tseng B. P., Green K. M., Chan J. L., Blurton-Jones M., LaFerla F. M., **A β inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation**, Neurobiol of aging, Nov. 2008, Vol 29 1607-1618

Tu H., Nelson O., Bezprozvanny A., Wang Z., Lee S. F., Hao Y. H., Serneels L., De Strooper B., Yu G., Bezprozvanny I., **Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease linked mutation**, Cell, Sept. 2006, Vol 126 p981-993

U

Uemura A., Oku M., Mori K., Yoshida H., **Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response**, J. C. S., 2009, Vol 122 p2977-2886

Urano F., Bertolotti A., Ron D., **IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum**, J. C. S., 2000a, Vol 113 p3697-3702

Urano F., Wang X. Z., Bertolotti A., Zhang Y., Chung P., Harding H. P., Ron D., **Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1**, Science, Jan. 2000b, Vol 287 p664-666

Uversky V. N., Dunker A. K., **The case for intrinsically disordered proteins playing contributory roles in molecular recognition without a stable 3D structure**, F1000 Biol. Rep., 2013

V

van Leeuwen F. W., de Kleijn D. P., van den Hurk H. H., Neubauer A., Sonnemans M. A., Sluijs J. A., Koycu S., Ramdjialal R. D., Salehi A., Martens G. J., Grosveld F. G., Peter J., Burbach H., Hol E. M., **Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients**, Science, Jan. 1998, Vol 279 p242-247

van Tijn P., de Vrij F. M., Schuurman K. G., Dantuma N. P., Fischer D. F., van Leeuwen F. W., Hol E. M., **Dose-dependant inhibition of proteasome activity by a mutant ubiquitin associated with neurodegenerative disease**, J. Cell Sci., May 2007, Vol 120 p1615-1623

van Tijn P., de Vrij F. M., Schuurman K. G., Dantuma N. P., Fischer D. F., van Leeuwen F. W., Hol E. M., **Long-term proteasome dysfunction in the mouse brain by expression of aberrant ubiquitin**, Neurobiol. of Aging, June 2009, Vol 30 p847-863

Vassar R., Bennett B. D., Babu-Khan S., Kahn S., Mendiaz E., Denis P., Teplow D. B., Ross S., Amarante P., Loeloff R., Luo Y., Fisher S., Fuller J., Edenson S., Lile J., Jorosiński M. A. Biere A. L., Curran E., Burgess T., et al., **β -Secretase cleavage of Alzheimer's Amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE**, Science, Oct 1999, Vol 286 p735-741

Vassar R., Kovacs D. M., Yan R., Wong P. C., J. **The β -Secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease : Regulation, Cell biology, function, and therapeutic potential**, Neurosci., Oct. 2009, Vol 29 p12787-94

Vattem K. M., Wek R. C., **PReinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells**, NAS, Aug. 2000, Vol 101 p11269-74

Venugopal C., Demos C. M., Jagannatha K. S., Pappola M. A., Sambamurti K., **Beta-secretase : Structure, function and evolution**, CNS Neurol. Disord. Drug Targets, Jun. 2008, Vol 7 p278-294

Vidal R. L., Figueroa A., Court F. A., Thielen P., Molina C., Wirth C., Caballero B., Kiffin R., Segura-Aguilar J., Cuervo A. M., Glimcher L. H., Hetz C., **Targeting the UPR transcription factor XBP1 protect against Huntington's disease through theregulation of FoxO1 and**

autophagy, Hum. Mol. Genet., May 2012, Vol 21 p2245-2262

Vigo-Pelfrey C., Lee D., Keim P. S., Leiberburg I. Schenk D., **Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid**, J. Neurochem., 1993, Vol 61 p1965-1968

Vilatela M. E. A., Lopez-Lopez M., Yescas-Gomez P., **Genetics of Alzheimer's disease**, Archives of Medical Research, Vol 43 p622-631

Villemagne V. L., Fodero-Tavoletti M. T., Pike K. E., Cappai R., Masters C. L., Rowe C. C., **The ART of loss : Abeta imaging in the evaluation of Alzheimer's disease and other dementias**, Mol. Neurobiol., Aug 2008, Vol 38 p1-15

Walsh D. M., Klyubin I., Fadeeva J. V., Cullen W. K., Anwyl R., Wolfe M. S., Rowan M. J., Selkoe D. J., **Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo**, Nature, April 2002, Vol 416 p535-539

W

Walsh D. M., Selkoe D. J., **Ab oligomers - a decade of discovery**, J. Neurochem., Jan. 2007, Vol 101 p1172-1184

Walter J., Fluhrer R., Hartung B., Willem M., Kaether C., Capell A., Lammich S., Multhaup G., Haass C., J. **Phosphorylation regulates intracellular trafficking of beta-secretase**, Biol. Chem., May 2001, Vol 276 p14634-41

Wang F. M., Chen Y. J., Ouyang H. J., **Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation**, Biochemical J., Jan. 2011, Vol 433 p245-252

Wang H. Y., Lee D. H., D'Andrea M. R., Peterson P. A., Shank R. P., Reitz A. B., **Beta-amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implication for Alzheimer's disease pathology**, J. Biol. Chem., Feb. 2000, Vol 275 p5626-5632

Wang J., Dickson D. W., Trojanowski J. Q., Lee V. M., **The levels of soluble versus insoluble brain Abeta distinguish Alzheimer's disease from normal and pathologic aging**, Exp. Neurol., Aug. 1998, Vol 158 p328-337

Wang L., Perera B. G. K., Hari S. B., Bhatarai B., Backes B. J., Seeliger M. A., Schurer S. C., Oakes S. A., Papa F. R., Maly D. J., **Divergent allosteric control of the IRE1 α endoribonuclease using kinase inhibitors**, Nature Chem. Biol., Oct. 2012, Vol 8 p982-989

Wasco W., Bupp K., Magendantz M., Gusella J. F., Tanzi R. E., Solomon F., **Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid- β protein precursor**, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1992, Vol 89 p10758-62

Wasco W., Gurubhagavatula S., Paradis M. D., Romano D. M., Sisodia S. S., Hyman B. T., Neve R. L., Tanzi R. E., **Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid- β protein precursor**, Nature Genetics, 1993, Vol 5 p95-100

Watt A. D., Perez K. A., Rembach A., Sherrat N. A., Hung L. W., Johanssen T., McLean C. A., Kok

W. M., Hutton C. A., Fodero-Tavoletti M., Masters C. L., Villemagne V. L., Barnham K. **Oligomers, fact or artefact ? SDS-PAGE induces dimerization of β -amyloid in human brain samples**, J. Acta. Neuropathol., April 2013, Vol 125 p549-564

Webster S. J., Bachstetter A. D., Nelson P. T., Schmitt F. A., van Eldik L. J., **Using mice to model Alzheimer's dementia : an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models**, Front. Genet., April 2014.

Wegiel J., Kuchna I., Nowicki K., Frackowiak J., Mazur-Kolecka B., Imaki H., Wegiel J., Metha P. D., Silverman W. P., Reisberg B., DeLeon M., Wisniewski T., Pertilla T., Frey H., Lehtimäki T., Kivimäki T., Visser F. E., Kamphorst W., Potempska A., Bolton D., Currie J. R., Miller D. L., **Intraneuronal A β immunoreactivity is not a predictor of brain amyloidosis-beta or neurofibrillary degeneration**, Acta. Neuropathol. April 2007, Vol 113 p389-402

Weidemann A., Eggert S., Reinhard F. B., Vogel M., Paliga K., Baier G., Masters C. L., Beyreuther K., Even G., Biochem., **A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing**, Feb. 2000, Vol 41 p2825-2835

Weissman A. M., **Regulating protein degradation by ubiquitination**, Immunology Today, April 1997, Vol 18 p189-198

Wertkin A. M., Turner R. S., Pleasure S. J., Golde T. E., Younkin S. G., Trojanowski J. Q., Lee V. M., **Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides**, PNAS, Oct. 1993, Vol 90 p9513-9517

Wetzel M. K., Naska S., Laliberté C. L., Rymar V. V., Fujitani M., Biernaskie J. A., Cole C. J., Lerch J. P., Spring S., Wang S. H., Frankland P. W., Henkelman R. M., Josselyn S. A., Sadikot A. F., Miller F. D., Kaplan D. R., **p73 regulates neurodegeneration and phospho-tau accumulation during aging and Alzheimer's disease**, Neuron, Sep 2008, Vol 59 p708-721

Winnay J. N., Boucher J., Mori M. A., Ueki K., Kahn R., **A regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase increases the nuclear accumulation of X-box binding protein-1 to modulate the unfolded protein response**, Nature Medicine, Feb. 2010, Vol 16 p438-445

Wiseman R. L., Zhang Y., Lee K. P., Harding H. P., Haynes C. M., Price J., Sicheri F., Ron D., **Flavonol activation defines an unanticipated ligand-binding site in the kinase-RNase domain of IRE1**, Mol. Cell., April 2010, Vol 38 p291-304

Wisniewski K., Jervis G. A., Moretz R. C., Wisniewski H. M., **Alzheimer neurofibrillary tangles in diseases other than senile and presenile dementia**, Ann. Neurol., March 1979, Vol 5 p288-294

Woehlbier U., Hetz C., **Modulating stress responses by the UPRosome : a matter of life and death**, Trends Biochem. Sci., June 2011, Vol 36 p329-337

X

Xia W., Yang T., Smith I. M., Shen Y., Walsh D. M., Selkoe D. J., Arch. **A specific ELISA for measuring amyloid β -Protein oligomers in human plasma and the brains of Alzheimer patients**, Neurol., Feb. 2009, Vol 66 p190-199

Xin H., Stephans J. C., Duan X., Harrowe G., Kim E., Grieshammer U., Kingsley C., Giese K., **Identification of a novel aspartic-like protease differentially expressed in human breast cancer cell lines**, Biochim. Biophys. Acta., June 2000, Vol 150 p125-137

Y

Yamamoto K., Sato K., Matsui T., Sato M., Okada T., Yoshida H., Harada A., Mori K., **Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 α and XBP1**, Developmental Cell, Sept. 2007, Vol 13 p365-376

Yamamoto N., Matsubara E., Maeda S., Minagawa H., Takashima A., Maruyama W., Michikawa M., Yanagisawa K., **A ganglioside-induced toxic soluble Abeta assembly. Its enhanced formation from Abeta bearing the artc mutation**, J. Biol. Chem., Jan. 2007, Vol 282 p2646-2655

Yanagisawa K., **Role of ganglioside in Alzheimer's disease**, Biochim. Biophys. Acta, Aug. Jan. 2007., Vol 1768 p1943-1951

Yanagitani K., Imagawa Y., Iwawaki T., Hosoda A., Saito M., Kimata Y., Kohno K., **Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA**, Mol. Cell, April 2009, Vol 34 p191-200

Yang L. B., Lindholm K., Yan R., Citron M., Xia W., Yang X. L., Beach T., Sue L., Wong P., Price D., Li R., Shen Y., **Elevated β -secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer's disease**, Nature medicine, 2003, Vol 9

Yang Y., Turner R. S., Gaut J. R., **The chaperone BiP/GRP78 binds to amyloid precursor protein and decreases Abeta40 and Abeta42 secretion**, J. Biol. Chem., Oct. 1998, Vol 273 p25552-25555

Yasuda Y., Kudo T., Katayama T., Imaizumi K., Misako Y., Masayasu O., Yamamori H., Matsumoto N., Kida T., Fukumori A., Okumura M., Tohyama M., Takeda M., **FAD-linked presenilin-1 mutants impede translation regulation under ER stress**, Biochem. and Biophys. Research and Com., Aug. 2002, Vol 16 p313-318

Ye J., Rawson R. B., Komuro R., Chen X., Davé U. P., Prywes R., Brown M. S., Goldstein J. L., **ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs**, Mol. Cell, Dec. 2000, Vol 6 p1355-1364

Ye Y., Shibata Y., Yun C., Ron D., Rapoport T. A., **A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol**, Nature, May 2004, Vol 429 p841-847

Yoon I. S., Pietrzik C. U., Kang D. E., Koo E. H., **Sequences from the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) Cytoplasmic Domain Enhance Amyloid β Protein Production via the β -Secretase Pathway without Altering Amyloid Precursor Protein/LRP Nuclear Signaling**, The journal of biological chemistry, March 2005, Vol 280 p20140-147

Yoshida H., **ER stress and disease**, FEBS journal, Feb. 2007, Vol 274 p630-658

Yoshida H., Haze K., Yanagi H., Yura T., Mori K., **Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors**, J. Biol. Chem., Dec. 1998, Vol 273 p33741-9

Yoshida H., Matsui T., Hosokawa N., Kaufman R. J., Nagata K., Mori K., **A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response**, Dev. Cell., Feb. 2003, Vol 4 p265-267

Yoshida H., Matsui T., Yamamoto A., Okada T., Mori K., **XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor**, Cell, Dec. 2001, Vol 107 p881-891

Yoshida H., Okada T., Haze K., Yanagi H., Yura T., Negishi M., Mori K., **ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-Acting element responsible for the mammalian unfolded protein response**, Mol. Cell. Biol., Sept. 2000, Vol 20 p6755-6767

Yoshida H., Oku M., Suzuki M., Mori K., J. C. B., **pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response**, Feb. 2006, Vol 172 p565-575

Yoshikai S., Sasaki H., Doh-ura K., Furuya H., Sakaki Y., **Genomic organization of the human beta-protein precursor gene**, Gene, March 1990, Vol 15 p 257-63

Yu Z. F., Luo H., Fu W., Mattson M. P., **The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis : supression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis**, Feb. 1999, Vol 155 p302-314

Z

Zerbinatti C. V., Wahrle S. E., Kim H., Cam J. A., Bales K., Paul S. M., Holtzman D. M., Bu G., **Apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor-related protein facilitate intraneuronal Abeta42 accumulation in amyloid model mice**, J. Biol. Chem., Nov. 2006, Vol 281 p36180-6

Zhang H., Ma Q., Zhang Y., Xu H., Journal of Neurochemistry, **Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein**, 2012, Vol 120 p9-21

Zhang K., Shen X., Wu J., Sakaki K., Saunders T., Rutkowski T., Back S. H., Kaufman R. J., **Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory responses**, Cell, Feb. 2006, Vol 124 p587-599

Zhao G., Cui M. Z., Mao G., Dong Y., Tan J., Sun L., Xu X., **Gamma-cleavage is dependant on zeta-cleavage during the proteolytic processing of amyloid precursor protein within its transmembrane domain**, J. Biol Chem., Nov. 2005., Vol 280 p37689-97

Zhou Y., Lee J., Reno C. M., Sun C., Park S. W., Chung J., Lee J., Fisher S. J., White M. F.,

Biddinger S. B., Ozcan U., **Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction**, Nature Medicine, Feb. 2011, Vol 17 p356-365

Zinszner H., Kuroda M., Wang X. Z., Batchvarova N., Lightfoot R. T., Remotti H., Stevens J. L., Ron D., **CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum**, Genes & Dev., 1998, Vol 12 p982-995

Zuleta A., Vidal R. L., Armentano D., Parsons G., Hetz C., **AAV-mediated delivery of the transcription factor XBP1s into the striatum reduces mutant Huntingtin aggregation in a mouse model of Huntington's disease**, Biochem. and Biophys. Research Com., April 2012, Vol 420 p558-563

Résumé

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative progressive caractérisée au niveau histologique par l'accumulation extra- et intracellulaire de différentes protéines agrégées (appelées amyloïde) dans les tissus cérébraux, entraînant à terme des dysfonctions importantes du circuit neuronal. De fait, la majorité des approches thérapeutiques en développement actuellement consistent à tenter de réduire ou supprimer ces agrégats protéiques. Cependant, la maladie d'Alzheimer est étroitement corrélée au vieillissement, et certaines de ses caractéristiques biologiques sont parfois confondues avec celles du vieillissement non-pathologique. L'une de ces caractéristiques est la diminution des différents mécanismes liés à l'homéostasie protéique (protéostasie). L'hypothèse réalisée au cours de mes travaux est que le rétablissement de ces mécanismes diminués par l'âge constituerait une approche thérapeutique crédible, complémentaire aux approches actuelles, à la pathologie complexe qu'est la maladie d'Alzheimer. C'est en suivant cette optique que je me suis intéressé au rôle et à la régulation de l'un des systèmes majeur du contrôle de la protéostasie : l'UPR (unfolded protein response), et en particulier au facteur de transcription XBP-1s, considéré comme l'une des pièces maîtresses de ce réseau de signalisation cellulaire. Quel rôle peut exercer XBP-1s dans le contexte pathologique de la maladie d'Alzheimer ? Quel contrôle peut-il avoir sur la production et l'accumulation des différents peptides amyloïdogènes, ou sur la machinerie responsable de leur production ? Afin de saisir le contexte de ces questions, une première partie de ce manuscrit sera dédiée aux généralités de la maladie d'Alzheimer ainsi qu'à l'une des hypothèses initiales avancée pour expliquer l'étiologie moléculaire de la pathologie : la cascade amyloïde. Une seconde partie détaillera le métabolisme et la biologie des peptides amyloïdogènes. Enfin, la troisième partie exposera les mécanismes de la protéostasie et leur modulation dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Les résultats que j'ai obtenus et publiés au cours de ma thèse seront ensuite détaillés et interprétés, et viendront soutenir une discussion autour de l'utilisation possible des membres de l'UPR et principalement de XBP-1s en tant que cibles thérapeutiques potentielles.