

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

**IGBMC, INSERM, CNRS, UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**

# THÈSE

Présentée par :

**Maxime Steno SARTORI**

En vue d'obtenir le grade de docteur de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : **Science du vivant**

Spécialité : **Neurosciences**

**Etude *in vivo* de l'impact de la surexpression du gène  
*BIN1* dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer**

**THÈSE codirigée par :**

**Mr. LAPORTE Jocelyn**

Directeur de recherche INSERM, Université de Strasbourg

**Mr. HERAULT Yann**

Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mr. BUEE Luc**

Directeur de recherche CNRS, Université de Lille

**Mr. FLAJOLET Marc**

Professeur associé, Université de Rockefeller, New York

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mme PEREIRA Anne**

Chargée de recherche INSERM, Université de Strasbourg

**Mme MISEREY-LENKEI Stéphanie**

Chargée de recherche CNRS, Université de Paris (PSL)



# Remerciements

---

Je tiens en premier lieu à adresser mes remerciements à Jocelyn Laporte et Yann Hérault de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ce doctorat. A travers la difficulté inhérente à la réalisation d'un projet, qui ne traite pas au premier abord de vos thématiques, vous avez su m'apporter les bases nécessaires à la réflexion. La liberté d'investigation que vous m'avez alloué m'a permis de me sentir plus fusionnel avec *BIN1* qui au-delà de faire partie de mon génome est également ancré, à jamais je l'espère, dans mon esprit.

Je tiens également à exprimer mes remerciements à Jean-Charles Lambert pour les discussions enrichissantes sur la maladie d'Alzheimer et pour cette collaboration qui permettra, j'en suis persuadé, de valoriser au mieux nos travaux.

Aux membres du jury, Luc Buée, Marc Flajolet, Anne Pererira de Vasconcelos et Stéphanie Miserey-Lenkei je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer mes travaux.

Un travail d'écriture ne peut que difficilement se faire seul. Je tiens donc à exprimer ma plus grande gratitude à :

Nora, pour le travail de correction, ton esprit scientifique et pour ton aide sans faille dans la réalisation des figures. Merci pour notre relation durant nos thèses respectives, même dans les moments les plus difficiles. Il est certain que sans toi les choses n'auraient pas été les mêmes.

Marion, pour tes corrections et pour l'apport conceptuel, méthodologique et surtout pour l'amitié qui nous a permis de tenir bon, même si l'obscurité était intense à certains moments.

Mylène, pour tes corrections même si 600 km et 4 années nous séparent depuis la fin du master.

Parce qu'un travail de recherche ne peut jamais se faire seul je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à :

Damien Maréchal, mon Sensei, pour la formation et pour ce que tu es en tant que personne. Merci pour ta bonne humeur, ton dévouement qui était incroyable dans

le laboratoire et pour nos discussions scientifique mais pas que... Je ne peux que regretter notre échec dans la réalisation d'une nuit pizza-Western Blot.

Anne Sophie Nicot, parce que ta connaissance scientifique et ta vision de la ce que doit être la recherche, une belle vision, a fait de toi un élément essentiel au niveau conceptuel, méthodologique et spirituel de mon apprentissage.

Thu Lan, pour ta bonne humeur, pour l'aide conceptuelle et méthodologique réciproque qui nous a permis de faire avancer nos thèses respectives.

Vale, pour ton énergie débordante, tes coups de main et notre volonté parfois obsessionnelle de vouloir comprendre ce modèle *TgBIN1* sous tous ses aspects même si certains nous échappent encore.

Xavière dit zazou, pour l'aide que tu m'as apporté quand la génétique se transformait en un sanctuaire pavé d'obstacle. Pour tous les moments de rire, les répétitions et les séances de notre pièce de théâtre.

Pascal, parce que même si nos chemins prennent une route différente, je te remercie pour ton aide méthodologique, toi qui m'a permis d'en apprendre beaucoup sur ce que signifie la microscopie.

Baptiste dit Baptou, de m'avoir assisté pendant un mois alors que tu étais en master. Tu fus la seule personne que j'ai eu à « encadrer » et ce fut un réel plaisir. La suite nous aura montré que nous avons réussi avec le théâtre, l'association Doctoneuro<sup>1</sup> et la passion commune pour la musique à nouer une forte amitié.

Alexia Menuet, d'avoir réalisé une expérience quand à deux semaines du rendu de ce manuscrit je ne pouvais plus venir manipuler au labo.

Elise Grelet, pour ton apport dans le test *tune!*. Même si celui-ci fut ne fut constitué que d'échecs je te remercie pour cela et pour nos soirées communes.

Belinda Cowling, pour ta bonne humeur et ton apport méthodologique dans le test aurora.

---

<sup>1</sup><https://doctoneuro.wordpress.com/>

Nadia Messaddeq, pour ton expertise dans la microscopie électronique et pour les échanges enrichissants.

Pascal Eberling, Gilles Duval et Luc Negroni pour leurs apports méthodologiques respectifs dans la synthèse de peptides, l'immunisation des lapins, la spectrométrie de masse.

Olivia Wendling et Hugues Jacobs, pour expertise histologique et nos échanges toujours constructifs.

L'ensemble des animaliers, particulièrement Han, pour le soin des souris.

Martin Schwab, pour m'avoir ouvert son laboratoire à Zurich l'espace d'une journée et Martina Maibach de m'avoir assisté pour le prélèvement de MEFs *Rtn4<sup>-/-</sup>*.

Luc Dupuis pour avoir mis à ma disposition des anticorps ciblant RTN4 et une sonde RTN4-GFP.

Michel, Véro, Aline et Johann, pour la transmission nécessaire du savoir entre les générations et nos moments de réflexions.

Perrine, pour nos échanges scientifiques et pour notre duo aux plus hauts postes de l'association Doctoneuro. Pour l'amitié que tu m'as également portée je te remercie.

D'une manière générale je remercie tous ceux que j'ai pu côtoyer durant ce doctorat. Cela comprend l'ensemble du personnel de la plateforme phénotypage de l'ICS, Marie-Christine Birling pour le développement de la souris *TgBIN1* et pour son service « après-vente » ainsi que les deux équipes de recherche dans lesquelles j'ai évolué à différents moments de ma thèse.

Je ne peux me résoudre à ne pas remercier ici toutes les personnes que j'ai eu la chance de rencontrer au travers de notre aventure théâtrale durant mes trois premières années de thèse. Ce fut une période incroyable et l'une des plus marquantes.

Puisque Doctoneuro est une affaire collective dans la transmission des neurosciences et la cohésion, je remercie tous les bénévoles qui se sont impliqués au travail auquel nous avons eu à faire face et qui s'est révélé parfois extrêmement intense #JFSN,

Je tiens en dernier lieu à remercier les plus proches, ma famille qui sait combien je leur dois et les Taluzards pour cette amitié à l'épreuve du temps et des difficultés même les plus tragiques.









# Avant-propos

---

La maladie d'Alzheimer cause, comme toutes les démences qui affectent la mémoire, une perte progressive et irréversible de ce qui nous définit au plus profond de nous. La disparition des souvenirs et de la dignité en font une pathologie qui sépare le patient du reste de la société et le plonge irrémédiablement dans une abîme où la mort est, malheureusement pour l'heure, la seule délivrance. En France, cette pathologie touche près de 3 millions de personnes dont 850 000 de manière directe<sup>1</sup>. Au-delà du besoin de prise en charge des malades par les proches et par notre système médical, la recherche apparaît comme primordiale pour lutter efficacement contre ce fardeau. Malgré plus d'un siècle d'effort mondial, aucun traitement n'est encore curatif.

L'actualité portant sur les traitements de la maladie d'Alzheimer nous montre que le débat entre les autorités, le milieu hospitalier et les associations de patients mène souvent à des mésententes. Ainsi, l'arrêté du 1<sup>er</sup> juin 2018, publié dans le journal officiel par décision de l'actuelle ministre de la santé Agnès Buzyn, entraîne l'arrêt du remboursement de quatre médicaments (Aricept, Ebixa, Exelon, Reminyl et leurs génériques). Cette décision fait suite aux recommandations de 2018 de la Haute Autorité de Santé prônant le remplacement pharmacologique en faveur de la prise en charge cognitive, ce qui est contesté par une partie de la société civile<sup>2</sup>.

La fondation Médéric-Alzheimer considère que le coût financier annuel de la maladie d'Alzheimer représente 5,3 milliards d'euros en France. Si l'aspect financier est dérisoire à la vue de la détresse humaine qu'entraîne cette maladie, il met en valeur la nécessité pour nos sociétés de financer significativement la recherche. A ce titre, je voudrais remercier ici l'Association France Alzheimer, l'Agence Nationale pour la Recherche et l'Université de Strasbourg à travers le fond Paul Mendel d'avoir soutenu ce projet de thèse.

Les travaux présentés dans ce manuscrit tenteront de rapporter l'état actuel des connaissances nécessaires à la compréhension de l'étude réalisée ainsi que des enjeux futurs

---

<sup>1</sup> [www.francealzheimer.org](http://www.francealzheimer.org)

<sup>2</sup> Tribune publiée dans le Figaro « Non au déremboursement des médicaments symptomatiques de la maladie d'Alzheimer » et cosignée par 200 médecins

qu'ils représentent. Cette thèse repose principalement sur l'intrication moléculaire et physiologique des protéines Tau et BIN1, et ce même si les modèles utilisés ne présentent pas d'amyloïdopathie, un marqueur essentiel de la maladie d'Alzheimer. Le doctorat s'est déroulé partagé entre les équipes « physiopathologie des maladies neuromusculaires » et « physiopathologie des aneuploïdies, gène à effet de dose et trisomie 21 » respectivement dirigées par les Dr. Jocelyn Laporte et Dr. Yann Hérault qui ont également co-encadré ces travaux.

Je vous souhaite une agréable lecture.

Figure 1 : Coupe coronale d'un cerveau de souris centrée au niveau de l'hippocampe dorsal.	5
Figure 2 : propagation des DNF dans le cerveau humain et corrélation avec le degré d'atteinte cognitive.	12
Figure 3 : Représentation du gène MAPT, du transcrit primaire et de la production des isoformes de Tau	15
Figure 4 : Polarisation du RMT neuronal.	23
Figure 5 : Tau et la zone AIS-TBD.	27
Figure 6 : Description du modèle htau.	31
Figure 7 : Epissages alternatifs de BIN1.	37
Figure 8 : La dimérisation du domaine BAR permet la formation d'une double hélice amphiphatique.	41
Figure 9 : Interaction intramoléculaire de BIN1-iso1.	42
Figure 10 : Représentation des modifications post-traductionnelles de BIN1.	43
Figure 11 : BIN1 et AMPH1.	45
Figure 12 : Tau, est en mesure de rompre l'interaction CLAP-SH3 et d'interagir avec BIN1-iso1 via son PRD.	52
Figure 13 : Récapitulatif de la lignée de souris dans laquelle une insertion du gène BIN1 humain a été réalisée.	79
Figure 14 : Distance parcourue par les souris Bin1 <sup>-/-</sup> ;TgBIN1 âgées de 3 mois.	81
Figure 15 : Index de reconnaissance chez les souris Bin1 <sup>-/-</sup> ;TgBIN1 âgées de 3 mois.	81
Figure 16 : Test de conditionnement à la peur des souris Bin1 <sup>-/-</sup> ;TgBIN1 âgées de 3 mois	83
Figure 17 : Force et fatigue musculaire des souris Bin1 <sup>-/-</sup> ;TgBIN1 âgées de 4 mois.	84
Figure 18 : Microscopie électronique des nerfs sciatiques de souris Bin1 <sup>-/-</sup> ;TgBIN1 âgées de 4 mois.	85
Figure 19 : Spécificité des anticorps α-BIN1.	86
Figure 20 : Validation de l'anticorps α-CLAP-BIN1.	88
Figure 21 : Index de reconnaissance chez les souris TgBIN1 âgées de 3 et 6 mois .	89
Figure 22 : Impact de BIN1 sur la mémoire spatiale chez les souris mâles TgBIN1 à l'âge de 15 mois.	89
Figure 23 : Architecture dendritique des cellules granulaires chez les souris mâles TgBIN1 âgés de 3 mois.	91
Figure 24 : Microscopie électronique du cortex périrhinal chez les souris TgBIN1 âgées de 15 mois.	92
Figure 25 : Gels de polyacrylamide après migration des produits de Co-IP de BIN1.	93
Figure 26 : Interactome des animaux WT.	94
Figure 27 : Interactome des animaux TgBIN1.	95
Figure 28 : Interactome global des animaux WT et TgBIN1.	96
Figure 29 : Gels de polyacrylamide des produits de Co-IP de BIN1 chez les animaux WT et TgBIN1.	97
Figure 30 : Gels de polyacrylamide des produits de Co-IP de RTN4-A chez les animaux TgBIN1.	98
Figure 31 : PLA sur culture de neurones hippocampiques de souris WT.	98
Figure 32 : Localisation cellulaire de RTN4-A.	99
Figure 33 : Niveau d'expression de RTN4-A en fonction du niveau de BIN1.	100
Figure 34 : Immunomarquage du réticulum endoplasmique de MEF provenant d'animaux WT et TgBIN1.	101
Figure 35 : Co-transfection d'une sonde ciblant le RE et de BIN1-BAR* dans cellules COS.	101
Figure 36 : Transfection de BIN1-BAR* et immunomarquage de RTN4-A dans cellules COS.	102
Figure 37 : Activité locomotrice en champ ouvert pendant 30 minutes des souris htau;TgBIN1 à 3 mois.	105
Figure 38 : Activité locomotrice en champ ouvert pendant 30 minutes des souris htau;TgBIN1 à 6 mois.	106

Figure 39 : Activité locomotrice en champ ouvert pendant 30 minutes des souris htau;TgBIN1 à 9 mois. ____	107
Figure 40 : Activité locomotrice en champ ouvert pendant 30 minutes des souris htau;TgBIN1 à 12 mois. ____	109
Figure 41 : Activité locomotrice en champ ouvert pendant 30 minutes des souris htau;TgBIN1 à 15 mois. ____	110
Figure 42 : Impact de l'âge et du génotype sur l'activité locomotrice des souris htau;TgBIN1. _____	111
Figure 43 : Index de reconnaissance chez les souris htau;TgBIN1 âgées de 3, 6, 9, 12, 15 mois. _____	113
Figure 44 : Impact de BIN1 sur la mémoire spatiale chez les souris htau;TgBIN1 à l'âge de 9 mois. _____	115
Figure 45 : Impact de BIN1 sur la mémoire spatiale chez les souris htau;TgBIN1 à l'âge de 12 mois. _____	116
Figure 46 : Rappel de la mémoire spatiale à très long terme chez les souris htau;TgBIN1 à 15 mois. _____	117
Figure 47 : Apprentissage de la mémoire spatiale chez les souris htau;TgBIN1 à l'âge de 15 mois. _____	118
Figure 48 : Rappel de la mémoire à long terme chez les souris htau;TgBIN1. _____	118
Figure 49 : Test visuo-locomoteur en piscine de Morris chez les souris htau;TgBIN1 _____	119
Figure 50 : Force musculaire des quatre pattes chez les souris htau;TgBIN1 âgées de 15 mois. _____	120
Figure 51 : Coordination motrice sans apprentissage chez les souris htau;TgBIN1 âgées de 15 mois. _____	120
Figure 52 : localisation de Tau dans l'hippocampe chez les souris htau;TgBIN1 âgées de 18 mois. _____	123
Figure 53 : localisation de Tau dans le cortex périrhinal chez les souris htau;TgBIN1 à 18 mois. _____	124
Figure 54 : p-tau soluble au niveau de l'hippocampe chez les souris htau;TgBIN1 à 18 mois. _____	125
Figure 55 : p-tau soluble au niveau du cortex temporal chez les souris htau;TgBIN1 à 18 mois. _____	126
Figure 56 : Anomalies structurelles par microscopie électronique au niveau du fornix à 18 mois. _____	127
Figure 57 : Ultra-structures des axones proximaux de la CA1 _____	128
Figure 58 : Ultra-structures des corps cellulaire de la CA1 _____	129
Figure 59 : Variation de l'expression des protéines Tau (A) et BIN1 (B) dans l'hippocampe et le cortex temporal chez les mêmes souris htau;TgBIN1 âgées de 18 mois. _____	130
Figure 60 : Expression de RTN4-A dans l'hippocampe et le cortex temporal. _____	130
Figure 61 : Activité locomotrice chez les souris htau;Bin1+/- âgées de 3 mois. _____	131
Figure 62 : Index de reconnaissance chez les souris htau;Bin1+/- âgées de 3 mois _____	132
Figure 63 : Variation d'expression de dynamine 2, APP, AMPH1 et AFT6 dans l'hippocampe _____	133
Figure 64 : Variation de l'expression de AMPH1 en fonction de BIN1 et de l'âge _____	134
Figure 65 : Implications fonctionnelles de RTN4 dans l'architecture du réticulum endoplasmique. _____	142
Figure 66 : La surexpression de BIN1-H prévient la polymérisation de Tau au niveau de l'hippocampe _____	158
Figure 67 : BIN1-H préserve les feuillettes de myélines au niveau du fornix avec RTN4-A. _____	166
Figure 68 : BIN1 modifierait la topologie membranaire de RTN4-A _____	167
Figure 69 : Le sauvetage de la myéline par une inhibition de RTN4-A. _____	168
Figure S 1 : Séquences codantes du gène BIN1 contenu dans le clone utilisé. _____	175
Figure S 2 : Chromatogrammes des séquences de la région promotrice du gène BIN1. _____	176
Figure S 3 : Représentation des ARNm de BIN1, en termes d'exons inclus. _____	177
Figure S 4 : Séquence consensus de reconnaissance des domaines SH3 chez RTN4-A _____	177

<i>Figure S 5 : Poids des animaux htau;TgBIN1 à 3, 6, 9, 12 et 15) mois.</i>	178
<i>Figure S 6 : Préférence de place et d'objet lors du test de reconnaissance d'objet</i>	179
<i>Figure S 7 : contrôle des immunomarquages</i>	180
<i>Tableau S 1 : Séquences des amorces PCR utilisées</i>	181
<i>Tableau S 2 : Récapitulatif des anticorps utilisés</i>	181
<i>Tableau S 3 : Séquences des amorces utilisées pour le séquençage des exons de BIN1</i>	182
<i>Tableau S 4 : récapitulatif de des observations sur les potentiels interacteurs de BIN1</i>	183









# Communications & Publications

---

## ARTICLES PUBLIES, AUTRES PROJETS

Differential regulation of MeCP2 and PP1 in passive or voluntary administration of cocaine or food. Bodetto SP, Romieu P, **Sartori M**, Tesone-Coelho C, Majchrzak M, Barbelivien A, Zwiller J, Anglard P. Int J Neuropsychopharmacol. 2014 Dec;17(12):2031-44. doi: 0.1017 / S1461145714000972. Epub 2014 Jun 17.

APOE-Sensitive Cholinergic Sprouting Compensates for Hippocampal Dysfunctions Due to Reduced Entorhinal Input. Bott JB, Héraud C, Cosquer B, Herbeaux K, Aubert J, **Sartori M**, Goutagny R, Mathis C. J Neurosci. 2016 Oct 5;36(40):10472-10486

ASQ1 mutations impair calsequestrin polymerization and cause tubular aggregate myopathy. Böhm J, Lornage X, Chevessier F, Birck C, Zanotti S, Cudia P, Bulla M, Granger F, Bui MT, **Sartori M**, Schneider-Gold C, Malfatti E, Romero NB, Mora M, Laporte J. Acta Neuropathol. 2018 Jan;135(1):149-151. doi: 10.1007/s00401-017-1775-x. Epub 2017 Oct 16.

## ARTICLE EN COURS DE SOUMISSION

**BIN1** genetic risk factor for Alzheimer is sufficient to induce early structural tract alterations in entorhinal cortex-dentate gyrus pathway and related hippocampal multi-scale impairments. Daudin R, Marechal D, Wang Q, Abe Y, Bourg N, **Sartori M**, Loe-Mie Y, Lipecka J, Guerrero C, McKenzie A, Potier B, Dutar P, Viard, J, Lepagnol-Bestel A.M, Winkeler A, Hindié V, Birling MC, Lindner L, Chevalier C, Pavlovic G, Dupuis G, Lévêque-Fort, Diaz J, Davenas, E<sup>1</sup>, Dembele D, Laporte J, Thibault-Carpentier C, Malissen B, Rain J.C, Ciobanu L, Le Bihan D, Zhang B, Herault Y & Simonneau M. Nature communication. (**« Article I : TgBIN1 », page 191**)

Amphiphysin 2 (BIN1) modulation rescues MTM1 centronuclear myopathy and prevents focal adhesion defects. Valentina Maria Lionello, Anne-Sophie Nicot, **Maxime Sartori**, Christine, Pascal Kessler, Suzie Buono, Sarah Djerroud, Nadia Messaddeq, Pascale Koebel, Ivana Prokic, Yann Herault, Norma B. Romero, Jocelyn Laporte, Belinda Cowling. Journal of Clinical Investigation

## ARTICLES EN COURS DE REDACTION

**BIN1** overexpression modulates tauopathy in mice (scientific article). **Maxime Sartori**, ShrutiDesai, Tiago Mendes, Isabelle Landrieu, Damien Maréchal, Devrim Kilinc, Yann Herault, Jean-Charles Lambert, Jocelyn Laporte. **Soumission prévu en novembre 2018**, Nature Neuroscience. (**« Article II : htau;TgBIN1 », page 192**)

BIN1 and RTN4-A/Nogo-A interaction and functions in physiology and diseases (*scientific article*). **Maxime Sartori**, Luc Negroni, Yann Herault, Jocelyn Laporte. En rédaction

#### COMMUNICATIONS ORALES

- **Poster** for department retreat: translational medicine and neurogenetics, Mont Saint Odile 2015. In vivo study of *BIN1*, a novel major gene predisposing to late onset Alzheimer disease. **Maxime Sartori**, Damien Marechal, Marie-Christine Birling, Jocelyn Laporte, Yann Héroult.
- **Poster** for “Journées d’Illkirch” (thematic school, 1 week), Château du Liebfrauenberg 2015. In vivo study of *BIN1*, a novel major gene predisposing to late onset Alzheimer disease. **Maxime Sartori**, Damien Marechal, Marie-Christine Birling, Jocelyn Laporte, Yann Héroult.
- **Poster** for Phenomin (thematic school, 1 week), Château du Liebfrauenberg 2015. In vivo study of *BIN1*, a novel major gene predisposing to late onset Alzheimer disease. **Maxime Sartori**, Damien Marechal, Marie-Christine Birling, Jocelyn Laporte, Yann Héroult.
- **Talk**, for department retreat: translational medicine and neurogenetics, Château du Liebfrauenberg 2016. In vivo study of *BIN1*, impact on Late Onset Alzheimer Disease in mammalian models. **Maxime Sartori**, Damien Marechal, Marie-Christine Birling, Jocelyn Laporte, Yann Héroult.
- **Poster** for FENS (European congress for neuroscience), Copenhagen 2016. In vivo study of *BIN1*, impact on Late Onset Alzheimer Disease in mammalian models. **Maxime Sartori**, Damien Marechal, Belinda Cowling, Ivana Prokic, Marie-Christine Birling, Jean-Charles Lambert, Michel Simonneau, Yann Héroult, Jocelyn Laporte.
- **Talk (third prize)**, for « journée du Neuropôle de Strasbourg », Faculté de médecine 2016. In vivo study of *BIN1* impact on Late Onset Alzheimer. **Maxime Sartori**, Damien Marechal, Marie-Christine Birling, Jocelyn Laporte, Yann Héroult.
- **Talk (first prize)**, for department retreat: translational medicine and neurogenetics, Château du Liebfrauenberg 2017. In vivo study of *BIN1*, impact on Late Onset Alzheimer Disease in mammalian models. **Maxime Sartori**, Damien Marechal, Marie-Christine Birling, Jocelyn Laporte, Yann Héroult.
- **Talk (first prize)**, for “journées de l’école doctorale de Strasbourg (ED414)” 2017. In vivo study of *BIN1*, impact on Late Onset Alzheimer Disease in mammalian models. **Maxime Sartori**, Damien Marechal, Marie-Christine Birling, Jocelyn Laporte, Yann Héroult.
- **Poster** for Neurofrance (France congress for neuroscience), Bordeaux 2017. In vivo study of *BIN1*, impact on Late Onset Alzheimer Disease in mammalian models. **Maxime Sartori**, Damien Marechal, Nadia Messaddeq, Marie-Christine Birling, Jean-Charles Lambert, Michel Simonneau, Yann Héroult, Jocelyn Laporte.

- **Poster** for thematic days of Neurofrance (France congress for neuroscience), Illkirch 2018. *BIN1* and *MAPT* overexpression exacerbates cognitive dysfunction in a mouse model for late-onset Alzheimer's disease. **Maxime Sartori**, Damien Marechal, Luc Negroni, Nadia Messaddeq, Marie-Christine Birling, Jean-Chrales Lambert, Yann Hérault, Jocelyn Laporte.
- **Poster** for FENS (European congress for neuroscience), Berlin 2018. *BIN1* and *MAPT* overexpression exacerbates cognitive dysfunction in a mouse model for late-onset Alzheimer's disease. **Maxime Sartori**, Damien Marechal, Nadia Messaddeq, Marie-Christine Birling, Jean-Chrales Lambert, Yann Hérault, Jocelyn Laporte.
- **Technical talk** for Neurotech (*Doctoneuro*), Strasbourg 2018. Neuronal architecture: Golgi staining, from an old to recent technical approach







# Liste des abréviations

---

AA : acides aminés	CP : cortex périrhinal
Actine F : actine en filament	CPF : cortex préfrontal
Actine G : actine monomérique granulaire	Co-IP : co-immunoprécipitation
AIS : <i>axon initial segment</i>	CCV : <i>clathrin coated vesicles</i>
ALCOVE: <i>Alzheimer COperative Valuation in Europe</i>	DNF : dégénérescences neurofibrillaires
AMPH1 : <i>Amphiphysine 1</i>	EAE : <i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
APOE : Apolipoprotéine E	EOAD : <i>Early Onset Alzheimer Disease</i>
APP : <i>Amyloid precursor protein</i>	ERK: <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
ATF6 : <i>Activating Transcription Factor 6</i>	G3BP : <i>GTPase Activating Protein (SH3 Domain) Binding Protein</i>
BAC : <i>bacteria-derived artificial chromosome</i>	GABA : acide $\gamma$ -aminobutyrique
BACE : <i>beta-site APP cleaving enzyme 1</i>	GD : gyrus denté
BAR : Bin-Amphiphysin-Rvs	GFP : <i>green fluorescent protein</i>
BIN1 : <i>Bridging Integrator 1</i>	GSK3- $\beta$ : Glycogen synthetase kinase 3- $\beta$
C-ter : carboxy-terminale	GWAS : <i>Genome Wide Association Study</i>
CA1, CA2 et CA3 : cornes d'Ammon	iCS : clinique de la souris
CE : cortex entorhinal	IRM : imagerie par resonance magnétique
CDK : <i>cycline dependant kinase</i>	LOAD : <i>Late Onset Alzheimer Disease</i>
CERAD : <i>Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease</i>	MAD : MTM1, Amphiphysine 2 et dynamine 2
CLAP : <i>clathrin and AP2 binding domain</i>	Mag : <i>myelin associated glycoprotein</i>

MAP : *Microtubules Associated Proteins*

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

MAPT : *Microtubule Associated Protein*

*Tau*

Mtap1a : *microtubule associated protein 1a*

MBD : *microtubule binding domain*

MCI : *Mild Cognitive Impairment*

MEF : *mouse embryo-derived fibroblast*

MMSE : *Mini Mental State Examination*

MNBL1 : *Muscleblind Like Splicing Regulator 1*

MOG : *Myelin Oligodendrocytes Glycoprotein*

MS/MS : spectrométrie de masse en tandem

MTM1 : myotubularine 1

NF- $\kappa$ B : *Nuclear Factor Kappa B*

N-ter : NH<sub>2</sub>-terminale

PAC : *P1-derived artificial chromosome*

PBS : tampon phosphate salin

PFA : paraformaldéhyde

PHF : *paired helical filament*

PI : phosphoinositide

PIP : *phosphatidylinositol phosphate*

PLA : *proximity ligation assay*

PRD : *prolin-rich domain*

PSEN : préséniline

RE : réticulum endoplasmique

REG : réticulum endoplasmique granulaire

RMN : résonance magnétique nucléaire

RMT : réseau microtubulaire

ROS : espèces réactives à l'oxygène

RTN : réticulons

SAPK : *stress-activated protein kinase*

Ser : sérine

SRSF1 : *Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1*

SH3 : *SRC Homology 3 Domain*

SNC : système nerveux central

SNP : système nerveux périphérique

TBD : Tau diffusion barrier

Thr : threonine

TNT : *tunneling nanotube*

UPR : *unfolded protein response*

WB : Western Blot



# Table des matières

---

REMERCIEMENTS .....	I
AVANT-PROPOS .....	VII
COMMUNICATIONS & PUBLICATIONS .....	XV
LISTE DES ABREVIATIONS .....	XXI
TABLE DES MATIERES .....	XXIII
ETAT DE L'ART .....	1
<b>I. Diagnostic clinique de la maladie d'Alzheimer .....</b>	<b>1</b>
<b>I. 1. Mémoires affectées par la maladie d'Alzheimer .....</b>	<b>2</b>
1. a. Mémoire épisodique.....	3
1. b. Autres mémoires atteintes.....	4
1. c. L'hippocampe, un circuit neurobiologique de la mémoire.....	4
1. d. Etude de ces mémoires chez le rongeur .....	7
<i>d. i. Test de la reconnaissance d'objets.....</i>	<i>7</i>
<i>d. ii. Test de la piscine de Morris .....</i>	<i>8</i>
<b>I. 2. Marqueurs Histologiques .....</b>	<b>8</b>
2. a. Dépôt amyloïdes .....	9
<i>a. i. Visualisation et identification de l'amyloïde.....</i>	<i>9</i>
<i>a. ii. Aspects génétiques des plaques amyloïdes .....</i>	<i>9</i>
2. b. Dégénérescences neurofibrillaires .....	11
<i>b. i. Visualisation et identification de Tau.....</i>	<i>11</i>
<i>b. ii. Aspects génétiques de MAPT.....</i>	<i>13</i>
<b>II. Physiopathologies associées à Tau .....</b>	<b>14</b>
<b>II. 1. MAPT, un gène soumis à l'évolution.....</b>	<b>14</b>
<b>II. 2. Aspects moléculaire de Tau.....</b>	<b>14</b>
2. a. Structure de Tau .....	14

2. b. Tauopathies et variations du ratio 3R/4R.....	16
2. c. Modifications physiologiques post-traductionnelles .....	17
2. d. Phosphorylation anormale de Tau et agrégation .....	18
2. e. Toxicité cellulaire de Tau .....	20
<b>II. 3. Aspects fonctionnels et physiopathologique de Tau.....</b>	<b>21</b>
3. a. Tau à l'interface du cytosquelette de microtubules et d'actine .....	21
3. b. Polarisation neuronale du RMT et de Tau.....	22
3. c. Tau et le transport axonal.....	23
<i>c. i. Tau et le transport du Réticulum .....</i>	<i>23</i>
3. d. Croissance neuritique .....	24
<b>II. 4. Localisation extra-axonale de Tau .....</b>	<b>25</b>
4. a. Tau et le noyau.....	25
4. b. Tau et les oligodendrocytes .....	25
<i>b. i. Tau et la pathologie de la myéline .....</i>	<i>26</i>
4. c. Effondrement de la barrière et évaison de Tau .....	27
4. d. Propagation synaptique .....	28
<b>II. 5. Le modèle murin htau .....</b>	<b>30</b>
<b>III. Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer à début tardif .....</b>	<b>34</b>
<b>IV. BIN1 .....</b>	<b>36</b>
<b>IV. 1. Isoformes de BIN1.....</b>	<b>36</b>
1. a. Epissage pathologique.....	37
1. b. Aspects génétiques.....	38
1. c. Nomenclature.....	38
<b>IV. 2. Structure de BIN1.....</b>	<b>40</b>
2. a. Domaine BAR.....	40
2. b. Domaine CLAP .....	41
2. c. Domaine SH3 .....	42
2. d. Phosphorylation de BIN1.....	43

IV. 3. BIN1 et le cytosquelette .....	44
3. a. BIN1 et les microtubules .....	44
3. b. BIN1 et l'actine.....	44
3. c. BIN1 à l'interface actine-microtubules .....	45
IV. 4. Impact de la perte du complexe BIN1-AMPH1 .....	45
4. a. Endocytose et transport vésiculaires .....	46
4. b. Croissance neuritique.....	47
4. c. Comportement.....	48
IV. 5. Aspect physiopathologique .....	48
5. a. Myopathies centronucléaires.....	48
5. b. Modulation de l'expression de BIN1 dans la LOAD.....	49
5. c. BIN1 et les oligodendrocytes.....	50
5. d. BIN1 et l'amyloïdogénèse.....	51
5. e. BIN1 et Tau .....	51
5. f. BIN1 et la toxicité de Tau <i>in vivo</i> .....	53
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE RECHERCHE .....	55
MATERIELS & METHODES .....	59
I. Animaux utilisés.....	59
I. 1. Procédures éthiques .....	59
I. 2. Création de la souris TgBIN1 surexprimant le gène BIN1 humain .....	60
2. a. Croisements .....	60
2. b. Identification .....	60
2. c. Génotypage .....	61
II. Design expérimental.....	61
III. Tests comportementaux.....	62
III. 1. Test de l'activité locomotrice (actimétrie) .....	62
III. 2. Test du champ ouvert.....	62

III. 3. Tests de Mémoire.....	63
3. a. Test de la reconnaissance d'objet.....	63
3. b. Piscine de Morris .....	64
III. 4. Test force musculaire .....	65
4. a. Rotarod .....	65
4. b. Grip test.....	65
III. 5. Conditionnement à la peur.....	65
IV. Etudes Moléculaire.....	66
IV. 1. Extraction de protéines .....	66
IV. 2. Co-immunoprécipitation .....	67
IV. 3. Silver staining .....	68
IV. 4. Spectrométrie de masse et analyse.....	68
IV. 5. Western Blot .....	70
V. Etudes cellulaires .....	70
V. 1. Immunofluorescence .....	70
V. 2. Microscopie électronique .....	71
V. 3. Reconstruction de l'arbre dendritique .....	72
3. a. Coloration de Golgi .....	72
3. b. Analyse de Sholl .....	73
V. 4. Etudes interactions <i>In vitro</i> .....	73
4. a. Culture de neurones primaires hippocampiques.....	73
4. b. Proximity Ligation Assay .....	74
4. c. Transfection cellulaire.....	74
<i>c. i. Amplification des plasmides pour transfection cellulaire.....</i>	<i>74</i>
<i>c. ii. Culture de COS et transfection cellulaire.....</i>	<i>75</i>
4. d. Culture de MEF .....	75
V. 5. Extraction des ARNm et transcription inverse .....	76
V. 6. Clonage et séquençage .....	76

VI. Production et validation d'anticorps anti BIN1 .....	77
VII. Analyses statistiques .....	77
RESULTATS .....	78
I. Etude du modèle de surexpression du gène humain <i>BIN1</i> .....	78
I. 1. Validation génétique et moléculaire du modèle .....	78
1. a. Séquençage .....	78
1. b. Choix de la lignée utilisée .....	79
1. c. Validation de l'expression.....	80
I. 2. Validation physiologique et comportementale du modèle .....	80
2. a. Sauvetage du modèle <i>Bin1</i> <sup>-/-</sup> .....	80
a. i. Test du champ ouvert .....	81
a. ii. Test de reconnaissance d'objet .....	81
a. iii. Test du conditionnement à la peur.....	82
a. iv. Test de la force musculaire .....	83
2. b. Etude histologique .....	84
b. i. Microscopie électronique des nerfs sciatiques .....	84
2. c. Epissage alternatif de <i>BIN1</i> .....	86
c. i. Développement d'un anticorps spécifique de l'isoforme neuronale .....	87
c. ii. Western Blot 3497-BAR-BIN1 .....	87
c. iii. Western Blot $\alpha$ -CLAP-BIN1 (3496) .....	87
I. 3. Etude comportementale du modèle TgBIN1 .....	88
3. a. Phénotypes de reconnaissance d'objet.....	88
3. b. Phénotype de mémoire à long terme en piscine de Morris.....	90
I. 4. Etude histologique du modèle TgBIN1 .....	90
4. a. Arborisation dendritique des cellules granulaires du gyrus denté.....	90
4. b. Microscopie électronique du cortex périrhinal à 15 mois.....	91
I. 5. Etude moléculaire et cellulaire du modèle TgBIN1 .....	93
5. a. Interactome préliminaire de BIN1 .....	93

a. i. Profil obtenu en coloration de Coomassie .....	93
a. ii. Interactome des animaux WT .....	94
a. iii. Interactome des animaux TgBIN1 .....	95
a. iv. Interactome global.....	95
5. b. Choix des interacteurs et validation .....	96
b. i. RTN4-A.....	97
b. ii. Autres interacteurs.....	99
b. iii. Impact du niveau de BIN1 sur le niveau de RTN4-A .....	99
<b>I. 6. Etude cellulaire du modèle.....</b>	<b>100</b>
6. a. Phénotypes cellulaires observés dans les MEF .....	100
6. b. Phénotypes cellulaires observés dans les cellules COS .....	101
b. i. Tubulation induite par le domaine BAR de BIN1 .....	101
b. ii. Résumé du modèle TgBIN1.....	102
<b>II. Effets croisés de la surexpression de BIN1 et de MAPT.....</b>	<b>103</b>
<b>II. 1. Etude comportementale longitudinale.....</b>	<b>104</b>
1. a. Activité locomotrice en champs ouvert.....	104
a. i. Activité enregistrée à 3 mois .....	104
a. ii. Activité enregistrée à 6 mois .....	104
a. iii. Activité enregistrée à 9 mois .....	108
a. iv. Activité enregistrée à 12 mois .....	108
a. v. Activité enregistrée à 15 mois .....	108
a. vi. Activité locomotrice globale au cours de l'âge .....	111
1. b. Déficit de reconnaissance d'objet.....	112
1. c. Mémoire spatiale .....	113
c. i. Résultats à 9 mois .....	113
c. ii. Résultats à 12 mois .....	114
c. iii. Résultats à 15 mois .....	116
1. d. Test de coordination et de force musculaire .....	119
d. i. Grip test.....	119
d. ii. Rotarod.....	120

II. 2. Etude histologique et moléculaire des modèles .....	121
2. a. Distribution spatiale de phospho-tau .....	121
a. i. Note sur l'anticorps « Tau total » utilisé.....	121
a. ii. Au niveau hippocampique .....	122
a. iii. Au niveau du cortex périrhinal.....	123
a. iv. Contrôles négatifs .....	124
2. b. Niveau d'expression de certaines formes solubles de Tau .....	125
2. c. Microscopie électronique.....	127
c. i. Fornix .....	128
c. ii. Hippocampe.....	128
2. d. Variation d'expression protéique entre l'hippocampe et le cortex périrhinal....	129
III. Résultats préliminaires .....	131
III. 1. Impact d'une diminution de l'expression de <i>Bin1</i> dans un modèle de tauopathie...	131
1. a. Activité locomotrice en champ ouvert .....	131
1. b. Reconnaissance d'objet.....	132
III. 2. Impact de la variation des niveaux de BIN1 et de Tau sur l'expression protéique....	132
2. a. Chez l'animal âgé .....	132
2. b. Chez l'animal jeune.....	134
DISCUSSION .....	135
I. Impact de la surexpression du gène <i>BIN1</i> humain .....	135
I. 1. Caractéristiques génétiques .....	135
I. 2. Expression de <i>BIN1</i> au niveau cérébral.....	136
I. 3. Activité physiologique de <i>BIN1</i> chez la souris .....	138
I. 4. <i>BIN1</i> , <i>RTN4-A</i> et modelage du réticulum.....	139
4. a. <i>BIN1</i> et le réticulum <i>ex vivo</i> .....	140
4. b. <i>BIN1</i> , un modulateur de la réponse au stress cellulaire ?.....	143
I. 5. <i>BIN1</i> , <i>RTN4-A</i> et modelage membranaire.....	144
5. a. <i>BIN1</i> et la myéline .....	144

5. b. BIN1 et l'architecture neuritique du gyrus denté .....	144
I. 6. Mémoire à court terme et nécrose neuronale .....	146
I. 7. BIN1, des isoformes soumises à un ratio équilibré ?.....	147
II. Effets croisés de la surexpression de <i>BIN1</i> et de <i>MAPT</i> .....	149
II. 1. Etudes comportementales .....	149
1. a. BIN1 ne module pas l'activité locomotrice perturbée par Tau .....	149
1. b. <i>BIN1</i> et <i>MAPT</i> ont un effet synergique négatif sur la mémoire à court terme ...	152
1. c. <i>BIN1</i> préserve la mémoire spatiale à long terme .....	152
II. 2. <i>BIN1</i> prévient les effets toxiques de Tau au niveau cellulaire .....	155
2. a. La surexpression de <i>BIN1</i> prévient les inclusions intracellulaires de Tau .....	155
a. i. Variations d'expression de Tau induite par <i>BIN1</i> .....	159
a. ii. Variation d'expression de <i>BIN1</i> entre l'hippocampe et le cortex temporal.....	160
a. iii. Autres variations moléculaires induites par <i>BIN1</i> au niveau de l'hippocampe	162
2. b. Tau et le réseau microtubulaire .....	163
2. c. BIN1 est un acteur essentiel dans les processus de myélinisation.....	163
c. i. La surexpression de <i>BIN1</i> préserve les fibres du fornix des effets de Tau.....	163
c. ii. Le complexe <i>BIN1-RTN4</i> pourrait réguler l'ultrastructure de la myéline .....	165
III. Impact <i>in vivo</i> de la diminution d'expression de <i>Bin1</i> sur les phénotypes Tau .....	169
IV. Implication du sexe dans la modélisation de la maladie d'Alzheimer .....	170
CONCLUSION GENERALE.....	172
ANNEXES .....	175
I. Figures supplémentaires .....	175
II. Tableaux supplémentaires.....	181
III. Glossaire des interacteurs potentiels de <i>BIN1</i> isolées par MS/MS .....	184
IV. Articles .....	191
IV. 1. Article I : Tg <i>BIN1</i> .....	191
IV. 2. Article II : htau;Tg <i>BIN1</i> .....	192
BIBLIOGRAPHIE.....	269











# Etat de l'art

---

En 1901, le docteur Alois Alzheimer décrit pour la première fois le cas clinique de la patiente Auguste Deter qui présentait une démence associée à une perte de mémoire. En 1906, le cerveau atrophie de cette patiente présentait des dépôts, à la fois au niveau intra- et extracellulaire, lors de sa caractérisation histologique par des sels d'argent ([Alzheimer 1907](#)). La présence de ces dépôts, constitués de protéines amyloïdes et Tau, est essentielle à l'établissement du diagnostic clair de la maladie d'Alzheimer. Ces marqueurs de la pathologie sont retrouvés dans les régions sous-corticales et limbiques ainsi qu'à un stade tardif dans l'ensemble du cortex et le cervelet à un stade tardif.

Dans cette introduction, nous détaillerons les signes cliniques associés à la maladie d'Alzheimer et comment nous examinons l'intégrité de ces fonctions cognitives chez l'animal. Nous établirons ensuite l'état des connaissances actuelles sur les causes moléculaires et génétiques à l'origine des dépôts observés et comment nous pouvons modéliser leur genèse chez la souris.

## I. Diagnostic clinique de la maladie d'Alzheimer

Dans la grande majorité des cas, c'est la présence d'oublis successifs et nuisant donc au bon déroulement de la vie quotidienne qui alerte en premier lieu la personne atteinte et/ou son entourage. De ce fait, la première étape clinique est de déterminer l'état de la mémoire chez le patient. Les praticiens hospitaliers ont alors recours à des tests cognitifs comme le MMSE<sup>1</sup> ou le CERAD<sup>2</sup> ([Jahn 2013](#); [Yogev and Shen 2017](#)). Ces tests à eux seuls ne permettent pas de poser le diagnostic de la maladie affectant le patient mais déterminent seulement le niveau d'atteinte cognitive. Ainsi, l'examen clinique uniquement *via* des tests psycho-cognitifs présente une quasi-impossibilité de diagnostiquer la maladie d'Alzheimer à un stade précoce ([Smith et al. 2018](#)). Les patients qui présentent un score moyen-faible à ces tests sont alors en phase de déclin cognitif modéré (MCI<sup>3</sup>). Cependant, ces tests ne sont pas forcément centrés sur le type de mémoires affectées par la maladie d'Alzheimer ([Petersen et al. 1999](#)). Des tests

---

<sup>1</sup> De l'anglais, *Mini Mental State Examination*

<sup>2</sup> De l'anglais, *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*

<sup>3</sup> De l'anglais, *Mild Cognitive Impairment*

supplémentaires et relatifs à la mémoire épisodique, la première à être atteinte dans la pathologie, doivent donc être menés.

D'autres symptômes non spécifiques de la maladie d'Alzheimer sont également observés de manière hétérogène. Ainsi, on peut observer une altération des fonctions exécutives supérieures, définies par la capacité abstraite à planifier, organiser et adapter les connaissances actuelles et passées en fonction du comportement futur (*Swanberg et al. 2004*). Nous pouvons également noter la présence de comportements agités (50% des patients en centre de soins spécialisés), anxieux, dépressifs, voire agressifs mais aussi des désordres du sommeil, des états psychotiques et des comportements moteurs aberrants (*Lyketsos et al. 2011*).

Lorsque l'ensemble des signes cliniques permettent aux médecins de suspecter la maladie d'Alzheimer, ils cherchent alors par imagerie cérébrale ou par analyse du liquide céphalo-rachidien des signes de lésions pathologiques pouvant appuyer le diagnostic (**voir partie I. 2. Marqueurs Histologiques, page 8**). Pour autant, ces analyses ne sont pas recommandées pour un dépistage précoce de la pathologie en l'absence d'atteintes cognitives par l'Union Européenne. En effet, l'incurabilité de la maladie d'Alzheimer entraîne de surcroît un questionnement éthique sur la nécessité d'alerter une personne encore saine d'esprit de ce qui risque de lui arriver, comme le mentionne le rapport de l'ALCOVE (*Alzheimer COperative Valuation in Europe*).

### I. 1. Mémoires affectées par la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer présente une atteinte séquentielle de l'ensemble des formes de mémoires<sup>1</sup> présente mémoire présentes chez l'être humain. Celles-ci se différencient en quatre grandes catégories : la mémoire épisodique, la mémoire de travail, la mémoire sémantique et la mémoire procédurale. Chacune de ces mémoires est supportée par un réseau neuronal plus ou moins étendu anatomiquement. Elles présentent également des intrications qui sont encore en débat avec un continuel renouvellement de nomenclatures et de définitions.

---

<sup>1</sup> Faculté d'enregistrer, de conserver et de restituer des informations d'un passé proche ou lointain

### 1. a. Mémoire épisodique

La mémoire épisodique, également appelée mémoire autobiographique, est une mémoire déclarative<sup>1</sup> qui permet de rappeler des souvenirs à court ou très long terme<sup>2</sup>. Elle se caractérise par la possibilité de se rappeler de trois éléments, le « quand », le « quoi » et le « où » (*Moscovitch et al. 2016*). Ainsi la mémoire épisodique permet de visualiser une scène avec ses protagonistes et ses éléments spatio-temporels. L'ensemble de ces trois éléments est détecté à l'origine par nos cinq sens. Si l'on prend l'exemple de la vision, l'image formée au niveau de la rétine est véhiculée par le nerf optique vers le thalamus avant d'atteindre le cortex visuel où elle sera reconstituée (*Moscovitch et al. 2016*). Cette image transitera ensuite par l'hippocampe qui, en fonction de divers éléments comme la valence émotionnelle associée, induira ou non le stockage de l'image notamment au niveau du cortex visuel (*Moscovitch et al. 2016*). Un exemple de valence émotionnelle influençant les processus de mémorisation est l'attentat du World Trade Center le 11 septembre 2001. Une grande majorité de ceux qui ont eu l'âge de vivre cet événement ne serait-ce que télé-visuellement, sont en mesure de se rappeler ce qui s'est passé, à quel moment de la journée et où ils étaient. Lorsque l'on souhaite se remémorer une information de manière consciente, comme l'image préalablement acquise, c'est le cortex préfrontal (CPF) qui sollicite, avec l'aide de l'hippocampe, les réseaux neuronaux où sont stockés le souvenir et qui sont également appelés *connectome*. Le rappel récurrent d'un élément mnésique entraîne une augmentation de la consolidation du connectome supportant l'information et peut rediriger les voies d'accès. Lorsqu'on les sollicite, les réseaux du CPF et du cortex visuel permettent alors la restitution d'une trace mnésique indépendamment de l'hippocampe (*Moscovitch et al. 2016*). Ainsi, une résection bilatérale de l'hippocampe et des régions para-hippocampiques, incluant une partie des lobes temporaux, chez le célèbre patient Henry Gustav Molaison anonymisé H.M., a entraîné une abolition de la capacité à créer de nouveaux souvenirs. Cette abolition de la mémoire post-opératoire est appelée perte de la mémoire antérograde. Cependant, H.M. ne présentait que peu de difficultés à rappeler les souvenirs dits rétrogrades, formés avant l'opération (*Corkin 2002*). L'hippocampe n'est donc pas un centre de stockage à proprement parler mais est plutôt considéré comme un centre d'aiguillage de la mémoire

---

<sup>1</sup> La notion de mémoire déclarative, aussi appelée mémoire explicite, signifie la possibilité pour un sujet de restituer des informations de manière consciente et par le langage

<sup>2</sup> Plusieurs dizaines d'années à toute une vie

épisodique (*Moscovitch et al. 2016*). Il permet de restituer, avec une haute résolution, le cadre spatio-temporel du souvenir comme nous allons le voir.

#### 1. b. Autres mémoires atteintes

La mémoire de travail est affectée de manière relativement précoce dans la maladie d'Alzheimer (*Huntley and Howard 2010*). Elle nous permet de retenir des informations sur une durée relativement courte afin d'effectuer une tâche spécifique comme noter un numéro de téléphone. La mémoire de travail sollicite chez l'humain le CPF dorso-latéral, le cortex pariétal et le cortex cingulaire antérieur (*Moser et al. 2017*).

Au cours de la maladie, la mémoire sémantique sera atteinte (*Giffard et al. 2001*). Cette autre forme de mémoire déclarative ne nécessite pas le rappel du « où » et du « quand » mais uniquement du « quoi ». Ainsi, on sait que la déclaration des droits de l'Homme et du citoyen a été éditée en 1789 sans pour autant se souvenir d' « où » et de « quand » nous l'avons mémorisée. Chez l'humain, cette mémoire serait en grande partie soutenue par le lobe pariétal inférieur et le lobe temporal. Elle présente également en imagerie *in vivo* l'activation de l'hippocampe (*Binder and Desai 2011*). .

Enfin, à un stade avancé de la maladie d'Alzheimer, la mémoire procédurale est altérée (*Hirono et al. 1997*). Cette mémoire qui nous permet de ne jamais oublier comment faire du vélo, est soutenue par le néocortex, les noyaux de la base et le cervelet. L'atteinte à un stade très tardif de la pathologie explique pourquoi les patients qui ne se souviennent pas du nom de leurs proches peuvent toujours jouer au piano un air appris des années auparavant.

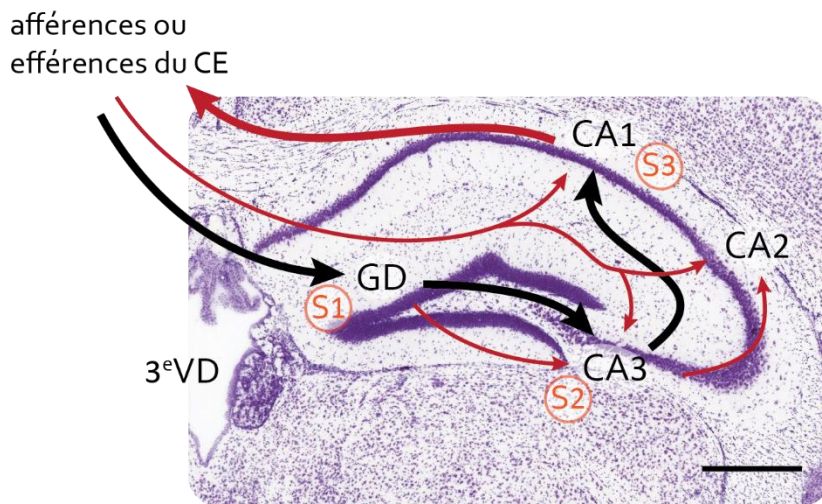
#### 1. c. L'hippocampe, un circuit neurobiologique de la mémoire

Cet hippocampe tel que nous le considérerons dans ce manuscrit se compose des cornes d'Ammon (CA1, CA2 et CA3) et du gyrus denté (GD) (**Figure 1** ; (*Knierim 2015*).

La majorité des entrées axonales proviennent du cortex entorhinal (CE) qui est anatomiquement et fonctionnellement composé d'une partie médiane et latérale. Notons que la partie latérale est connectée au cortex périrhinal (CP) qui est lui-même connecté à certaines aires primaires et associatives comme le cortex visuel (*Keene et al. 2016*). Ce complexe temporal formé, de façon non exhaustive, par le CE latéral et le CP permet



notamment la représentation des objets et des éléments spatiaux où ont été rencontrés ces objets (Keene et al. 2016).



**Figure 1 :** Coupe coronale d'un cerveau de souris centrée au niveau de l'hippocampe dorsal. Le schéma classique de la boucle tri-synaptique composée du cortex entorhinal (CE), du gyrus denté (GD) et des cornes d'Ammon (CA) est représenté par les flèches noires avec les synapses (S1, S2 et S3) en bleu. La voie de sortie de l'hippocampe via le subiculum ainsi que les rétroprojections du CE vers l'hippocampe sont représentées en rouge. 3° VD : 3° ventricule dorsal. Echelle : 500 µm. Coloration au crésyl violet tiré de l'atlas de souris : [atlas.brain-map.org](http://atlas.brain-map.org)

Ces fibres axonales excitatrices du CE projettent vers l'hippocampe, et notamment le GD, qui constitue la synapse n°1 (**Figure 1**). Le GD est composé d'une couche granulaire dans laquelle se trouvent des neurones matures qui présentent leurs arbres dendritiques au niveau de la couche moléculaire et réceptionnent les informations provenant du CE (Knierim 2015). Le GD permet notamment la discrimination de motifs similaires. Cette capacité est appelée *pattern separation* et repose sur la capacité des réseaux neuronaux du GD à former un nouveau connectome pour chaque environnement ou objet similaire (Drew, Fusi, and Hen 2013). Cette fonction reposerait sur une possible capacité de la zone sous granulaire du GD à présenter une neurogénèse adulte à la fois chez la souris (Bordiuk et al. 2014) et l'être humain (Bergmann, Spalding, and Frisen 2015). Ces données relatives à la présence d'une neurogénèse adulte chez l'humain sont sujettes à controverse. Une étude récente clame que cette neurogénèse est restreinte à la première année post-natale chez les primates et disparaît chez l'être humain dès l'adolescence (Sorrells et al. 2018). Par ailleurs, les études concernant cette neurogénèse hippocampique chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer à un stade précoce ou sévère sont contradictoires (Martinez-Canabal 2014).

Après intégration des informations du CE, les cellules granulaires du GD projettent à travers les fibres moussues vers la CA3 pour former la synapse n°2 (**Figure 1**). Puis les neurones de CA3, projettent à travers les collatérales de Schaffer vers la CA1 pour former la synapse n°3 (**Figure 1**). Et c'est au niveau de la CA1 que l'intégration de la représentation spatiale s'opère (*O'Keefe and Dostrovsky 1971; Morris et al. 1986; Tsien, Huerta, and Tonegawa 1996*). Les neurones qui composent la CA1 sont appelés à juste titre « cellules de lieux » et encodent la localisation de l'individu. Lorsque le sujet se trouve à une position A, une sous-population A de neurones sera activée. À une position B, ce sera la sous-population B, etc. Avec un nombre limité de neurones, cette structure opère donc une sélection neuronale minimale pour encoder la position spatiale et un même neurone peut participer à différents encodages spatiaux. Par exemple, un rat dans un nouveau labyrinthe activera succinctement pour la première fois les réseaux B, A, C et D. Ces mêmes réseaux seront de nouveau activés dans le même ordre (B, A, C, D) si le rat emprunte le même chemin lors du second passage dans le labyrinthe et même durant le sommeil (*O'Neill, Senior, and Csicsvari 2006*).

Les informations, après traitement hippocampique, sont ensuite principalement redirigées vers le CE à travers le subiculum, composé de fibres axonale et représente un élément de la matière blanche (**Figure 1**). Le schéma classique et linéaire CE, GD, CA3, CA1 est appelé boucle tri-synaptique et ne représente qu'une partie des réseaux complexes prenant place dans l'hippocampe. En effet, il est important de mentionner que les informations provenant du CP peuvent être transférées vers l'hippocampe de manière directe et donc sans implication du CE et GD (*Knierim 2015*). Le CE connecte également de façon directe la CA1, la CA2, la CA3 et le GD par rétroprojection *via* le subiculum. De la même manière, les axones des neurones de la CA3 qui projettent sur la CA1 envoient également des collatérales sur d'autres neurones de la CA3 et des neurones du GD (*Knierim 2015*). La CA2, qui fut longtemps considérée comme une simple zone de transition, apparaît désormais comme une zone anatomique effectuant des intégrations computationnelles qui lui sont propres (*Jones and McHugh 2011*). Parmi les différences évolutives inter-espèces de cette structure nous pouvons mentionner la discrimination de l'axe antéro-postérieur de l'hippocampe chez les primates qui est retrouvée au niveau dorso-ventral chez les rongeurs. La partie postérieure (dorsale chez le rongeur) est associée à la cognition spatiale alors que la partie antérieure (ventrale chez le rongeur) est quant à elle principalement impliquée dans la valence cognitive émotionnelle, bien qu'elle

apporte également sa contribution dans la mémoire spatiale (Loureiro et al. 2012). Par ailleurs, une latéralisation fonctionnelle de l'hippocampe a été retrouvée chez le rat (Klur et al. 2009). Elle est retrouvée défaillante en imagerie *in vivo* chez les patients présentant un état MCI notamment au niveau du CE (Long et al. 2013). Dans la suite des travaux de thèse, nous nous focaliserons uniquement sur l'hippocampe dorsal des souris sans distinction de latéralité.

### 1. d. Etude de ces mémoires chez le rongeur

Comme nous l'avons vu, chez les patients atteints par la maladie d'Alzheimer, la mémoire épisodique est l'une des premières mémoires à être détériorée. Ainsi, il apparaît important d'étudier le circuit déterminant dans cette mémoire, qui implique notamment le CE, le CP et l'hippocampe (**voir partie I. 1. c. L'hippocampe, un circuit neurobiologique de la mémoire, p. 1**). Chez les rongeurs, plusieurs tests cognitifs examinent, en partie, l'intégrité de cette mémoire. Ici seront détaillés les tests de la reconnaissance d'objets et de la piscine de Morris. La réussite de ces deux tests nécessite également l'intégrité de la mémoire de travail.

#### *d. i. Test de la reconnaissance d'objets*

Le test de la reconnaissance d'objets repose sur la préférence naturelle des rongeurs à explorer un élément nouveau dans un environnement connu. Il consiste à exposer l'animal à deux objets identiques durant un certain temps, généralement de 10 minutes. Après une latence plus ou moins grande, la phase de test dans laquelle un des deux objets est changé est mise en place. Un temps plus important passé à explorer le nouvel objet durant cette phase de test indique le rappel mnésique de l'ancien objet. Dans le cas où le paradigme expérimental se fait sans modification spatiale des objets, ce test fait donc appel aux notions du « quoi » et du « quand » (Pause et al. 2013). Ce test, avec une heure de rétention, met en jeu une forme de mémoire à court terme qui impliquerait en grande partie le CP chez le rat (Olarte-Sanchez et al. 2015). Une revue recense chez le rat, l'implication de l'hippocampe à court terme (1 heure), à long terme (1 jours) mais pas à très court terme (10 secondes ou 10 min) (Clark, Zola, and Squire 2000). Les études sur les circuits neuro-anatomiques primordiaux, entre l'hippocampe et le CP, dans la sollicitation de cette forme de mémoire chez le rongeur sont encore en étude.

*d. ii. Test de la piscine de Morris*

Le test de la piscine de Morris repose sur la volonté des animaux à s'échapper d'une situation déplaisante. Les animaux doivent donc s'orienter dans une enceinte remplie d'eau rendue opaque, afin de localiser et de mémoriser l'emplacement de leur seule échappatoire constituée d'une plateforme immergée et donc cachée. Ce test de mémoire spatiale requiert donc le rappel du « quoi » et du « où ». Dans notre paradigme expérimental, les souris ont été déposées à une position aléatoire à chaque essai. Cette procédure permet de s'affranchir de la mémoire égocentrique, basée sur une succession de séquence motrice et d'indices proximaux, qui est principalement supportée par le striatum dorsal (*Vorhees and Williams 2014*). Les souris devront se baser uniquement sur l'orientation par rapport à des indices distaux et donc sur leur mémoire dite allocentrique. Celle-ci est notamment supportée par l'hippocampe dorsal et le CE. Par ailleurs, le test de rappel effectué 24 heures après la dernière session d'apprentissage, est représentatif d'une mémoire à long terme (*Vorhees and Williams 2014*).

## I. 2. Marqueurs Histologiques

La maladie d'Alzheimer est due à une neurodégénérescence du système nerveux central (SNC). Néanmoins, pour poser le diagnostic de la pathologie, la présence de deux marqueurs est essentiel : les dépôts amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires, causés respectivement par les protéines APP<sup>1</sup> et Tau. Il est aujourd'hui admis que les processus pathologiques entraînant l'apparition de ces marqueurs, se produisent des dizaines d'années avant l'apparition de troubles cognitifs (*Jahn 2013*). Notons que, d'après le moteur de recherche américain PubMed sur le site du NCBI<sup>2</sup>, les mots clés « amyloid Alzheimer » et « tau Alzheimer » permettent d'obtenir respectivement près de 32 000 et 10 000 références. Il apparait donc que la recherche internationale s'est majoritairement focalisée sur la protéine APP. Je tenterai de donner des bases explicatives à ce biais et d'expliquer pourquoi le travail de recherche et de thèse s'est focalisé prioritairement dans un contexte de tauopathie.

---

<sup>1</sup> De l'anglais *Amyloid precursor protein*

<sup>2</sup> De l'anglais, *National Center for Biotechnology Information*

L'impact d'une surexpression de *BIN1* dans un modèle murin développant des plaques amyloïdes est en cours d'étude par la Dr Monica Rataj Baniowska dans l'équipe du Dr Yann Hérault.

## 2. a. Dépôt amyloïdes

### *a. i. Visualisation et identification de l'amyloïde*

En 1906, les plaques séniles ont pour la première fois été caractérisées grâce à leur propriété argyrophile<sup>1</sup> dans des cerveaux humains *post-mortem* (*Alzheimer 1907*). C'est seulement au cours des années 80 que l'amyloïde fut identifiée comme composant principal de ces plaques séniles (*Masters et al. 1985*). Aujourd'hui, les avancées techniques de l'imagerie médicale nous permettent de visualiser *in vivo* la présence de ces plaques. Ainsi l'utilisation du « *Pittsburg compound B* », un analogue radioactif de la thioflavine T, permet la visualisation en tomographie par émission de positons, des plaques amyloïdes dans le tissu cérébral (*Jack et al. 2013*). Une étude menée sur une période de six ans chez des personnes contrôles ou présentant un MCI montre une progression sigmoïdale du nombre de plaques en fonction du temps même si les sujets ne présentent pas d'atteinte cognitive. Ainsi, entre 20 à 30% des personnes âgées cognitivement normales présentent ces dépôts. Il apparait donc que même si le pronostic cognitif est moins favorable que pour les personnes ne présentant pas ces dépôts, le marqueur amyloïde sous forme de plaques n'est aujourd'hui que faiblement corrélé aux performances cognitives et au volume cérébral (*Chetelat et al. 2013*).

### *a. ii. Aspects génétiques des plaques amyloïdes*

A différents moments de l'histoire de l'Homme, les civilisations rencontrèrent des révolutions technologiques qui métamorphosèrent radicalement notre façon de vivre, de penser et de conceptualiser le futur. L'écriture, la culture agricole, l'imprimerie et la révolution industrielle sont autant de marques révélatrices du passage d'un chapitre à l'autre de notre Histoire commune. Parmi ces révolutions, la génétique repoussa les questionnements existentiels. Qui sommes-nous ? D'où venons-nous ? Et où allons-nous ?

Avec la découverte de l'ADN et l'émergence de son séquençage, notre connaissance sur l'origine de certaines maladies a été amplifiée de manière exponentielle. Dans la longue liste

---

<sup>1</sup> Qui présente une propension à se lier avec l'argent

des maladies héréditaires, la maladie d'Alzheimer ne sort pas en reste avec la présence de 32, 179 et 14 mutations autosomales dominantes à pénétrance totale situées respectivement dans les gènes *APP*<sup>1</sup>, *PSEN1*<sup>2</sup> et *PSEN2*<sup>2</sup> (*O'Brien and Wong 2011*). Ces trois gènes sont impliqués dans le métabolisme de l'amyloïde. Leurs expressions favorisent le clivage de la protéine APP au niveau des sites peptidiques  $\gamma$ 40 et  $\gamma$ 42 entraînant la formation des peptides respectifs A $\beta$ 40 et 42. Ces peptides, au niveau intra- et extracellulaire, se présentent sous différentes formes : libre, en polymères ou agrégés en plaque (*O'Brien and Wong 2011*). La succession d'événements pathologiques qui leur sont liés est appelée « cascade amyloïde ». L'amyloïdopathie favorise des processus allant de la toxicité cellulaire jusqu'à la réaction inflammatoire (*O'Brien and Wong 2011*).

Chez les patients porteurs de mutations touchant les gènes *APP*, *PSEN1* ou *PSEN2*, le déclin cognitif est observé avant l'âge de 65 ans (*Haines 2018*). Un cas précoce débutant aux alentours de la trentaine a même été rapporté<sup>3</sup>. Par ailleurs, la localisation du gène *APP* sur le chromosome 21 entraîne l'émergence précoce de la maladie d'Alzheimer dans environ 4 à 55% des personnes présentant un syndrome de Down (trisomie 21) et âgées d'une quarantaine d'années (*Head et al. 2012*). Les formes précoces du déclin cognitif ont abouti à communément appeler la maladie d'Alzheimer « cas familiaux », « à début précoce » ou encore en anglais « *Early Onset Alzheimer Disease* » (EOAD). Ces cas EOAD représentent moins de 1% de l'ensemble des patients (*Ridge et al. 2016*). Ainsi, la très grande majorité des patients ne présentent pas de mutation et sont atteints par une forme tardive communément appelée « cas sporadiques », « à début tardif » ou encore en anglais « *Late Onset Alzheimer Disease* » (LOAD). Dans la suite de ce manuscrit je ferai mention de ces formes par leurs acronymes anglais EOAD et LOAD.

Alors que des mutations de Tau sont liées à des maladies neurodégénératives, aucune mutation dans le gène *MAPT*<sup>4</sup> n'a pour l'instant été identifiée dans la maladie d'Alzheimer (**voir partie I. 2. b. ii. Aspects génétiques de *MAPT*, p. 13**). L'apparition des formes EOAD a

---

<sup>1</sup> Protéine précurseur de l'amyloïde

<sup>2</sup> Préséniline 1/2

<sup>3</sup> [www.bbc.com/news/health-31807961](http://www.bbc.com/news/health-31807961), « I'm 39 and I have Alzheimer's disease »

<sup>4</sup> De l'anglais *Microtubule Associated Protein Tau*

entraîné des théories qui centrent le début de la pathologie autour de processus intimement liés à l'amyloïdogénèse.

## 2. b. Dégénérescences neurofibrillaires

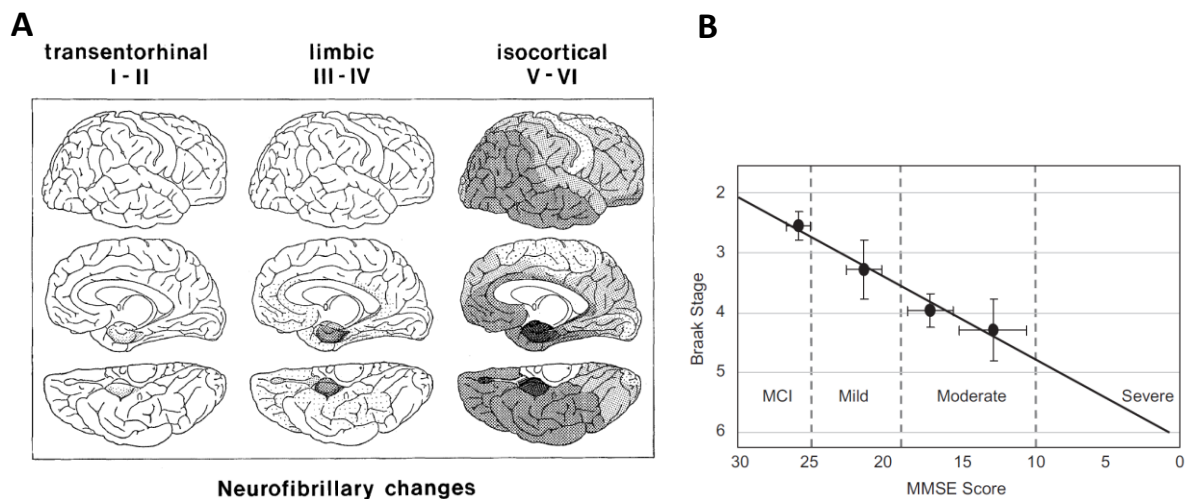
### *b. i. Visualisation et identification de Tau*

Le Dr Aloïs Alzheimer a également décrit la présence *post-mortem* de dégénérescences neurofibrillaires (DNF) chez des cerveaux de patients atteints par la pathologie ([Alzheimer 1907](#)). Ces DNF sont caractérisées par une accumulation d'agrégats, enchevêtrés en paires de filaments en hélices (PHF<sup>1</sup>), majoritairement au niveau du compartiment somatique des neurones ([Schachter and Davis 2000](#)). L'utilisation d'anticorps ciblant la protéine Tau ainsi que l'étude par clonage ([Grundke-Iqbal et al. 1986](#); [Goedert et al. 1988](#)) ont identifié cette protéine Tau comme un élément central de ces agrégats. La protéine Tau fut découverte en 1975 et nommée en référence à sa capacité à induire la formation de microtubules à partir de tubuline ([Weingarten et al. 1975](#)). Les travaux menés en 1991 par le couple Eva et Heiko Braak ont abouti à la classification des degrés d'atteinte du cerveau par ces DNF, après analyses *post-mortem* ([Braak and Braak 1991](#)). Cette échelle de 1 à 6, toujours utilisée, détermine la sévérité et l'étendue anatomique des lésions induites par les DNF. Celles-ci évoluent depuis les régions trans-entorhinal, composées principalement du CE et du CP (stade 1 et 2), à l'hippocampe (stade 3 et 4) puis jusqu'à l'ensemble du cortex (stade 5 et 6 ; Figure 2). La présence de ces DNF en *post-mortem* est corrélée au degré de sévérité des atteintes cognitives mesurées par MMSE (**Figure 2** ; [Wischik, Harrington, and Storey 2014](#)). Un nouveau ligand<sup>2</sup> des DNF a été développé afin de pouvoir les visualiser en tomographie par émission de positon. Cette technique prometteuse montre une corrélation entre la localisation anatomique et l'intensité du marquage cérébral avec l'atteinte cognitive ([Hostetler et al. 2016](#); [Pascoal et al. 2018](#)). En combinaison du *Pittsburg Compound B* ciblant les plaques amyloïdes, il deviendrait alors possible d'établir *in vivo* un diagnostic clair de la maladie d'Alzheimer en s'affranchissant des autopsies ([Hostetler et al. 2016](#); [Pascoal et al. 2018](#)).

---

<sup>1</sup> De l'anglais, *paired helical filament*

<sup>2</sup> 18F-MK-6240



**Figure 2 : propagation des DNF dans le cerveau humain et corrélation avec le degré d'atteinte cognitive.** Les DNF sont représentés en nuances de gris (A) et une corrélation est retrouvée entre les stades de Braak identifiés en *post-mortem* et l'atteinte cognitive mesurée par MMSE (B). D'après (Braak and Braak 1991; Wischik, Harrington, and Storey 2014)

Ces lésions histologiques ne sont cependant pas spécifiques de la maladie d'Alzheimer. Elles sont retrouvées dans d'autres formes de tauopathie induite par la mutation de *MAPT*, comme la paralysie supranucléaire progressive et la démence fronto-temporale, mais ces pathologies présentent toutefois une évolution spatio-temporelle différente par rapport à la maladie d'Alzheimer (Knibb, Kipps, and Hodges 2006). Le stade cellulaire final induit par la pathologie Tau est la mort neuronale. Cependant, dans la maladie d'Alzheimer, l'évolution clinique est largement corrélée au schéma de progression de ces DNF (Wischik, Harrington, and Storey 2014) et dans des modèles murins de tauopathie, les déficits cognitifs sont corrélés aux DNF présents avant la mort neuronale (Buee et al. 2010). Ces éléments indiquent que la toxicité de Tau et les perturbations cognitives associées sont antérieures à la mort neuronale.

Les premières caractérisations de la protéine Tau comme élément central des DNF ont également révélé une phosphorylation anormale de la protéine (Grundke-Iqbal et al. 1986). En effet, la protéine Tau subit différentes modifications allant d'une phosphorylation anormale à une accumulation en polymères solubles puis insolubles pour former les agrégats caractéristiques des DNF (Buee et al. 2010). Durant ce processus, pouvant durer des dizaines d'années, des modifications chimiques et structurales de la protéine Tau ainsi qu'un changement de sa localisation subcellulaire (de l'axone vers le soma) interviennent. De plus nous sommes face à un système à deux composantes : le rôle toxique associé à un gain de fonction de Tau, et la perte de sa fonction physiologique dont l'incidence pathologique est,



comme nous le verrons, controversée. Ces deux aspects sont discutés plus en détails en **parties II. 2. Aspects moléculaire de Tau, p. 14** et **II. 3. Aspects fonctionnels et physiopathologique de Tau, p. 21.**

*b. ii. Aspects génétiques de MAPT*

Le gène *MAPT*<sup>1</sup> est présent sur le bras long du chromosome 17 chez l'humain et code pour la protéine Tau. Le locus 17q21.31 où est situé ce gène contient une région d'environ 900 kb qui se présentent sous deux formes d'haplotype H1 et H2 (*Boettger et al. 2012*). Ces haplotypes sont dus à la présence de séquences répétées qui peuvent entraîner des réarrangements de la région chromosomique : inversion (*Stefansson et al. 2005*), délétion (*Koolen et al. 2006*) et duplication (*Kirchhoff et al. 2007*). Si on se focalise sur les maladies neurodégénératives, l'haplotype H1 est associé à un risque augmenté de développer des pathologies comme la paralysie supranucléaire progressive et la dégénérescence cortico-basale (*Sergeant, Delacourte, and Buee 2005*).

En dehors du contexte d'haplotype, une étude a corrélé un polymorphisme en amont du gène *MAPT* au risque de LOAD avec la présence d'un facteur de risque *APOE-E4* (**voir partie III. Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer à début tardif, p. 34** ; *Jun et al. 2016*). Ce polymorphisme pourrait avoir une action sur l'épissage alternatif de l'exon 3 de *MAPT*. De plus, des délétions partielles ou des duplications complètes de ce locus ont également été identifiées dans des pathologies (*Avila et al. 2013*) et un total<sup>2</sup> de 107 mutations ponctuelles sont actuellement répertoriées sur des exons et des introns, pouvant mener à des pathologies (*Wolfe 2009*). À ce jour, aucune mutation, délétion, insertion ou haplotype n'a été lié à la maladie d'Alzheimer. Néanmoins la duplication *de novo* de la région 17q21.31 a été observée dans 4 cas de patients présentant des signes cliniques apparentés à la maladie d'Alzheimer (*Le Guennec et al. 2017*). L'augmentation de dose de *MAPT* est associée avec une augmentation de l'expression de son ARN messager (*Le Guennec et al. 2017*). La duplication du locus 17q21.31 est donc une nouvelle cause génétique d'une tauopathie, conduisant à une démence précoce avec des signes cliniques proches de la maladie d'Alzheimer, mais en l'absence de plaques amyloïdes.

---

<sup>1</sup> De l'anglais, *Microtubule Associated Protein Tau*

<sup>2</sup> <https://www.alzforum.org/mutations/mapt>

## II. Physiopathologies associées à Tau

### II. 1. [MAPT, un gène soumis à l'évolution](#)

Le gène *MAPT* présent chez l'humain provient d'une longue succession de modifications de sa composition en nucléotide durant la spéciation (*Heidary and Fortini 2001*). Ainsi, un alignement de séquences entre le produit du gène orthologue de la drosophile et celui humain, présente une similarité de 66% au niveau peptidiques. La plus forte conservation est située au niveau des régions codantes pour les domaines de liaisons aux microtubules (MBD<sup>1</sup>). La très forte homologie du MBD entre les protéines Tau produites chez l'humain et les bovins avec cet orthologue amène les auteurs à associer cette protéine à Tau. En outre, après migration par Western Blot (WB), la taille relative apparente, de cette protéine issue de la drosophile est similaire à la taille apparente retrouvée chez les mammifères. Cela a conduit, pour ces auteurs, à l'appellation de cette protéine chez la drosophile : Tau (*Heidary and Fortini 2001*).

La comparaison génomique et protéique de l'isoforme la plus longue de Tau (2N4R) dans le SNC entre l'humain et la souris révèle une homologie nucléotidique de 83%, avec 266 codons identiques, et 88% d'homologie protéique. De plus, le domaine MBD présente une conservation de 98% et les différences protéiques sont principalement retrouvées au niveau N-ter avec un ajout de 11, 2, 2 et 2 acides aminés (AA) dans les séquences respectives codées par les exons 1, 2, 5 et 7 (*Poorkaj et al. 2001*). Cependant des divergences d'épissage sont constatées entre l'humain et la souris (**voir partie II. 2. a. Structure de Tau, p. 14**).

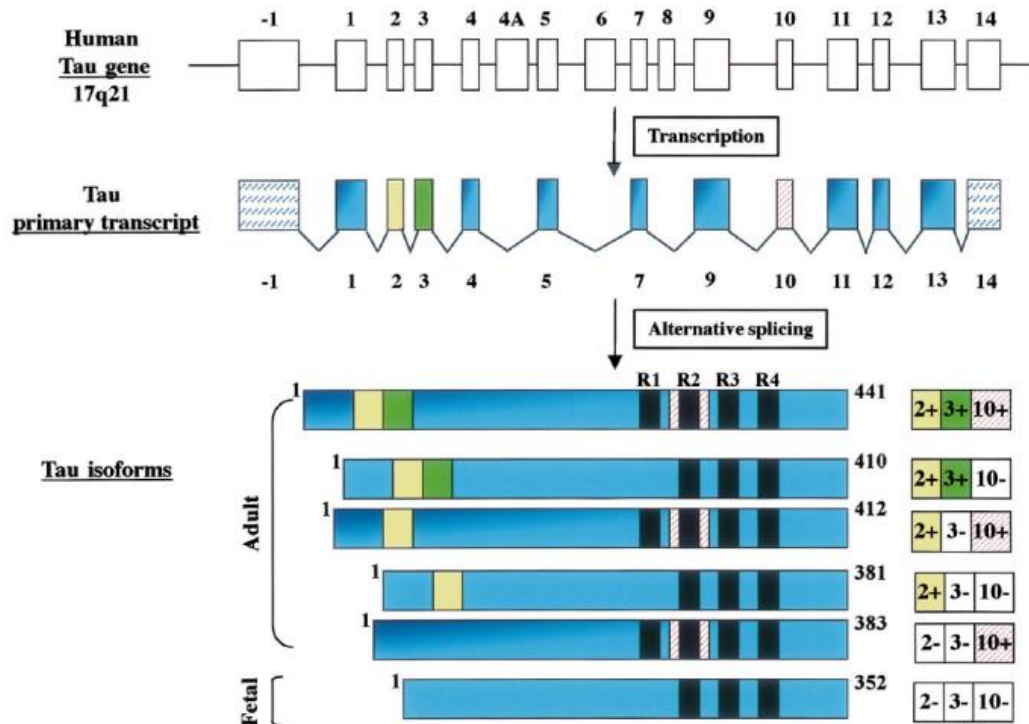
### II. 2. [Aspects moléculaire de Tau](#)

#### 2. a. Structure de Tau

Dans le cerveau humain, ce gène code pour l'expression, principalement neuronale, de six isoformes qui présentent des variations de tailles allant de 352 à 441 AA (**Figure 3 ; (Buee et al. 2000)**).

---

<sup>1</sup> De l'anglais, *microtubule binding domain*



**Figure 3 : Représentation du gène *MAPT*, du transcrit primaire et de la production des isoformes de Tau humaines après épissage alternatif.** Le gène *MAPT* contient 16 exons, dont le -1 est constitutif du promoteur. Le transcrit primaire de Tau présente les exons -1 et 14 mais ceux-ci ne sont pas traduits. Les domaines constitutifs de tau, codés par les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13 sont représentés en bleu, le domaine N1 en jaune et le domaine N2 en vert présentent des épissages différents. Les domaines MBD en noir peuvent être inclus trois ou quatre fois. A l'âge adulte Tau présente 6 isoformes et une isoforme spécifique est retrouvée durant le développement fœtal. D'après (Buee et al. 2000)

La partie centrale commune à toutes les isoformes se compose d'un domaine riche en proline (PRD<sup>1</sup>) permettant l'interaction avec des protéines qui présentent un domaine SH3<sup>2</sup> (Yu et al. 1994). En effet, des séquences consensus sur la structure primaire (comme XXXPPXPXX, RXLPPRPXX, RKLPPRPX<sup>3</sup>) présentes notamment dans la protéine Tau, permettent l'interaction de ces séquences avec le domaine SH3 (Yu et al. 1994). La structure tertiaire et tridimensionnelle permet également de présenter des séquences consensus qui ne sont pas détectables en conformation primaire. Cependant, la protéine Tau présente une conformation finale et fonctionnelle qui est linéaire et monomérique (Mandelkow and Mandelkow 2012).

<sup>1</sup> De l'anglais, *Prolin Rich Domain*

<sup>2</sup> De l'anglais, *SRC Homology 3 Domain*

<sup>3</sup> Où X est un AA différent de la cystéine

A ce domaine PRD est ajoutée une extrémité peptidique NH<sub>2</sub>-terminale (N-ter) qui possède des propriétés acides et une extrémité peptidique carboxy-terminale (C-ter) qui présente des propriétés basiques (*Mandelkow and Mandelkow 2012*). Cette asymétrie de charge conférée par ces séquences peptidiques est modulée par des modifications post-traductionnelles et permet de considérer Tau comme un dipôle. Cette propriété électromagnétique régule la force d'interaction de Tau avec les microtubules ou ses partenaires protéiques et module également son agrégation pathologique (*Mandelkow and Mandelkow 2012*).

D'autres domaines additionnels permettent la constitution des six isoformes dans le cerveau humain. Ainsi, les motifs répétés MBD au niveau C-ter peuvent être inclus trois ou quatre fois selon l'épissage alternatif de l'exon 10, entraînant la production des isoformes 3R et 4R. De manière attendue, les isoformes 4R présentent une plus forte interaction avec les microtubules (*Chong et al. 2018*). Selon les isoformes, une ou deux insertions peptidiques 1N et 2N sont retrouvées ou non au niveau N-terminal, codées par les exons respectifs 2 et 3, avec 29 ou 58 AA respectivement (*Buee et al. 2000*). Ces domaines modulent le potentiel isoélectrique de Tau. Ainsi, les six isoformes neuronales sont répertoriées selon la nomenclature suivante : 0N3R, 1N3R, 2N3R, 0N4R, 1N4R, 2N4R. Ces isoformes existent également au niveau du système nerveux central (SNP) dans lequel une plus grande isoforme de Tau est retrouvée dans les axones (*Couchie et al. 1992; Goedert, Spillantini, and Crowther 1992*).

La région N-ter, comprenant le PRD, est nommé « domaine de projection » et interagit avec la membrane plasmique ou des protéines du cytosquelette (*Buee et al. 2010*). La région C-ter, comprenant les MBD, promeut l'assemblage des microtubules et est donc appelée « domaine d'assemblage » (*Mietelska-Porowska et al. 2014*). Ce domaine d'assemblage permettrait, par un phénomène de compétition de liaison entre les microtubules et la protéine phosphatase 2A, de diminuer le niveau de phosphorylation de Tau en empêchant l'activité de la phosphatase (*Sontag et al. 1999*).

### 2. b. Tauopathies et variations du ratio 3R/4R

Chacune de ces isoformes présente une fonction physiologique propre et suit une régulation d'expression entre le développement embryonnaire et l'âge adulte. Ainsi l'isoforme la plus

courte (ON3R) est présente en abondance pendant le développement fœtal<sup>1</sup> alors que les autres isoformes ne sont produites qu'à l'âge adulte (*Goedert et al. 1989*). Chez le rongeur adulte âgé de trois mois, trois isoformes de Tau sont majoritairement retrouvées, contenant toutes 4 domaines MBD et un nombre d'insertion N-ter allant de 0 à 2 (*McMillan et al. 2008*). Elles, sont répertoriées selon la nomenclature suivante : 4RON, 4R1N, 4R2N. Contrairement à l'humain, la souris n'exprime qu'une seule isoforme 3R, et ce, uniquement durant le développement jusqu'au stade observé de P6 (*McMillan et al. 2008*). Ainsi, les résultats obtenus dans cette étude mettent en avant l'absence d'un ratio 3R/4R chez la souris adulte, contrairement à l'humain.

La régulation d'expression de chacune de ces isoformes chez l'humain doit se faire de manière équilibrée et contrôlée. Un déséquilibre dans le ratio des formes 3R/4R a été retrouvé dans les démences fronto-temporales (*Wolfe 2009*) mais un débat persiste quant à son existence dans la maladie d'Alzheimer. Ainsi dans le cortex temporal de patients LOAD, une première étude mettait en évidence une perturbation de ce ratio en faveur de la forme 4R avec un stade Braak de niveau 3 à 5 (*Glatz et al. 2006*) alors qu'une deuxième étude menée sans détermination du stade de Braak ne montrait, quant à elle, pas de variation (*Ingelsson et al. 2006*). De plus, une autre équipe montra que si le niveau de Tau insoluble sous forme 3R et 4R n'est pas modifié par rapport aux contrôles, les agrégats de Tau extracellulaires retrouvés après la mort neuronale sont eux majoritairement composés de 3R (*Espinoza et al. 2008*). Bien que la conséquence de ce déséquilibre dans la maladie d'Alzheimer soit encore en débat, le traitement par ajout du peptide A $\beta$ <sub>25-35</sub> sur des cultures de neuroblastes humains (SH-SY5Y) entraîne une augmentation cette fois-ci du ratio 3R/4R. Cette modification est la résultante d'une diminution d'expression de 4R après phosphorylation par la kinase GSK3- $\beta$ <sup>2</sup> de l'élément SC35, régulateur d'épissage, présent en amont de l'exon 10 (*Chen et al. 2010*).

### 2. c. Modifications physiologiques post-traductionnelles

La protéine Tau subit différentes modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'O-glycosylation, la glycation, l'ubiquitination, la SUMOylation, l'acétylation, la nitration et la troncature de Tau par digestion dépendante de protéases (*Zhou et al. 2018*).

---

<sup>1</sup> Fœtus humain de 15 semaines

<sup>2</sup> Glycogen synthetase kinase 3-  $\beta$

Ces modifications sont retrouvées en condition physiologique et pathologique. L'isoforme la plus longue de Tau (2N4R) dans le SNC humain, présente 85 sites potentiels de phosphorylation dont 71 sont retrouvés phosphorylés dans des conditions physiologiques et pathologiques (*Sergeant et al. 2008*). Ces sites de phosphorylations sont majoritairement retrouvés dans les régions PRD et C-ter qui sont adjacentes au MBD (*Sergeant et al. 2008*).

Selon les travaux de Sergeant et ses collaborateurs en 2008, la phosphorylation de Tau requiert une vingtaine de kinases qui sont regroupées en quatre catégories : (1) les kinases regroupant les CDK1<sup>1</sup> et 5, MAPK<sup>2</sup> et SAPK<sup>3</sup>, ciblent les sérines (Ser) et thréonines (Thr) qui font suite à une proline ; (2) les kinases, comme la DYRK1A, ciblent les mêmes résidus sans nécessiter d'une proline; (3) les glycogène-kinases ciblent les mêmes résidus mais nécessitent la présence d'une séquence de reconnaissance particulière ; (4) les tyrosine-kinases phosphorylent uniquement les tyrosines (*Sergeant et al. 2008*). De manière conceptuelle, imaginons que seulement 5 résidus parmi les 71 sites dont la phosphorylation est démontrée, seront phosphorylés sans connaître les résidus incriminés. Nous obtenons un nombre de combinaison possible de 13 019 909<sup>4</sup>. Si chacune de ces combinaisons pouvait entraîner un phénotype particulier, cela démontrerait la régulation complexe du niveau de phosphorylation de Tau.

A cela s'ajoutent les variables spatiales (localisation subcellulaire) et temporelles (développement) influençant le schéma de phosphorylation de Tau (*Brion et al. 1993*). Les modifications post-traductionnelles présentent donc un intérêt certain dans l'étude des processus physiopathologiques inhérents aux tauopathies. En effet, la perturbation de cette phosphorylation peut promouvoir l'agrégation de Tau.

### 2. d. Phosphorylation anormale de Tau et agrégation

Il est suggéré que la phosphorylation de Tau, même en absence de perturbation du ratio 3R/4R, soit l'une des premières modifications post-traductionnelles révélatrices d'un désordre cellulaire. Par exemple, l'utilisation de certains anesthésiques agit sur la capacité cognitive et le niveau de phosphorylation de Tau chez les rongeurs (*Whittington et al. 2013*). Ainsi, la

---

<sup>1</sup> De l'anglais, *cycline dependant kinase*

<sup>2</sup> De l'anglais, *mitogen-activated protein kinase*

<sup>3</sup> De l'anglais, *stress-activated protein kinase*

<sup>4</sup> Calcul combinatoire :  $Combinaisons = \frac{71!}{5!(71-5)!}$

chirurgie chez des patients âgés pourrait être considérée comme un facteur de risque à la LOAD. De même, des conditions stressantes et chroniques chez le rat, comme une contention d'une heure par jour, des variations de température et d'hygrométrie, la nage forcée, la privation alimentaire et/ou hydrique, sont également en mesure d'induire une hyperphosphorylation de Tau ([Yan et al. 2010](#); [Yang et al. 2014](#)). Ces éléments sont particulièrement importants au regard du design expérimental que nous avons mis en place dans nos travaux. En effet ceux-ci incluent des événements de nage forcée et fréquents pour les souris, utilisées à différents âges, qui est également générateur de stress chez ces animaux.

L'une des premières conséquences de l'hyperphosphorylation de Tau est la perte croissante de sa capacité à se lier au réseau microtubulaire (RMT) Ainsi, la phosphorylation du résidu Thr231, premier site de la séquence de reconnaissance au SH3, induit une diminution de liaison aux microtubules ([Buee et al. 2000](#); [Sergeant et al. 2008](#)). Les formes libres et solubles de Tau cantonnées au niveau axonal évolueront alors, par le biais d'un processus complexe, vers une agrégation qui s'étendra dans tous les compartiments cellulaires (**voir partie II. 4. Localisation extra-axonale de Tau, p. 25**). Les étapes essentielles de cette agrégation ont notamment été caractérisées *in vitro* avec la forme mutante  $\Delta\text{tau}187^1$  de Tau ([Pavlova et al. 2016](#)). En se basant sur ces travaux, l'agrégation commence par une polymérisation de Tau qui entraîne un changement de conformation secondaire avec l'apparition de feuillets  $\beta$ . Après un certain niveau de polymérisation de Tau, ces feuillets  $\beta$  adoptent une conformation parallèle et celle-ci accélère le recrutement d'autres agrégats en conformation de feuillets  $\beta$  pour former les DNF. Notons que les auteurs, dans leurs conditions expérimentales, n'ont pas constaté de recrutement de monomères de Tau par les polymères déjà formés. Ainsi Tau passe successivement d'un stade monomérique, à la formation de polymères solubles puis insolubles qui se regroupent pour former les PHF et l'accumulation de ces PHF forme les DNF.

L'analyse *post-mortem* de cerveaux atteints par la maladie d'Alzheimer, révèle une structuration complexe des PHF, unités structurantes des DNF. Ainsi après analyse par WB, des trainées sont visualisées (*smear*), indiquant une composition hétérogène de Tau ([Morishima-Kawashima et al. 1993](#)). Cette hétérogénéité est tout d'abord expliquée par la présence de la forme tronquée de Tau et de ses différentes formes d'assemblage,

---

<sup>1</sup> $\Delta\text{tau}187$  est l'isoforme 2N4R avec les 4 MBD et une coupure des résidus 255-441. Cette forme présente une facilité d'agrégation

possiblement due à des modifications post-traductionnelles (Buee et al. 2000). Premièrement, il apparait que ce clivage serait présent uniquement lorsque Tau est sous forme de polymère, puisqu'un encombrement stérique dans les DNF empêcherait le clivage de Tau par des protéases. Des phénomènes d'ubiquitination de Tau sont également observés, ce qui peut refléter des mécanismes de dégradation protéolytique incomplets. Des glycosylations de Tau pourraient permettre une stabilisation des PHF sous forme d'hélices et ainsi augmenter la rigidité structurelle des PHF et des DNF. En outre, le potentiel oxydo-réducteur de Tau, modulé par le cytosol environnant et par glycation de Tau, influencerait la formation de PHF. Enfin, la transglutamination induirait les ponts peptidiques reliant les protéines Tau entre elles, ce qui favoriserait l'agrégation de Tau (Buee et al. 2000).

### 2. e. Toxicité cellulaire de Tau

Les modèles utilisés pour étudier l'effet pathologique de Tau ont bien souvent recours à des stratégies, comme l'utilisation de formes mutantes de Tau, qui accélèrent considérablement la cinétique du processus d'agrégation. Celui-ci serait relativement long à se mettre en place dans la LOAD. En *post-mortem* les DNF sont corrélées au niveau d'atteinte cognitive mesuré par l'examen MMSE (Wischik, Harrington, and Storey 2014). Pour autant la question de déterminer si des formes solubles et toxiques de Tau peuvent être responsables de tout ou une partie de la symptomatologie est encore en débat.

Il est donc nécessaire de déterminer si les agrégats sont corrélés à des anomalies histologiques et comportementales. Une souris, porteuse de la mutation P301L (de l'isoforme ON4R), présente une expression du gène *Mapt* 15 fois supérieure à son expression endogène qui peut être réduite à 2.5 fois par l'absorption de doxycycline<sup>1</sup> présente dans l'eau du biberon (Santacruz et al. 2005). Les auteurs ont pu aisément observer dès l'âge de 5 mois l'apparition d'inclusions intracellulaires de Tau argyrophiles, caractéristiques des DNF, et corrélées à une atrophie cérébrale avec une perte de neurones allant jusqu'à près de 70% dans la CA1, et à une incapacité à localiser la plateforme lors du test de rappel en piscine de Morris. La modulation de l'expression par doxycycline entraîne une stabilisation du nombre de neurones et une récupération de la mémoire spatiale même si les DNF continuent de s'accumuler

---

<sup>1</sup> Antibiotique notamment utilisé pour activer la transcription de gènes qui présentent un élément de réponse à la doxycycline



(*Santacruz et al. 2005*). Ces données mettent en exergue que la toxicité cellulaire de Tau est majoritairement véhiculée par les formes solubles de Tau, ce qui inclut les monomères hyperphosphorylés et les polymères avant et après conformation en feuillets  $\beta$ .

### II. 3. Aspects fonctionnels et physiopathologique de Tau

Les tauopathies sont le résultat d'un processus cellulaire qui devient toxique entre l'hyperphosphorylation de Tau et la formation de DNF. La protéine Tau est impliquée dans des fonctions physiologiques telles que la régulation du cytosquelette, le transport axonal, la myélinisation et la croissance neuritique. D'autres fonctions comme la transduction de signal intracellulaire et la protection contre les chocs thermiques, ne seront pas plus amplement développées dans ce manuscrit (*Mietelska-Porowska et al. 2014*).

#### 3. a. Tau à l'interface du cytosquelette de microtubules et d'actine

Les dimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  forment des polymères sous l'action de la protéine Tau qui s'assemblent eux-mêmes par 11 à 15 protofilaments pour former un microtubule (*Yogev and Shen 2017*). La déphosphorylation de Tau stimule l'assemblage des microtubules *in vitro* (*Lindwall and Cole 1984*). La protéine Tau contribue également à l'espacement et à l'organisation parallèle des microtubules au sein de l'axone (*Buee et al. 2010*) et permet de renforcer le RMT lorsque deux microtubules interagissent de façon longitudinale (*Duan et al. 2017*).

Si la dénomination de Tau et de son gène *MAPT* provient de sa capacité à lier les microtubules, il est maintenant acquis que cette protéine Tau, en fonction de sa charge électromagnétique, présente également la capacité de lier l'actine. En effet, il apparaît que le domaine PRD de tau est en mesure d'induire un assemblage de l'actine sous sa forme monomérique globulaire (actine G ; (*He et al. 2009*) et le regroupement d'actine en filament (actine F) avec le RMT grâce aux MBD de Tau (*Cabrales Fontela et al. 2017*). Une étude suggère qu'une même molécule Tau serait en mesure de promouvoir la polymérisation de l'actine en tandem avec le RMT. Cela permettrait la formation d'un « super réseau » parallèle actine-microtubule lui conférant une plus grande rigidité structurelle (*Farias et al. 2002; Elie et al. 2015*). Par ailleurs, il semblerait que les neurones soient en mesure de contrôler la disponibilité de Tau au niveau du RMT par des régulations du niveau de phosphorylation de Tau entraînant une modulation de la rigidité du cytosquelette (*Dixit et al. 2008*). Ainsi, ce RMT commun à toutes les cellules

est donc particulièrement résistant à des agents chimiques de dépolymérisation dans les neurones (*Yogev and Shen 2017*).

Si la liaison de Tau à l'actine présente un intérêt fonctionnel dans la rigidification du cytosquelette, elle peut également être source de phénotypes délétères lorsque Tau présente un gain de fonction. Ainsi, lors de son enrichissement pathologique au niveau de l'élément présynaptique, la forme mutée P301L de Tau<sup>1</sup> exprimée chez la drosophile favorise la polymérisation de l'actine et lie les vésicules entre elles réduisant ainsi leur mobilité entraînant un défaut dans la transmission synaptique déterminé de manière électrophysiologique (*Zhou et al. 2017*).

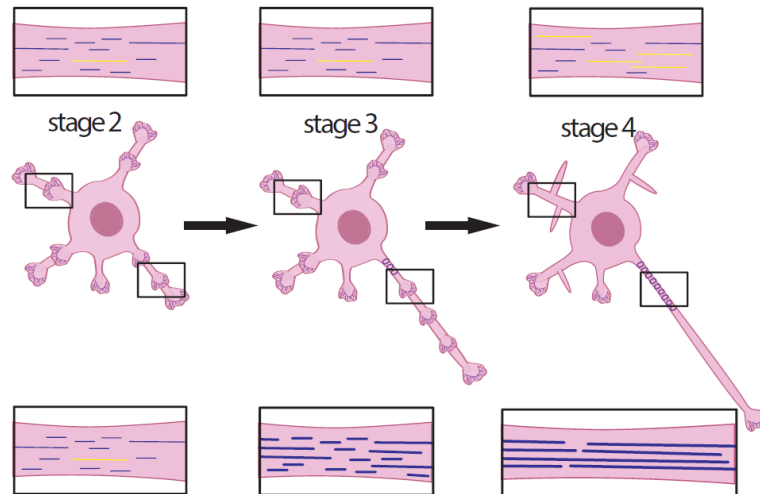
### 3. b. Polarisation neuronale du RMT et de Tau

L'enrichissement de Tau au niveau axonal, de manière graduelle, et avec une plus forte concentration à la synapse se met en place au cours du développement (*Kempf et al. 1996; Black et al. 1996*).

De la même manière, le RMT va présenter une polarisation au cours du développement et notamment dans la discrimination de l'axone. Cette polarité du RMT est retrouvée à ses extrémités, induite par la charge des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ , dont l'orientation est spécifique de son compartiment cellulaire (*Yogev and Shen 2017*). Ainsi chez les mammifères, alors que le RMT dendritique présente à la fois des extrémités positives et négative dirigées vers le soma, le RMT axonal ne présente qu'une extrémité négative dirigée vers le soma (**Figure 4**). L'implication de ce jeu de polarité du RMT dans la différenciation axonale est encore sujette à débat et diverses hypothèses sont proposées, comme l'activation d'un signal cellulaire secondaire ou la facilitation du transport de récepteurs aux hormones de croissance (*Yogev and Shen 2017*). De plus, des modifications post-traductionnelles permettraient au RMT neuritique d'induire une préférence d'attraction pour la kinésine et de favoriser ainsi la polarisation de cette neurite en axone. La kynésine, protéine motrice avec son alter égo la dynéine parcourent le RMT respectivement vers l'extrémité positive (transport antérograde) et vers l'extrémité négative (transport rétrograde ; (*Yogev and Shen 2017*).

---

<sup>1</sup> La mutation P301L est aussi retrouvée chez les patients atteints de démence fronto-temporale



**Figure 4 : Polarisation du RMT neuronal.** Durant le développement neuronal, le RMT peut présenter vers le soma des extrémités négatives (ligne bleu) et positives (ligne jaune) dans l'ensemble des neurites (stage 2) avant de réserver cette particularité aux dendrites (stage 3). La finalisation de la polarisation axonale (stage 3) s'accompagne d'une rigidification du RMT impliquant une élongation des microtubules et un échafaudage d'actine. Dans les dendrites, on observe un enrichissement du RMT présentant ses extrémités positives. D'après (Yogev and Shen 2017)

### 3. c. Tau et le transport axonal

La protéine Tau ne façonne pas seulement le RMT mais prend part également au transport axonal. En effet, une étude menée par Dixit et al., en 2008 atteste que Tau interviendrait dans le transport axonal antérograde, qui est dépendant du RMT, par, sa forte affinité de liaison avec la kynésine (Dixit et al. 2008). Ainsi, la faible concentration de Tau au niveau somatique permet une liaison efficace entre la kynésine et le RMT alors que sa forte concentration au niveau synaptique détache la kynésine du RMT après liaison à Tau. Cette finalité permet la mise à disposition des éléments cargos nécessaires à la synapse. Par contre, la faible affinité de la dynéine pour la protéine Tau, dix fois moins importante au regard de la kynésine, n'entraînera que peu d'effets de Tau sur ses capacités motrices rétrogrades (Dixit et al. 2008).

#### c. i. Tau et le transport du Réticulum

Parmi les éléments cargo transportés au niveau axonal par la kynésine, nous pouvons noter le transport de récepteurs au GABA<sup>1</sup> qui sont encore arrimés au Réticulum Endoplasmique (RE) (Valdes et al. 2012). Ces éléments suggèrent un transport du RE au niveau axonal qui serait dépendant du RMT et de la kynésine, et donc modulé par Tau. En plus de son transport, le RE

<sup>1</sup> acide γ-aminobutyrique

présente une forme allongée en tubule « RE Tubulaire » de 60 à 100 Ångstrom de diamètre à la fois dans les axones myélinisés du SNP (*Tsukita and Ishikawa 1976*) et du SNC (*Broadwell and Cataldo 1984*). Par ailleurs, une surexpression de l'isoforme 2N4R de Tau dans des cellules CHO<sup>1</sup> entraîne une altération cyto-architecturale du RE qui se manifeste par une diminution de localisation du RE tubulaire au niveau neuritique. Cette même surexpression dans des cellules neuronales N2a<sup>2</sup> entraîne un arrêt du transport du réticulum dans les prolongements neuritiques (*Ebner et al. 1998*).

### 3. d. Croissance neuritique

La croissance neuritique est un processus développemental complexe qui requiert une machinerie moléculaire spécifique. Une partie des éléments centraux de ce mécanisme se situe au niveau du cône de croissance situé à l'extrémité neuritique. Ce cône se compose du lamellipode en formation étalée ainsi que des filopodes qui constituent les prolongements membranaires du lamellipode. Le lamellipode, élément essentiel à l'élongation cellulaire, est majoritairement composé d'actine G alors que le filopode, élément essentiel à l'exploration cellulaire, est lui majoritairement constitué d'actine F.

Parmi l'étendue des protéines impliquées, Tau apparaît comme un régulateur primordial. Le domaine de projection NH<sub>2</sub> est proposé pour réguler la jonction entre la membrane plasmique et le RMT neuritique (*Brandt, Leger, and Lee 1995*). Ainsi, une perte de fonction de Tau, dans des neurones en culture<sup>3</sup> entraîne une diminution par 2 du niveau d'élongation neuritique. Ces résultats ont été obtenus par « inactivation » de Tau au laser. Brièvement, un anticorps ciblant Tau va porter un chromophore qui en présence d'une excitation à 620 nm va induire la formation de radicaux libres locaux (15 Ångstrom) à courte durée de vie. Ces radicaux vont empêcher la liaison de Tau à ses partenaires. Cette technique permet de moduler temporellement et spatialement « l'inactivité » protéique. Par ailleurs une diminution dans la surface du lamellipode, partie centrale du cône de croissance, avec atteinte de mobilité mais sans atteinte des filopodes, extrémités mobiles du lamellipode, a été constatée quand la protéine Tau est « inactivée » (*Liu, Lee, and Jay 1999*).

---

<sup>1</sup> Lignée cellulaire épithéliales dérivée d'ovaire de hamster de Chine

<sup>2</sup> Lignée cellulaire issue de neuroblastome de souris

<sup>3</sup> Ganglions rachidiens de poulet

## II. 4. Localisation extra-axonale de Tau

D'après la base de données GTEX<sup>1</sup>, le tissu nerveux et le muscle squelettique présentent la plus grande propension à l'expression de Tau dans tout le corps humain mûre. Plus spécifiquement, au sein du SNC de la souris, la protéine Tau est retrouvée dans les oligodendrocytes ainsi que dans les neurones. Dans les neurones Tau est majoritairement retrouvé au niveau de l'axone mais également au niveau des dendrites et du noyau (*Ittner et al. 2016*).

### 4. a. Tau et le noyau

En effet, des cultures de neuroblastes humains ont également mis en évidence une faible fraction de la protéine Tau au niveau nucléaire (*Loomis et al. 1990*). En culture neuronale, l'exposition à un stress thermique entraîne une augmentation de la liaison de la protéine Tau à la chromatine. La perte de fonction de Tau dans ces mêmes cellules entraîne une augmentation drastique de l'apoptose, mettant en avant un rôle protecteur de Tau sur l'ADN. Ce phénotype induit par perte de *Mapt* peut être restauré par transfection du l'isoforme humaine avec un signal d'adressage nucléaire (*Sultan et al. 2011*). Des aberrations de la chromatine ont été retrouvées dans les fibroblastes de patients présentant la mutation P301L de Tau, telles que des aneuploïdies, des translocations chromosomiques et des séparations précoces des chromatides (*Rossi et al. 2008*). De plus, l'augmentation du niveau de phosphorylation de Tau au niveau nucléaire est proposée comme un élément de sénescence physiologique, ce qui pourrait aggraver la tauopathie (*Gil et al. 2017*). Mais le rôle de Tau au niveau nucléaire reste encore ambigu. Peu d'études s'y consacrent que ce soit au niveau physiologique ou pathologique, dans des conditions cellulaires ou tissulaires, chez l'humain ou la souris, alors qu'il apparaît comme un élément nécessitant de plus amples investigations.

### 4. b. Tau et les oligodendrocytes

Si la protéine Tau est retrouvée enrichie au niveau neuronal, sa présence est également détectée dans les oligodendrocytes qui interviennent dans les processus de myélinisation des axones nécessaire à la bonne transmission saltatoire du potentiel d'action (*Seiberlich et al. 2015*). Ces cellules présentent une architecture membranaire complexe notamment assurée

---

<sup>1</sup> <https://gtexportal.org/home/gene/MAPT>

par le RMT (*Seiberlich et al. 2015*). Dans la maladie d'Alzheimer, des inclusions somatiques de Tau ont été identifiées dans les oligodendrocytes identifiés avec des anticorps ciblant l'anhydrase carbonique II (*Iwatsubo, Hasegawa, and Ihara 1994*). Ainsi, l'activité toxique de Tau peut être exercée au niveau des neurones et des oligodendrocytes.

En culture d'oligodendrocytes issus de rat, l'isoforme 3R de la protéine Tau est produite avec un haut niveau de phosphorylation. Cependant, durant la maturation cellulaire un basculement vers les isoformes 4R s'opère en concomitance d'une diminution de phosphorylation (*Seiberlich et al. 2015; Richter-Landsberg 2016*). L'injection d'ARN interférant contre Tau dans ces mêmes cellules entraîne, en plus d'une diminution de son expression, la diminution du transport des composants basiques de la myéline (*Seiberlich et al. 2015*). Ces cellules affichent alors des anomalies de différenciation cellulaire et des anomalies de contact entre les oligodendrocytes ce qui perturbe les processus précoces de myélinisation (*Seiberlich et al. 2015*).

#### *b. i. Tau et la pathologie de la myéline*

Chez la souris, la délétion homozygote du gène *Mapt* intensifie la dégénérescence axonale et les faiblesses musculaires dans un modèle d'encéphalomyélite induite par auto-immunisation (EAE<sup>1</sup>) de la protéine MOG<sup>2</sup>. La surexpression du gène *MAPT* humain est en mesure de prévenir ce phénotype imputé à la perte de fonction endogène (*Weinger et al. 2012*). Notons que ce modèle combiné de perte endogène avec surexpression humaine de Tau, appelés htau, a été utilisé dans le cadre de cette thèse (**voir partie II. 5. Le modèle murin htau, p. 30**). L'absence de phénotype évident chez des souris *Mapt*<sup>-/-</sup> en dehors d'un contexte d'EAE peut être expliqué par un mécanisme de compensation par les autres MAP<sup>3</sup>, notamment par la surexpression observée de MAP1 (*Weinger et al. 2012*).

Ainsi, il apparaît que la protéine Tau est un élément pivot dans les processus de myélinisation. Par ailleurs, la toxicité de Tau avec la mutation P301L, entraîne un phénomène de déstructuration de la myéline et des axones qui précède l'agrégation<sup>4</sup> de Tau dans les

---

<sup>1</sup> De l'anglais, *experimental autoimmune encephalomyelitis*

<sup>2</sup> De l'anglais, *Myelin Oligodendrocytes Glycoprotein*

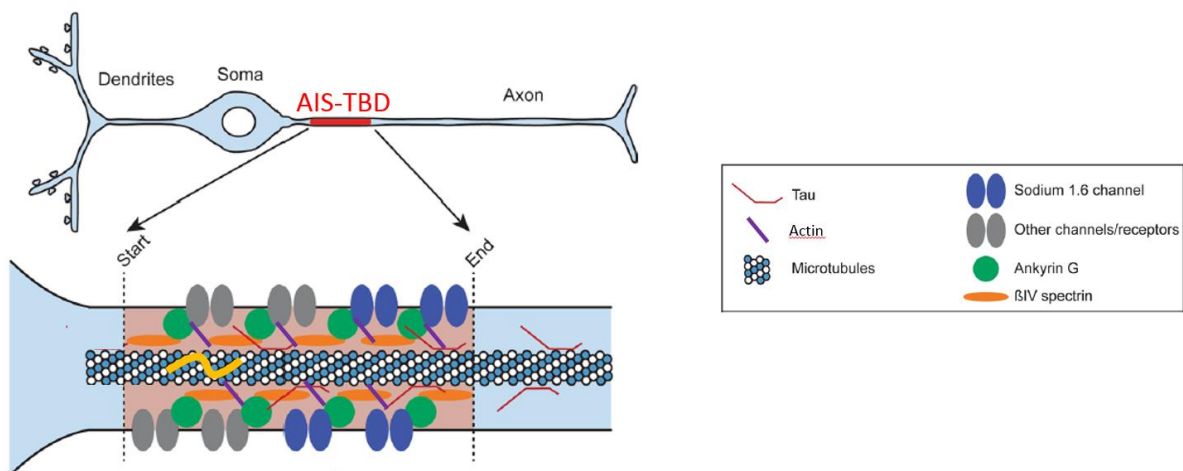
<sup>3</sup> De l'anglais, *Microtubules Associated Proteins*

<sup>4</sup> Marquée à la Thioflavine S

oligodendrocytes (Higuchi et al. 2005). Cette déstructuration de la myéline est également observée à 22 mois dans le modèle htau (Andorfer et al. 2005).

#### 4. c. Effondrement de la barrière et évansion de Tau

Il existe une barrière physique au niveau proximal de l'axone empêchant la protéine Tau de diffuser librement au niveau somato-dendritique. Cette barrière, appelée « *Tau diffusion barrier* » (TBD), présenterait des éléments structuraux très proches à ceux du segment initial de l'axone (AIS<sup>1</sup>) et que les complexes moléculaires permettant de discriminer la TBD et l'AIS ne sont pas encore clairement établis (Li et al. 2011). La zone AIS est la plus documentée et se situe également au niveau proximal de l'axone (Figure 5). Elle se caractérise par une forte densité en canaux sodium et potassium voltage dépendant qui permettent l'émergence d'un potentiel d'action (Zempel et al. 2017). Au niveau moléculaire, l'AIS est enrichie en protéines d'échafaudage telles que l'ankyrine G et la spectrine IV liées aux canaux voltage dépendant par un maillage d'actine F (Zempel et al. 2017). Cette même étude suggère que la forte dynamique des microtubules au niveau de l'AIS soit un élément structurant de la TBD et puisse représenter un élément de discrimination de l'AIS-TBD.



**Figure 5 : Tau et la zone AIS-TBD.** La zone AIS-TBD est présente au niveau proximal de l'axone et se compose entre autre des protéines ankyrine et spectrine qui permettent d'établir un échafaudage avec la participation de l'actine. La fonction de l'AIS est de regrouper les canaux ioniques. La présence d'une dynamique importante des microtubules, représentée par une vague jaune, au niveau du RMT de l'AIS serait un élément de discrimination de la TBD. Figure modifiée d'après (Hatch et al. 2017)

<sup>1</sup> De l'anglais, *axon initial segment*

Lors du développement des neurones, la protéine Tau effectue à la fois une permutation d'isoforme et exhibe une diminution du niveau de phosphorylation (*Brion et al. 1993*). Ces deux éléments pourraient constituer des signaux permettant un enrichissement de Tau dans la neurite en voie de spécialisation axonale. L'établissement de l'AIS, et donc possiblement de la TBD, s'effectue en parallèle de cet enrichissement de Tau au niveau axonal (*Zempel and Mandelkow 2014*). Par la suite des mécanismes complémentaires à la TBD vont permettre de restreindre la localisation de Tau comme l'affinité de Tau pour le RMT axonal, une dégradation accrue au niveau somato-dendritique (*Hirokawa et al. 1996*) et un transport privilégié d'ARNm au niveau axonal pour une traduction locale (*Aronov et al. 2001; Morita and Sobue 2009*).

L'hyperphosphorylation pathologique de Tau dans la maladie d'Alzheimer, similaire à celle observée lors du développement, entraîne un retour en arrière de Tau avec une concentration accrue au niveau proximal de l'axone (*Brion et al. 1993*). Cette hyperphosphorylation ainsi qu'une acétylation anormales présentent une activité déstabilisante sur le RMT de la TBD-AIS (*Sohn et al. 2016*). L'une des conséquences de cette délocalisation d'une forme mutée<sup>1</sup> de Tau à la TBD-AIS est la diminution d'excitabilité neuronale des neurones pyramidaux excitateur de la CA1 (*Hatch et al. 2017*). Ce phénotype survient avant que la perte d'intégrité de la TBD-AIS ne puisse plus empêcher Tau de remplir l'espace cytoplasmique (*Hatch et al. 2017*).

#### 4. d. Propagation synaptique

D'un point de vue anatomique, la tauopathie apparentée à la maladie d'Alzheimer présente une propagation cérébrale séquentielle avec une atteinte progressive de structures interconnectées par les fibres de projections (*Braak and Braak 1991*) ; voir **partie I. 2. b. i. Visualisation et identification de Tau, p. 11**). L'injection d'homogénats de cerveaux humains atteints par la maladie d'Alzheimer dans le cerveau de souris (WT) entraîne la formation d'inclusions intracellulaires de Tau argyrophile (*Clavaguera et al. 2013*). De plus, la protéine Tau présente une possible transmission inter-cellule d'éléments toxiques *in vitro* par sécrétion et internalisation des agrégats extracellulaires (*Mohamed et al. 2013*). Si ce schéma de propagation des DNF semble propre à la maladie d'Alzheimer, d'autres tauopathies exhibent également une atteinte séquentielle.

---

<sup>1</sup> Modèle murin rTg4510 présentant la mutation P301L retrouvée dans les démences fronto-temporales



Des études mettent en avant l'implication de l'élément présynaptique comme élément central dans la diffusion synaptique de Tau. En effet, les travaux de [Dujardin et al. \(2014\)](#) ont démontré une transmission transynaptique de la protéine Tau uniquement quand la séquence nucléotidique de *MAPT* utilisée pour l'injection stéréotaxique d'un lentivirus ne présentait pas de mutation. Les neurones interconnectés à ceux du site d'injection, mais séparés par une distance supérieure à 10 mm, présentaient une immunoréactivité spécifique du construit utilisé, ce qui indique bien un transfert de Tau. Cependant, une faible présence de Tau anormalement phosphorylée a été retrouvée même après un délai de cinq mois entre l'injection et le sacrifice. Cela reflète le caractère cinétique lent de la propagation de Tau sous sa forme hyperphosphorylée, préambule à sa toxicité, qui pourrait être comparé à la tauopathie définie dans la maladie d'Alzheimer ([Dujardin et al. 2014](#)). Plus récemment, un système de transfert de Tau (2N4R) par nanotubes (TNT<sup>1</sup>) a été observé. Ce système TNT, s'apparente à un tube membranaire, dont le cytosquelette est constitué entre autres d'actine mais pas de microtubule. Ce tube permet la connexion entre deux cellules. Les données recueillies mettent en évidence que Tau est un élément constitutif de ces TNT et que la présence extracellulaire de Tau favorise leur création. De plus, Tau sous forme fibrillaire peut emprunter ce passage pour se délocaliser d'un neurone émetteur vers un neurone<sup>23</sup> récepteur ([Tardivel et al. 2016](#)). Ces éléments mettent donc en évidence une capacité intrinsèque à la tauopathie, retrouvée dans la maladie d'Alzheimer, de pouvoir effectuer un transfert des éléments moléculaires cytotoxiques.

Dans le classement des maladies neurodégénératives qui présentent un schéma de propagation dans le SNC, la maladie de Creutzfeldt-Jakob apparait comme une compétitrice redoutable. En effet, le repliement anormal de la protéine prion est non seulement en mesure d'entraîner une transmission de ce repliement anormal dans le SNC mais également un caractère infectieux inter-individu et inter-espèce ([Leighton and Allison 2016](#)). Cela a amené à une réflexion sur la classification des processus neurodégénératifs qui présentent un schéma de propagation cérébral similaire aux « maladie à prion ». Une revue tente ainsi de catégoriser les désordres neurodégénératifs qui pourraient être apparentée à ces maladies à prion en fonction de leur mode de propagation et de l'implication du gain et/ou de la perte de fonction

---

<sup>1</sup> De l'anglais, *tunneling nanotube*

<sup>2</sup> Neurones corticaux de rat

<sup>3</sup> CAD, cellules issues de neuroblastome murin

associée à la protéine incriminée pour chaque pathologie. La première de ces catégories est basée sur le fait que la toxicité de la protéine est suffisante à l'établissement des phénotypes et que la perte de fonction physiologique n'a pas d'impact. La deuxième catégorie repose sur le fait que le gain de fonction est nécessaire pour initier et propager la pathologie mais que l'ensemble des phénotypes observés est imputable à la perte de fonction. Enfin, un modèle mixte (ex. maladie de Creutzfeldt-Jakob) est basé sur une initiation et une propagation de la pathologie par un gain de fonction (ex. protéine prion) mais les symptômes sont les résultantes des gains et des pertes de fonction ([Leighton and Allison 2016](#)).

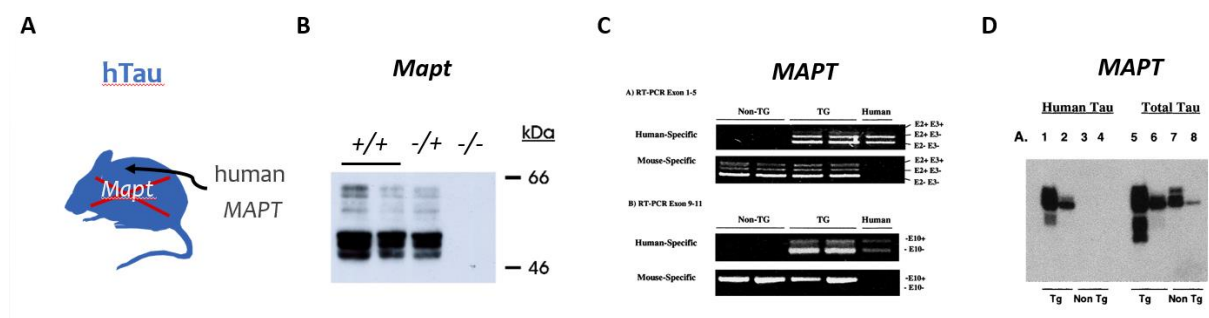
Concernant la tauopathie apparentée à la maladie d'Alzheimer, certaines caractéristiques peuvent permettre son association avec les maladies à prion. En effet, Tau sous sa forme non muté présente une capacité à être transféré de cellules en cellules et que ce transfert est probablement à l'origine des processus neurodégénératifs séquentiels. La question serait maintenant de déterminer si le gain et la perte de fonction concourent ensemble à l'établissement des phénotypes ou si seulement le gain de fonction peut être considéré comme pathologique. Une revue établie ainsi, que chez la souris C57BL6/J le génotype *Mapt*<sup>-/-</sup> n'entraîne que de subtils symptômes qui pourraient être liés au poids des animaux, mais aucun désordre comportemental n'a été reporté, même à un âge avancé de 22 mois ([Gotz et al. 2013](#)). Ces données présentent des disparités en fonction du fond génétique sélectionné. Ainsi les souris mutées sur un fond C57BL6/6/SV129 manifestent quant à elles des déficits en reconnaissance d'objet et en conditionnement à la peur dès 12 mois ([Gotz et al. 2013](#)).

Dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, il apparaît donc que la protéine Tau est en mesure d'induire son activité toxique par un gain de fonction mais que l'implication pathologique d'une perte de fonction est dépendante du contexte physiologique dans lequel on se situe, comme le fond génétique ou la présence d'une auto-immunité (**voir II. 4. b. i. Tau et la pathologie de la myéline, p. 26**).

## II. 5. [Le modèle murin htau](#)

La nécessité de comprendre les mécanismes pathologiques liés à Tau a amené la communauté scientifique à produire des modèles murins. En 2015, une revue récapitule les modèles de tauopathies disponibles ([Dujardin, Colin, and Buee 2015](#)). La catégorie regroupant les modèles de souris transgéniques constitutif et dont l'expression peut être modulée en fonction du

promoteur choisi dénombrait 26 modèles différents. C'est dans cette dernière catégorie que se trouve le modèle htau choisit pour notre étude (**Figure 6**).



**Figure 6 : Description du modèle htau.** Ce modèle murin (**A**) est composée d'une délétion homozygote du gène murin *Mapt* ce qui entraîne une perte totale de l'expression endogène a l'état homozygote (**B**). L'insertion du gène *MAPT* humain (**C**) permet l'épissage alternatif des isoformes humaine (panel du haut) avec une prépondérance pour les 3R dépourvues de l'exon 10 (panel du bas). Le WB (**D**) rend compte d'une expression humaine et d'une augmentation importante de la quantité de Tau total. Figure adaptée de (Duff et al. 2000; Tucker, Meyer, and Barde 2001)

Le modèle htau est la résultante d'une délétion homozygote du gène endogène *Mapt* (Tucker, Meyer, and Barde 2001) et d'une surexpression du gène humain *MAPT* en absence de mutations (Duff et al. 2000) permettant, ensemble, la génération d'une souris « humanisée » pour le gène *MAPT* (Andorfer et al. 2003).

La délétion du gène *Mapt* par Tucker et al., (2001) a été effectué par insertion d'une séquence nucléotidique codante pour la GFP<sup>1</sup> dans le cadre de lecture de l'exon 1 du gène murin *Mapt*. Cette insertion a eu pour conséquence la perte d'expression de toutes les isoformes de Tau produite à l'âge adulte (Tucker, Meyer, and Barde 2001). Les auteurs de cette étude ont pu constater que le modèle *Mapt*<sup>-/-</sup> ne présente pas défaut en terme de viabilité, de fertilité ni de défauts morphologiques flagrants au niveau du SNC et du SNP. Une caractérisation plus approfondie de ce modèle a révélé une transmission synaptique basale normale par électrophysiologie en potentiel de champ post-synaptique mais une altération de la potentialisation à long terme lors d'émission de trains répétés de potentiels d'action appelés *theta burst*<sup>2</sup>. Si ces auteurs ont pu constater au niveau comportemental une altération de la mémoire de conditionnement il apparait de manière surprenante que la délétion homozygote

<sup>1</sup> De l'anglais *green fluorescent protein*

<sup>2</sup> Constitué de trois stimulations à fréquence thêta (4 à 8 Hz) espacés de 10 minutes

de *Mapt* est susceptible d'améliorer la mémoire spatiale à long terme étudiée en piscine de Morris (*Ahmed et al. 2014*).

La surexpression du gène humain *MAPT* en l'absence de mutations dans la lignée murine 8c par *Duff et al., en 2000* a été effectuée par intégration génomique d'un PAC<sup>1</sup> linéarisé et en l'absence des éléments vectoriels<sup>2</sup> et qui contenait l'ensemble des exons et des introns du gène *MAPT* ainsi que 7 kb d'éléments de la région promotrice. Cette lignée 8c présente à l'âge adulte<sup>3</sup> un épissage similaire à celui retrouvé chez l'Humain avec la production des six isoformes de Tau. Cependant, il apparaît qu'une expression préférentielle des isoforme 3R dépourvues de l'exon 10 codant un MBD est retrouvée au regard de l'expression des isoformes 4R. De manière anecdotique, l'expression de gène *MAPT* dans cette lignée n'a pas d'incidence sur la production des isoformes murines de Tau. Les auteurs ont pu constater que la très grande majorité des protéines Tau se trouve à l'âge adulte dans la fraction soluble après extraction protéique du cerveau de ces souris. La faible fraction insoluble est considérée comme probablement le reflet d'une liaison au RMT. L'immunomarquage sur coupes de cerveau met en évidence un signal intense de Tau au niveau neuronal et probablement au niveau synaptique ainsi que dans la matière blanche à la fois dans le cortex, l'hippocampe et le striatum. Contrairement à l'Humain le cervelet est dépourvu de marquage. Dans la moelle épinière, cette protéine Tau humaine est retrouvée dans les fibres axonales mais pas dans les corps neuronaux des motoneurones. Aucune anomalies au niveau moteur<sup>4</sup> ni d'anomalies pathologiques<sup>4</sup> n'ont été observées dans la moelle épinière à l'âge de huit mois. L'étude par ME a révélé, tout comme chez l'Humain en condition physiologique, la quasi absence de Tau au niveau somatique à la fois dans le cortex et l'hippocampe (*Duff et al. 2000*).

Ces deux modèles ont donc été combinés afin d'obtenir un modèle de souris « humanisé » pour le gène *MAPT*. La première caractérisation de ces souris au niveau moléculaire et histologique indique que l'expression Tau est uniquement due aux six isoformes humaines de Tau (*Andorfer et al. 2003*). Par ailleurs, une délocalisation subcellulaire de Tau est observée avec l'âge. Ainsi, alors qu'à six semaines la distribution de cette protéine est très majoritairement axonale au niveau cortical et de l'hippocampe, une augmentation

---

<sup>1</sup> De l'anglais *P1-derived artificial chromosome*

<sup>2</sup> De l'anglais *backbone*

<sup>3</sup> Non précisé par les auteurs

<sup>4</sup> Test non précisé par les auteurs

progressive du signal somato-dendritique est observée avec à neuf mois la présence d'inclusion intracellulaire dans l'hippocampe qui selon les auteurs ressemble au DNF retrouvés en histopathologie clinique humaine. Ces observations immuno-histochimiques ne présentent pas de variabilité entre les mâles et les femelles. Cette distribution d'inclusion de Tau qui suit une progression similaire à la maladie d'Alzheimer s'accompagne d'une augmentation du niveau de phosphorylation de Tau au niveau des sites reconnus par les anticorps AT8 et AT180<sup>1</sup>. Ainsi les premières régions atteintes sont localisées au niveau du CE et de l'hippocampe avec une propagation corticale sans atteinte striatale ni au niveau du cervelet. L'extraction des formes agrégées et insolubles de Tau a permis de déterminer que ces inclusion somatiques sont composées des isoformes 3R puisqu'aucune reconnaissance par des anticorps spécifiques des isoformes 4R n'a pu être constatée. Par ailleurs la taille des filaments de Tau observé d'environ 45 nm est comparable à celle observée des PHF isolée à partir d'extrait de cerveaux de patient LOAD (*Andorfer et al. 2003*). Une diminution du nombre de neurones au niveau du cortex piriforme ainsi qu'une altération de la gaine de myéline a été constaté chez de souris âgées de 22 mois. Ces pertes neuronales ne semblent pas être corrélées à la présence de Tau en filament. Une déstabilisation de la chromatine étayée par une fragmentation de l'ADN a également été constaté notamment au niveau de l'hippocampe mais les auteurs n'ont pas pu relier ce phénotype à une activation de l'apoptose dépendante des caspase (*Andorfer et al. 2005*). L'hypothèse d'une aggravation des phénotypes histologique et moléculaire par la combinaison d'une délétion endogène de Tau avec surexpression de Tau humain serait lié une perte d'équilibre du ratio 3R/4R. En effet, à l'âge adulte la souris exprime très majoritairement les isoformes 4R mais leur perte dans le modèle htau entrainerait une perte d'équilibre en faveur d'une accumulation de 3R qui présente une moins grande affinité pour le RMT. La toxicité lié à cet excès de 3R pourrait être médié à la fois par une déstabilisation accrue du RMT et une agrégation préférentielle de ces isoformes (*Andorfer et al. 2003; Andorfer et al. 2005*).

Au niveau comportemental, la première caractérisation de ces souris htau a permis d'identifier une altération dans le test de reconnaissance d'objet<sup>2</sup> ainsi que de la mémoire spatiale à long terme en piscine de Morris dès l'âge de 12 mois. L'une des différences notables

---

<sup>1</sup> Les auteurs ont utilisé les anticorps CP13 et CP9 pour visualiser la p-Ser202 et la p-Thr231 respectivement

<sup>2</sup> Temps passé de 5 et 30 min entre la phase de présentation et la phase de test

entre les âges testés de 4 et 12 mois est la perte de capacité de ces souris htau de présenter une potentialisation à long terme après stimulation à hautes fréquence<sup>1</sup> de la CA1. L'utilisation des mêmes souris permet de faire la corrélation entre les atteintes comportementales et électrophysiologiques (*Polydoro et al. 2009*).

Ces éléments mettent en évidence que le modèle htau présente les caractéristiques d'une maladie à prion avec atteinte séquentielle. La combinaison du gain et de la perte de fonction de Tau est nécessaire à la propagation de la toxicité de Tau et à l'établissement des phénotypes.

### III. Facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer à début tardif

Contrairement à l'EOAD, la LOAD ne présente pas de causes génétiques directes avec pénétrance totale (*Ridge et al. 2016*). Cette forme tardive atteint les personnes âgées de plus de 65 ans, ce qui a mis en avant l'âge comme facteur de risque premier. D'autres facteurs influencent l'établissement de la LOAD comme par exemple le faible niveau d'éducation, la faible sollicitation cognitive quotidienne ou le sexe (*Vina and Lloret 2010*). Ainsi la forte susceptibilité des femmes à développer des maladies co-morbides à la maladie d'Alzheimer comme l'obésité ou le diabète, accentue le risque de la contracter tardivement. Une des hypothèses les plus étudiées, et pour laquelle des essais cliniques sont opérés, repose sur le rôle neuroprotecteur des œstrogènes produits durant la période de fécondité et qui s'en trouve perturbé après la ménopause chez les femmes (*Vina and Lloret 2010*). En effet, il est proposé que les œstrogènes stimulent la production d'enzymes possédant des rôles antioxydants. Ainsi les espèces réactives à l'oxygène (ROS) produites par les mitochondries, dues à la toxicité intracellulaire des peptides A $\beta$ 40-42, sont limitées chez les jeunes rates par rapport aux mâles et aux femelles âgées (*Lloret et al. 2008*). Dans l'hippocampe de patients dits Alzheimer (atteints par la pathologie), il a été constaté une perte de neurones exprimant le récepteur nucléaire aux œstrogènes  $\alpha$  (*Hu et al. 2003*). Par ailleurs, ce récepteur est impliqué dans la régulation de la phosphorylation de Tau, ce qui suggère une potentielle dérégulation des modifications post-traductionnelles de la protéine Tau durant la ménopause (*Xiong et al. 2015*).

---

<sup>1</sup> 4 trains de stimulation de 100Hz avec 50 PA par train

L'analyse de génomes de patients atteint par la maladie d'Alzheimer a révélé au début des années 90, des polymorphismes du gène *APOE*. L'allèle *APOE4* est rapidement identifié à l'état hétérozygote comme un facteur de risque à la LOAD et amplifie le risque à l'état homozygote (*Corder et al. 1993; Strittmatter et al. 1993*). L'Apolipoprotéine E (APOE) avait déjà été reconnue dans les dépôts amyloïdes et que suite à sa mise en évidence génétique comme facteur de risque, la recherche s'est focalisée sur son interaction avec l'amyloïdogénèse (*Kim, Basak, and Holtzman 2009*). Ces éléments ont accentué la dichotomie conceptuelle sur les processus physiopathologique à l'origine de la maladie d'Alzheimer en faveur de l'amyloïde comme élément central, cantonnant de surcroît Tau à un rôle « secondaire ».

Au début du troisième millénaire, l'évolution des techniques de séquençage a permis de comparer les génomes de larges populations. L'étude d'association pangénomique (GWAS<sup>1</sup>) est une méthode d'analyse de ces génomes reposant sur l'association de polymorphismes nucléotidiques à un phénotype clinique. Les GWAS ont fortement associé l'allèle *APOE4* au déclin cognitif et à la maladie d'Alzheimer (*Bertram and Tanzi 2009*). Le deuxième gène dont les polymorphismes sont les plus fortement corrélés à la LOAD est celui de *BIN1*. En effet, les polymorphismes de la région promotrice de *BIN1* sont associés entre autre au déclin cognitif, à la progression de la LOAD (polymorphisme rs744373 ; *Zhang et al. 2015*), à l'augmentation de Tau et p-Tau dans le liquide céphalorachidien, à un déséquilibre dans le métabolisme du glucose, à une atrophie cérébrale ou encore à une atrophie de l'hippocampe (polymorphisme rs7561528 *(Wang et al. 2016)*). Enfin, parmi la liste des polymorphismes associés à la LOAD, celui associé fonctionnellement à une surexpression de l'ARNm de *BIN1* a particulièrement retenu notre attention (rs59335482 ; *(Chapuis, Hansmannel, Gistelinck, Mounier, Van Cauwenberghe, Kolen, Geller, Sottejeau, Harold, Dourlen, Grenier-Boley, Kamatani, Delepine, Demiautte, Zelenika, Zommer, Hamdane, Bellenguez, Dartigues, Hauw, Letronne, Ayril, Sleegers, Schellens, Broeck, Engelborghs, De Deyn, Vandenberghe, O'Donovan, Owen, Epelbaum, Mercken, Karran, Bantscheff, Drewes, Joberty, Champion, Octave, Berr, Lathrop, Callaerts, Mann, Williams, Buee, Dewachter, Van Broeckhoven, Amouyel, Moechars, Dermaut, Lambert, et al. 2013)*).

---

<sup>1</sup> De l'anglais, *Genome Wide Association Study*

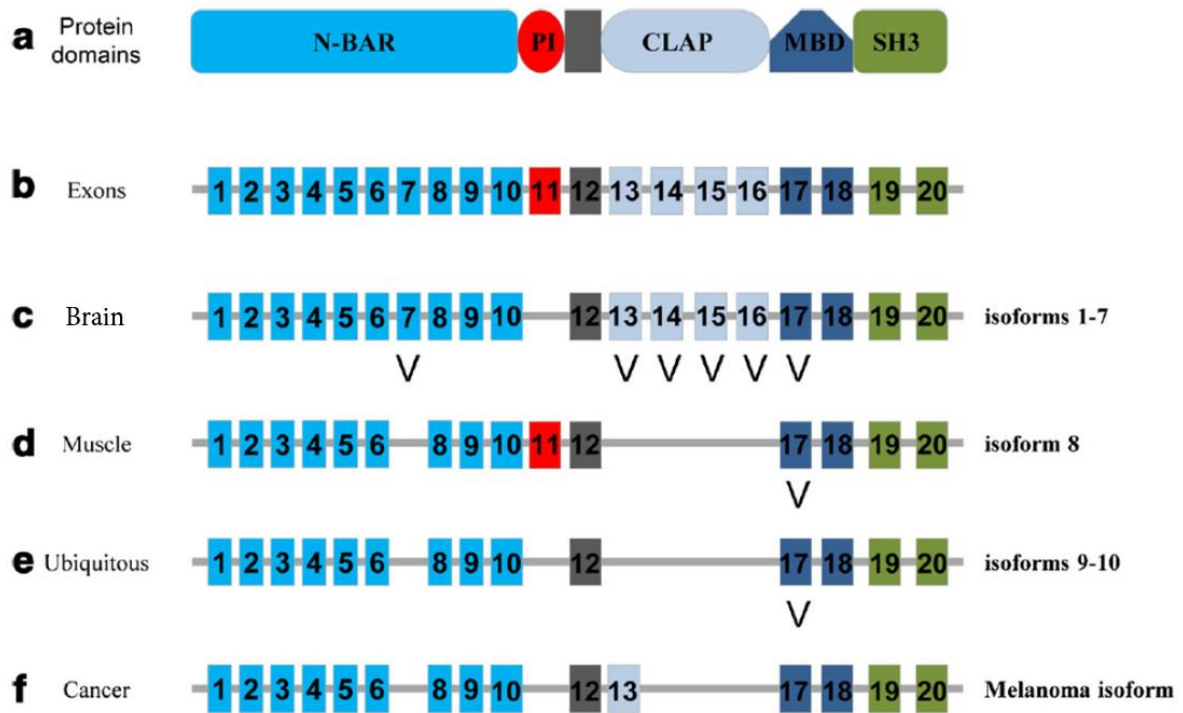
## IV. BIN1

C'est en 1996 que des expériences de clonage ont identifié une protéine présentant un domaine d'interaction à l'élément myc, un composant de régulation de la transcription (*Sakamuro et al. 1996*). La découverte de cette protéine « *myc box-dependant-interacting protein 1* » ou BIN1 (*Bridging Integrator 1*) a été confirmée la même année en ciblant des protéines présentant un domaine SH3 (*Sparks et al. 1996*). L'année suivante, une deuxième équipe identifie en ciblant également le domaine SH3, une protéine qui présente une grande similarité avec l'Amphiphysine 1 (AMPH1). Comme cette dernière avait déjà été répertoriée en tant que protéine impliquée dans l'endocytose et retrouvée très majoritairement dans le cerveau, ces auteurs attribuent à cette protéine nouvellement découverte le nom d'Amphiphysine 2. Cette étude pionnière met en évidence la production importante de cette protéine au niveau du tissu musculaire et cérébral (*Leprince et al. 1997*). C'est durant cette même année que la première caractérisation de *BIN1* au niveau du cerveau et du muscle de rat est effectuée (*Ramjaun et al. 1997*). Les auteurs de cette étude identifient alors un point essentiel pour la compréhension de ce gène : *BIN1* présente effectivement des épissages alternatifs permettant la production d'isoformes de plus grande taille au niveau cérébral chez l'humain.

### IV. 1. Isoformes de BIN1

Le gène *BIN1* code pour une protéine nommée Amphiphysine 2, SH3P9, *Myc box-dependent-interacting protein 1* ou BIN1. Dans un souci de simplification de lecture et conformément à la nomenclature régulièrement utilisée dans la littérature, nous utiliserons BIN1 pour évoquer la protéine. Ce gène possède 20 exons qui après transcription et épissage alternatif permet la synthèse de 10 isoformes actuellement décrites, dont aucune ne semble présenter l'inclusion des 20 exons à la fois (**Figure 7** ; (*Prokic, Cowling, and Laporte 2014*)). Toutes les isoformes présentent au moins un domaine BAR, MBD et SH3. Les isoformes 1 à 7 (ex. BIN1-iso1), spécifiques du tissu nerveux, présentent une inclusion différentielle de l'exon 7 appartenant au domaine BAR (**voir partie IV. 2. a Domaine BAR, p. 40**) et des exons 13, 14, 15 et 16 appartenant au domaine CLAP (**voir partie IV. 2. b. Domaine CLAP, p. 41**). L'isoforme musculaire inclue l'exon 11 codant pour un domaine de liaison aux phosphoinositides (PI). Les deux isoformes ubiquitaires (ex. BIN1-iso9) sont produites par épissage alternatif de l'exon 17.





**Figure 7 : Epissages alternatifs de BIN1.** La protéine BIN1 (a) présente 6 domaines fonctionnels dont leur inclusion est soumise à l'épissage alternatif de différents exons (b). Cela entraîne la formation de sept isoformes cérébrales (c), une isoforme musculaire (d), deux isoformes ubiquitaires (e). Notons que des aberrations d'épissage de *BIN1* peuvent mener à la production d'une isoforme répertoriée pro-oncogène (f).

### 1. a. Epissage pathologique

L'ARNm de *BIN1* est soumis à un épissage alternatif permettant une expression d'isoformes qui sont spécifique du tissu musculaire, du tissu cérébrale ou ubiquitaires. La dérégulation de cet épissage est souvent synonyme de pathologie. Ainsi, des erreurs d'épissage de *BIN1* ont été reportées chez des patients présentant une dystrophie myotonique et impliquent, au niveau du tissu musculaire, la perte d'inclusion de l'exon 11 qui lui est spécifique (Fugier et al. 2011). Cette perte d'exon chez la souris est en mesure de produire une altération dans la formation des T-tubules<sup>1</sup> (voir partie IV. 5. a. Myopathies centronucléaires, p. 48) et une diminution de la force musculaire. Cet épissage aberrant a été lié à l'élément d'épissage MBNL1<sup>2</sup> qui est bien moins exprimé dans le tissu nerveux que dans le muscle<sup>3</sup> (Fugier et al. 2011). Parmi les autres facteurs d'épissage, le facteur SRSF1<sup>4</sup> est spécifique du tissu nerveux. Cependant, sa surexpression a ainsi été identifiée dans des tumeurs humaines notamment

<sup>1</sup> Formation membranaire spécifique du tissu musculaire qui permet la propagation du potentiel d'action

<sup>2</sup> De l'anglais, *Muscleblind Like Splicing Regulator 1*

<sup>3</sup> <https://gtexportal.org/home/gene/MBNL1>

<sup>4</sup> De l'anglais, *Serine And Arginine Rich Splicing Factor 1*

## BIN1

mammaires (*Anczukow et al. 2012*). En effet, il induit directement l'inclusion de l'exon 13 de BIN1, normalement spécifique des isoformes cérébrales, dans les tissus mammaires. Cette inclusion induit une perte de liaison avec l'élément myc, un régulateur de la transcription, ce qui d'auto-entretient le processus d'épissage pathologique par induction de l'expression de SRSF1 véhiculée par myc.

Le niveau d'expression des éléments de régulation d'épissage est dépendant du tissu considéré. On retrouve par exemple une plus forte expression de SRSF1 dans le cervelet que dans l'hippocampe<sup>1</sup>. De plus, les éléments de régulation d'épissage diffèrent en fonction du type cellulaire, comme un neurone glutaminergique ou cholinergique, ainsi que de la période de développement de l'organisme (*Raj and Blencowe 2015*). A cela doit s'ajouter le polymorphisme des nucléotides impliqués dans la séquence de reconnaissance. L'affinité de reconnaissance des enzymes d'épissage pourrait s'en trouver déstabiliser et elles induiraient donc une inclusion ou une exclusion anormale d'exons.

### 1. b. Aspects génétiques

Le gène *BIN1* est présent sur le chromosome 2q14 chez l'humain et 18q32 chez la souris. L'homologie de séquence nucléotidique et protéique entre l'humain et la souris est respectivement de 89% et 95% (*Prokic, Cowling, and Laporte 2014*). Le clonage et la caractérisation fonctionnelle de la région promotrice de *Bin1* révèlent la présence d'une séquence de reconnaissance pour les messagers secondaires NF- $\kappa$ B<sup>2</sup> (*Mao et al. 1999*). Ce facteur est notamment impliqué dans la réponse cellulaire à un stress comme les ROS (*Kaltschmidt et al. 2000; Shalizi and Bonni 2005*). Après translocation nucléaire, ces éléments modulent l'expression de plusieurs gènes. Les réponses cellulaires sont donc soumises à la pression fonctionnelle de leurs cibles.

### 1. c. Nomenclature

En se focalisant sur l'hippocampe de rat, *Ramjaun et ses collaborateurs* ont identifié une localisation préférentielle de la protéine BIN1 au niveau synaptique. La couche moléculaire du GD<sup>3</sup> ainsi que les fibres moussues présentent elles aussi un marquage de BIN1. Les premières

---

<sup>1</sup><https://gtexportal.org/home/gene/SRSF1>

<sup>2</sup> De l'anglais, *Nuclear Factor Kappa B*

<sup>3</sup> Arborisation dendritique des cellules granulaires

conclusions de cette étude établissent alors une concentration de la protéine BIN1 au niveau cérébral avec un enrichissement au niveau axonal et présynaptique ([Ramjaun et al. 1997](#)). Pour arriver à ces conclusions, les auteurs ont eu recours à la production d'un anticorps ciblant le MBD présent dans toutes les isoformes connues de BIN1 ([Butler et al. 1997](#)). Il apparaît également que la protéine BIN1 présente un enrichissement au niveau du cône d'émergence de l'axone, où se situe l'AIS ([Li et al. 2011](#)) et que sa localisation axonale dans la substance blanche ne coïncide pas avec un marqueur de la myéline, suggérant une localisation préférentielle de BIN1 au niveau des nœuds de Ranvier ([Butler et al. 1997](#)). Cependant, la précédente constatation d'une localisation de la protéine BIN1 au niveau de l'élément présynaptique dans cette étude n'est pas retrouvée. Dans l'étude de Butler et ses collaborateurs en 1997 étude, les anticorps<sup>1</sup> utilisés pour visualiser la présence de BIN1 dans le cerveau de rat présentent une reconnaissance croisée entre les isoformes ubiquitaires et les isoformes cérébrales. Les auteurs concluent alors « *neuronal amphiphysin II may be a second component of this matrix (cortical cytomatrix)* ». Ce dernier élément va alors être source de confusion dans les années qui suivront. En effet, aucun élément ne permet de justifier que leur détection de la protéine BIN1 au niveau axonal est bien spécifique des isoformes cérébrales et qu'une expression de BIN1 dans le cerveau est exclusivement neuronale. Même si les premiers instigateurs de BIN1 au niveau cérébral nuancent dans une seconde publication en parlant d'une plus forte expression de la protéine au niveau neuronal, la confusion sera créée et l'association des isoformes à haut poids moléculaire seront alors majoritairement dénommées « isoformes neuronales » ([Ramjaun and McPherson 1998](#)).

Ce n'est que récemment que l'utilisation de plusieurs anticorps reconnaissant différents domaines de BIN1 a levé certaines zones d'ombre quant à l'expression de BIN1 en fonction de la structure cérébrale et du type cellulaire ([De Rossi et al. 2016](#)). Les anticorps utilisés ciblent respectivement le domaine MBD-SH3 (Ac BSH3), le domaine MBD (C99D) et le domaine BAR en l'absence de l'exon 7 (2FF1). Dans le CPF humain, ces trois anticorps révèlent un profil protéique de BIN1 qui semble bien plus complexe et qui sous-entend la possibilité d'épissage encore non décrits ou de manque de spécificité de ces trois anticorps ([De Rossi et al. 2016](#)).

---

<sup>1</sup> CD8 ciblant l'extrémité C-ter

## BIN1

Ces anticorps permettent également de localiser la protéine BIN1 sans discrimination d'isoforme et ne peuvent pas donc spécifiquement cibler les isoformes cérébrales. Dans cette étude, les immunohistochimies réalisées sur des biopsies cérébrales humaines, ont révélé un enrichissement de BIN1 au niveau de la matière blanche. L'expression de la protéine BIN1 (C99D) est retrouvée très majoritairement dans les axones ainsi que dans les oligodendrocytes (De Rossi et al. 2016; Adams et al. 2016). La réalisation de WB à partir du même type d'échantillon met en évidence la distinction de deux profils protéiques : un profil ubiquitaire à faible poids moléculaire d'environ 50 kDa (BIN1:L) et un profil cérébral à haut poids moléculaire d'environ 100 kDa (BIN1:H). De plus, lorsque la substance grise est séparée de la substance blanche, un enrichissement de la forme BIN1:H est clairement visualisé au niveau de la matière grise mais avec une expression maintenue dans la substance blanche (De Rossi et al. 2016). Ces données, reproduites chez le rat avec une distinction des structures cérébrales, présentent un profil BIN1:H au niveau du corps calleux<sup>1</sup>. De plus chez cette même espèce, le profil BIN1:H révélé avec BSH3 présente une augmentation de la densité entre P7 et P21 dans des cultures primaires d'oligodendrocytes (De Rossi et al. 2016).

Ainsi, à la vue de cet état de fait, nous n'utiliserons pas l'appellation « isoformes neuronales » mais celle de « isoformes cérébrales » ou encore « BIN1:H ».

### IV. 2. Structure de BIN1

#### 2. a. Domaine BAR

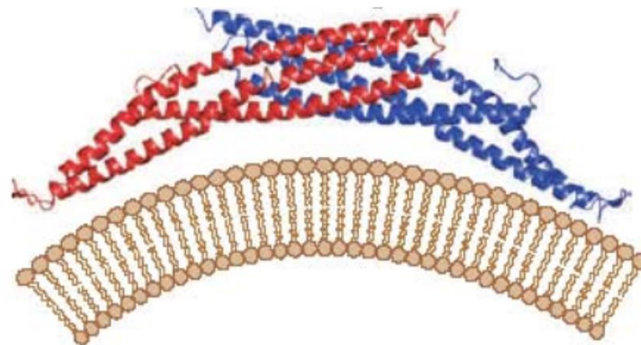
Au niveau N-ter, la protéine BIN1 présente un domaine Bin-Amphiphysin-Rvs (BAR), codé par les exons 1 à 10. Ce domaine est comparable au niveau structurel, par étude cristallographique, à la protéine RVS167 identifiée chez la levure et impliqué dans l'endocytose (Munn et al. 1995). Chez les mammifères, la « super famille » des protéines « Bin-Amphiphysin-Rvs » compte 28 membres dans laquelle est également présente la protéine AMPH1. C'est la dimérisation entre deux domaines BAR de BIN1 (ou entre celui de BIN1 et de AMPH1), qui permet la formation d'une double hélice amphipathique<sup>2</sup> possédant des fonctions tensioactives (Figure 8 ; (Kessels and Qualmann 2015)). Cela se manifeste par la

---

<sup>1</sup> Commissure transversale inter-hémisphères composée majoritairement d'axones et dépourvue de corps cellulaires neuronaux.

<sup>2</sup> Ou amphiphile (à la fois hydrophobe et hydrophile)

capacité de certains résidus à s'introduire partiellement dans la bicouche lipidique et par la faculté de l'hélice centrale positivement chargée à interagir avec la surface membranaire (Kessels and Qualmann 2015). Cette liaison physique à la membrane est régulée par l'état de charge des phosphatidylinositol phosphates (PIP) présents à la surface membranaire. Ainsi, l'affinité de la protéine BIN1 pour la membrane est augmenté par la présence de  $PI_{(4,5)}P_2$ ,  $PI_3P$  et  $PI_5P$  (Kessels and Qualmann 2015). Ce niveau de phosphorylation de la membrane est notamment régulé par la Myotubularine 1, présente à la fois dans le tissu musculaire<sup>1</sup> et le tissu nerveux<sup>1</sup> (Royer et al. 2013). Il apparaît également qu'après liaison aux PIP membranaires, la protéine BIN1 est en mesure d'induire un regroupement des PIP afin d'établir une plateforme membranaire distincte pour le recrutement de partenaires protéiques (Picas et al. 2014). La fonction principale de ce domaine BAR est donc de détecter, promouvoir et/ou maintenir les courbures membranaires de façon concave (D'Alessandro et al. 2015). Cette fonction est assurée par les combinaisons de domaine BIN1-BIN1, BIN1-AMPH1 mais également par le recrutement des partenaires protéiques.



**Figure 8 : La dimérisation du domaine BAR permet la formation d'une double hélice amphiphatique.** D'après (Montagner 2007)

## 2. b. Domaine CLAP

Le domaine CLAP, de l'anglais *clathrin and AP2 binding domain*, permet comme son nom l'indique une interaction directe avec la clathrine et la protéine adaptatrice 2 impliquée dans l'échafaudage membranaire de l'endocytose dépendante de la clathrine (Reider and Wendland 2011). Le domaine CLAP peut aussi interagir avec d'autres protéines adaptatrices

<sup>1</sup><https://gtexportal.org/home/gene/MTM1>

## BIN1

impliquées dans les processus d'endocytose des vésicules positives à la clathrine (CCV<sup>1</sup> ; *(Edeling, Smith, and Owen 2006)*).

### 2. c. Domaine SH3

Les domaines SH3 permettent l'interaction avec des protéines présentant un PRD comme la protéine Tau *(Yu et al. 1994)*. La « poche » acide formé par le domaine SH3 permet la liaison aux PRD. Cependant, certains peptides peuvent interagir avec le domaine SH3 même s'ils ne présentent pas de séquence consensus. Des ligands qui ne présentent pas d'états basiques pourraient même en mesure de présenter un appariement beaucoup plus important en terme de surface que les PRD *(Saksela and Permi 2012)*. Selon ces auteurs, cela entraîne indubitablement la nécessité de reconsidérer tous les interacteurs possibles du domaine SH3 en utilisant *in vitro* des bibliothèques de peptides aléatoires plutôt que des prédictions informatiques. Ainsi l'interactome centré sur BIN1 pourrait présenter une vaste étendue protéique.

Il apparaît également que le domaine SH3 de BIN1 est en mesure d'induire une interaction intramoléculaire *(Malki et al. 2017)*. En utilisant une protéine recombinante de BIN1-iso1<sup>2</sup>, les auteurs ont pu mettre en évidence par résonance magnétique nucléaire (RMN) une interaction entre le domaine SH3 et le domaine CLAP au niveau d'une même protéine. Cette interaction intramoléculaire entraîne une perte importante de la mobilité du domaine SH3 avec BIN1-iso1 **(Figure 9)**.



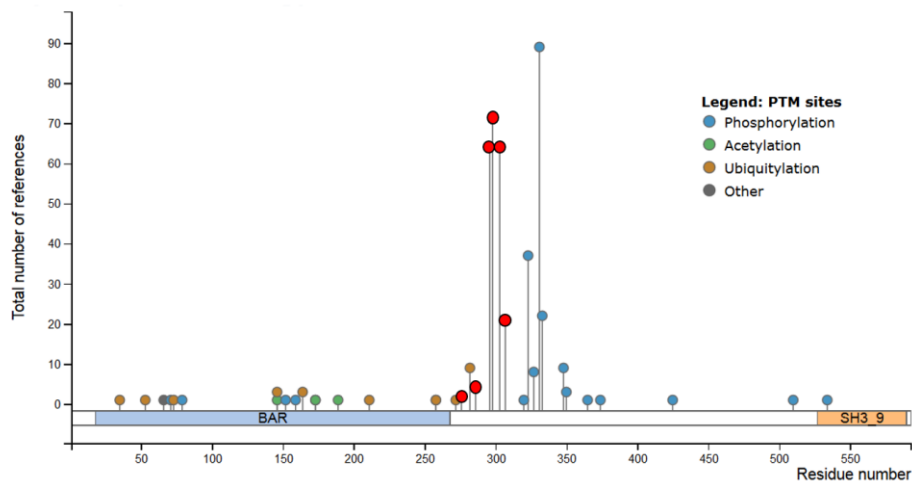
**Figure 9 : Interaction intramoléculaire de BIN1-iso1.** Cette interaction est assurée par la liaison des domaines CLAP et SH3 de BIN1.

<sup>1</sup> De l'anglais, *clathrin coated vesicles*

<sup>2</sup> Isoforme cérébrale

## 2. d. Phosphorylation de BIN1

Les interactions de BIN1 sont modulées par sa phosphorylation à la fois au niveau du domaine SH3 et du domaine CLAP (*Slepnev et al. 1998*). La **Figure 10** ci-dessous recense les sites de phosphorylation de BIN1, dans laquelle il apparaît clairement que le domaine CLAP est le plus soumis à ces processus de phosphorylation.



**Figure 10 : Représentation des modifications post-traductionnelles de BIN1.** La représentation conceptuelle de BIN1 avec ces 20 exons permet de rendre compte des MDT de BIN1 selon leur nombre de références bibliographique. En rouge sont représentées les phosphorylations du domaine PI spécifique de l'isoforme neuronale. Figure adaptée d'après le site [www.phosphosite.org](http://www.phosphosite.org)

Cette régulation de la phosphorylation de la protéine BIN1 est nécessaire à la modulation de son activité physiologique. Par exemple, lors de l'émission d'un potentiel d'action, la dépolarisation membranaire au niveau synaptique entraîne une hausse temporaire du niveau de calcium (*Koo et al. 2002*). Le calcium entrant va notamment permettre la liaison de la calmoduline à la calcineurine pour la rendre fonctionnelle. La calcineurine est une phosphatase qui exerce son activité sur un ensemble de protéines au niveau des résidus sérines et thréonines, comme c'est le cas avec BIN1 (*Koo et al. 2002*) et AMPH1 (*Bauerfeind, Takei, and De Camilli 1997*). L'exocytose synaptique s'accompagne donc d'une rapide déphosphorylation de BIN1 afin de préparer l'élément pré-synaptique au prochain potentiel d'action, le but étant de gérer la distribution spatiale du stock vésiculaire nécessaire en cas de stimulations répétitives ou de « burst » (*Koo et al. 2002*). *A contrario*, afin de contrôler le système et d'inactiver temporairement l'exocytose, la rapide rephosphorylation de la protéine

## BIN1

BIN1 pourrait être due à la caséine kinase 2, à la protéine kinase C ou aux CDK (*Doring et al. 2006*).

Par ailleurs, la phosphorylation du domaine BAR étudiée avec la protéine ACAP4<sup>1</sup> entraîne une capacité accrue de ce domaine à induire des remodelages membranaires (*Zhao et al. 2013*).

### IV. 3. BIN1 et le cytosquelette

#### 3. a. BIN1 et les microtubules

Les protéines partenaires de BIN1 peuvent être recrutées par le domaine BAR. En effet, celui-ci présente une séquence de liaison à la protéine CLIP-170 (*D'Alessandro et al. 2015*). En *in vitro*, CLIP-170 se fixe aux extrémités positives libres des tubulines et se meut en parallèle de la polymérisation des microtubules. Cela suggère un rôle de cet élément dans la dynamique de formation du RMT (*Folker, Baker, and Goodson 2005*). En culture cellulaire Hela<sup>2</sup>, la surexpression de la forme ubiquitaire BIN1-iso9 induit la formation de tubules membranaires intracellulaire. Cette formation de tubules est dépendante des microtubules et la déplétion de CLIP-170 réduit leur formation (*Meunier et al. 2009*). Notons que cette tubulation est également retrouvé en culture cellulaire COS-1<sup>3</sup> après transfection du domaine BAR\*<sup>4</sup> (*Nicot et al. 2007*). En *in vitro*, le domaine BAR de BIN1 est en mesure de former des tubes lipidiques en dehors d'un contexte cellulaire vivant mais avec une préparation enrichie en liposomes. L'étude cristallographique et la reconstruction moléculaire de l'assemblage de ces tubes révèle un enchevêtrement du domaine BAR de BIN1 à la surface lipidique. Ainsi, le domaine BAR de BIN1 est en mesure de recruter, par une réaction en chaîne, d'autres protéine domaines BAR de BIN1 pour former les tubes membranaires (*Adam, Basnet, and Mizuno 2015*).

#### 3. b. BIN1 et l'actine

Il apparait que les domaines BAR et SH3 de BIN1 sont en mesure d'interagir avec l'actine F (*Drager et al. 2017; D'Alessandro et al. 2015*). Cette liaison BAR-actine présente un caractère

---

<sup>1</sup> Malgré la présence du domaine BAR, ACAP4 n'est pas référencé dans la famille « Bin-Amphiphysin-Rvs »

<sup>2</sup> Lignée cellulaire provenant de métastases d'un cancer du col de l'utérus d'une patiente afro-américaine

<sup>3</sup> Cellules immortalisées provenant de rein de singes (*Chlorocebus*)

<sup>4</sup> Acides aminés 1-282, le domaine BAR\* contient le domaine de liaison aux phosphoinositides qui est codé par l'exon 11 spécifique du tissu musculaire.



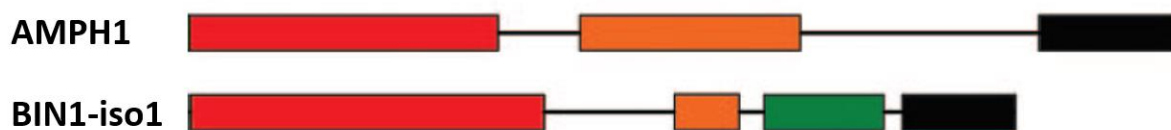
fonctionnel en induisant la polymérisation et la stabilisation de l'actine F par doublement de son temps de demi-vie (Drager et al. 2017). Cette même étude révèle que des doses croissantes, en *in vitro* sans cellules, de BIN1-iso1 humain sont en mesure d'induire des agrégats d'actine de la même manière que Tau dans son processus pathologique (Drager et al. 2017). Une co-sédimentation<sup>1</sup> de l'actine révèle que hBIN1-iso1 est en mesure de stabiliser les agrégats d'actine F induits par Tau. Enfin, une diminution de l'orthologue du gène *BIN1* dans un modèle de tauopathie chez la drosophile diminue la formation d'agrégats d'actine F dans le cerveau (Drager et al. 2017).

### 3. c. BIN1 à l'interface actine-microtubules

Par ailleurs, une étude sur la centralisation anormale des noyaux dans les fibres musculaires de patients atteints de certaines myopathies indiquent une implication de BIN1 dans la formation du cytosquelette d'actine et de microtubules. Celle-ci serait véhiculée par son interaction avec CLIP-170 et serait nécessaire au positionnement périphérique du noyau des cellules musculaires en conditions physiologique (D'Alessandro et al. 2015).

## IV. 4. Impact de la perte du complexe BIN1-AMPH1

Les similitudes entre les protéines BIN1 et AMPH1, ont conduit la communauté scientifique à considérer l'implication fonctionnelle de BIN1 dans les processus physiologique qui font appels à l'AMPH1. En effet, les séquences protéiques sont homologues à hauteur de 49% et elles présentent des domaines communs tel que CLAP, BAR et SH3 (Figure 11 ; (Ren et al. 2006).



**Figure 11 : BIN1 et AMPH1.** Les protéines AMPH1 et BIN1 présente une forte homologie protéique avec la présence commune du domaine SH3 (noir), CLAP (orange) et BAR (rouge). Ces deux derniers domaines ne présentent toutefois pas la même taille peptidique et le domaine MBD est exclusif de BIN1.

L'intrication étroite entre les protéines BIN1 et AMPH1 est également supportée par l'observation chez la souris d'une réduction quasiment totale de l'expression protéique de

<sup>1</sup> Ultracentrifugation avec analyse des composants des différents phases sédimentés

## BIN1

BIN1 uniquement au niveau cérébral, indépendamment du niveau de développement de l'animal, lorsque le gène *Amph1* est délété de façon homozygote (Di Paolo et al. 2002). Cependant, chez les souris, l'expression génique de *Bin1* subsiste suggérant que la formation d'hétérodimères entre les protéines BIN1 et AMPH1 serait nécessaire à la stabilisation protéique de BIN1 dans des cultures neuronales. Il alors apparait impossible de dissocier qui de BIN1 et/ou AMPH1 est l'acteur prépondérant dans l'établissement des phénotypes observés (Di Paolo et al. 2002). Ces souris *Amph1*<sup>-/-</sup> ne présentent pas de létalité périnatale mais une diminution du temps de survie des animaux à l'âge adulte avec 50% des animaux *Amph1*<sup>-/-</sup> qui meurt avant 10 mois. De manière intéressante, la délétion homozygote et constitutive du gène *Bin1* (Muller et al. 2003) ou sa restriction au tissu musculaire squelettique entraîne quant à elle une létalité périnatale (Cowling et al. 2017).

### 4. a. Endocytose et transport vésiculaires

C'est l'homologie partielle du domaine CLAP entre AMPH1 et BIN1 qui a amené une association entre BIN1 et l'endocytose des CCV. Ainsi la perte des protéines AMPH1 et BIN1 entraîne de fait une capacité amoindrie de la protéine adaptatrice 2 et de la clathrine à interagir, suggérant un rôle crucial de BIN1 et AMPH1 dans la structuration des complexes d'endocytose. Pourtant, il apparait que la nécessité d'une présence de BIN1-AMPH1 dans ce processus est sujette à controverse. La perte d'expression de ces deux protéines n'entraîne pas d'anomalies structurelles, lors de culture cellulaire *in vitro* ou en microscopie électronique *ex vivo*, que l'on analyse à l'aide de deux marqueurs pré-synaptiques : le nombre d'endosomes précoces qui succèdent à l'endocytose et le nombre de vésicules de l'élément présynaptique. Cependant, des stimulations électriques à 20 Hertz répétées plus de 600 fois<sup>1</sup> entraînent une diminution d'environ 25% de ces deux marqueurs pré-synaptiques. Ces données suggèrent un effet prépondérant de BIN1-AMPH1 dans le recyclage des éléments membranaires lors de stimulation répétitives mais pas à l'état basal (Di Paolo et al. 2002). Ces éléments ont également été retrouvés chez des rats immunisés contre le domaine SH3 de l'AMPH1. En effet des stimulations à hautes fréquences du nerf sciatique chez ces rats  $\alpha$ -AMPH1 mettent en évidence au niveau pré-synaptique une diminution du stock des vésicules de neurotransmission et des CCV liées au recyclage par endocytose (Werner et al. 2016). Enfin,

---

<sup>1</sup>*burst stimulation*

des données obtenues à partir de culture de fibroblastes issus d'embryons murins (MEF<sup>1</sup>), semblent indiquer que l'abolition du complexe BIN1-AMPH1 n'entraîne pas de défauts dans les processus d'endocytose (*Muller et al. 2003*).

Au niveau du SNC, l'inclusion spécifique de l'exon 7 dans le domaine BAR permet d'augmenter l'affinité de liaison entre les protéines BIN1 et dynamine 2 (*Ellis et al. 2012*). De plus, leur liaison augmente considérablement la capacité d'endocytose cellulaire. La protéine BIN1 ne présentant pas d'activité de fission membranaire, celle-ci est notamment assurée par le complexe protéique impliquant la dynamine 2 (*Ellis et al. 2012*). Selon ces auteurs, la régulation de l'épissage de cet exon est primordiale pour basculer l'interaction vers la dynamine 2 avec l'exon 7 ou l'AMPH1 sans l'exon 7 et ainsi promouvoir ou non les processus de fission permettant une endocytose.

Les CCV sont également un élément essentiel dans le transport vésiculaire à partir de la partie *trans* de l'appareil de Golgi, dernière étape de maturation protéique avant l'adressage cellulaire notamment via le RMT. En culture neuronale<sup>2</sup>, il apparaît que BIN1, AMPH1, la protéine adaptatrice 1 et l'endophiline A1 sont des éléments constitutifs de ces CCV émanant du Golgi. Contrairement à l'endocytose dépendante de la protéine adaptatrice 2, le complexe comprenant la protéine adaptatrice 1 et les CCV serait l'élément discriminant entre l'endocytose membranaire et le trafic cellulaire en provenance du Golgi (*Huser et al. 2013*).

### 4. b. Croissance neuritique

L'inhibition de l'expression d'AMPH1, qui augmente normalement avec le temps en culture neuronale, par des oligonucléotides anti-sens entraîne une diminution drastique de la complexité neuritique, analysée de manière qualitative, dans une étude réalisée en 1998 (*Mundigl et al. 1998*). Dans cette étude, les auteurs ont constaté une délocalisation dans le cytoplasme de l'actine immunomarquée. Ainsi, la perte de croissance neuritique est corrélée à l'effondrement du cytosquelette de microtubule et d'actine. Cette actine est retrouvée condensée et enchevêtrée, au niveau péri-nucléaire. Dans ces conditions cellulaires, aucune anomalie du recyclage par technique de la recapture de transferrine, n'a été identifiée au niveau somatique (*Mundigl et al. 1998*). Cette étude se déroule durant la période de

---

<sup>1</sup> De l'anglais *mouse embryo-derived fibroblasts*

<sup>2</sup> Cellules granulaires du cervelet de souris

## BIN1

découverte de BIN1 et ce n'est que quatre ans plus tard que la mise en évidence d'une réduction drastique de BIN1 au niveau cérébral par délétion de *Amph1*<sup>-/-</sup> sera effectuée (Di Paolo et al. 2002).

### 4. c. Comportement

D'un point de vu comportemental, la perte de BIN1 et AMPH1 entraîne, entre 5 et 7 mois, une altération de la mémoire spatiale et à long terme en piscine de Morris en condition de rappel à long terme (24 heures). La mémoire de conditionnement est également altérée lors du rappel des indices associés au choc et de son environnement (Di Paolo et al. 2002). Cette perte de BIN1 et AMPH1 se traduit également, à 12 semaines, par une apparition plus soudaine de phénotypes épileptogéniques induit par metrazol<sup>1</sup> (Di Paolo et al. 2002).

## IV. 5. Aspect physiopathologique

A l'instar de la protéine Tau, BIN1 apparait comme étant une protéine pléiotropique mais ses fonctions cellulaires sont bien moins comprises. L'étude des causes sous-jacentes aux myopathies centronucléaires a apporté sa contribution dans l'étude des fonctions de BIN1.

### 5. a. Myopathies centronucléaires

Dans les myopathies centronucléaires, lorsque des mutations sont retrouvées sur les gènes codant pour la myotubularine 1 (MTM1), BIN1 et la dynamine 2 une perturbation de la voie moléculaire communément appelé *MAD*<sup>2</sup> *pathway* est constatée. Cette voie MAD permet l'organisation structurelle de la membrane plasmique allant de la phosphorylation des PI par MTM1, à leur liaison par BIN1 pour sentir et promouvoir le repliement membranaire exacerbé par la dynamine 2 jusqu'au maintien d'une tubulation membranaire appelé des T-tubules dans le muscle, indispensable à la bonne propagation du potentiel d'action au niveau de la jonction neuro-musculaire (Prokic, Cowling, and Laporte 2014).

D'autres mutations du gène *BIN1* entraîne, en plus d'une symptomatologie musculaire, de possibles désordres du SNC. Chez trois patients atteints de myopathie centronucléaires, des mutations autosomales récessives faux sens<sup>3</sup> de *BIN1* ont été corrélées à un phénotype de

---

<sup>1</sup> Pentaméthylènetétrazol, antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>

<sup>2</sup> MAD pour **M**TM1, **A**mphiphysine 2 et dynamine 2

<sup>3</sup> Mutation ponctuelle d'un nucléotide d'un codon entraînant le changement de l'acide aminé associé

« retard mental » avec un niveau moyen-bas du quotient intellectuel (QI=60 à 70 ; *(Claeys et al. 2010; Bohm et al. 2010)*).

#### 5. b. Modulation de l'expression de BIN1 dans la LOAD

L'implication potentielle de *BIN1* dans la LOAD a été mise en évidence au niveau génique, comme nous l'avons précédemment vu, avec des polymorphismes corrélés à différents aspects de la pathologie (*(Chapuis, Hansmannel, Gistelinck, Mounier, Van Cauwenberghe, Kolen, Geller, Sottejeau, Harold, Dourlen, Grenier-Boley, Kamatani, Delepine, Demiautte, Zelenika, Zommer, Hamdane, Bellenguez, Dartigues, Hauw, Letronne, Ayrat, Sleegers, Schellens, Broeck, Engelborghs, De Deyn, Vandenberghe, O'Donovan, Owen, Epelbaum, Mercken, Karran, Bantscheff, Drewes, Joberty, Campion, Octave, Berr, Lathrop, Callaerts, Mann, Williams, Buee, Dewachter, Van Broeckhoven, Amouyel, Moechars, Dermaut, Lambert, et al. 2013)*; *(Zhang et al. 2015)*; *(Wang et al. 2016)*). De plus, une méthylation différentielle de l'ADN du locus contenant *BIN1* a été découverte chez les patient LOAD. Cette méthylation peut moduler le niveau de transcription d'un gène, en modifiant le niveau de condensation de la chromatine ou par modification d'affinité des éléments liant la région promotrice (*De Jager et al. 2014*). En outre, une surexpression de l'ARNm total de *BIN1* a été identifiée au niveau du CPF chez des patients avec une LOAD présentant des plaques amyloïdes et un stage Braak de 6 (*Chapuis, Hansmannel, Gistelinck, Mounier, Van Cauwenberghe, Kolen, Geller, Sottejeau, Harold, Dourlen, Grenier-Boley, Kamatani, Delepine, Demiautte, Zelenika, Zommer, Hamdane, Bellenguez, Dartigues, Hauw, Letronne, Ayrat, Sleegers, Schellens, Broeck, Engelborghs, De Deyn, Vandenberghe, O'Donovan, Owen, Epelbaum, Mercken, Karran, Bantscheff, Drewes, Joberty, Campion, Octave, Berr, Lathrop, Callaerts, Mann, Williams, Buee, Dewachter, Van Broeckhoven, Amouyel, Moechars, Dermaut, Lambert, et al. 2013*). Cependant, une diminution de 34% de *BIN1*-iso1 indépendamment d'une mort neuronale a été observée dans le CPF chez le même type de patients (*Glennon et al. 2013*). De plus, cette étude a révélé une l'absence de corrélation entre le niveau soluble de *BIN1*-iso1 et le pourcentage d'aires cérébrales immuno-positives pour les inclusions intracellulaire de Tau, mais ces deux expériences ont été réalisés sur des groupes distincts de patients atteints de LOAD (*Glennon et al. 2013*). D'autres données suggèrent qu'un mécanisme de régulation de la production et/ou le maintien des différentes isoformes cérébrales et ubiquitaires, et donc du ratio *BIN-H/BIN1-L*, est perturbé dans la LOAD. Ainsi, une surexpression de *BIN1*-iso9 au niveau de l'hippocampe, du CPF et du

## BIN1

cortex pariétal inférieur qui contient le gyrus supramarginal et le gyrus angulaire chez les patients LOAD présentant des plaques amyloïdes et un stage Braak compris entre 3 et 6 a été observée (Holler et al. 2014). Cette isoforme, qui est exprimée de manière ubiquitaire, est positivement corrélée au nombre de DNF ( $R^2 = 0,1$  avec  $p=0,0002$ ) avec la même méthode que précédemment décrite par Glennon et al., en 2013. Une diminution d'expression de BIN1-iso1 dans l'hippocampe et le cortex pariétal inférieur est également retrouvée (Holler et al. 2014). Il n'est pas possible de corrélérer le schéma de propagation des DNF avec le niveau d'expression de BIN1-iso1 ni de déterminer si cette diminution du ratio BIN1-iso1/BIN1-iso9 est antérieure aux processus pathologiques de la maladie d'Alzheimer. Il n'a pas non plus été déterminé si ce processus est la résultante d'un épissage aberrant, de modification d'expression de BIN1-H et/ou BIN1-L ou d'une stabilisation d'un complexe moléculaire en faveur de BIN1-L. Néanmoins, il paraît important de considérer qu'un déséquilibre de ce ratio puisse présenter un caractère pathogénique, comme certaines tauopathies.

Notons, qu'aucune variation de BIN1-iso1 au niveau de l'hippocampe de patients EOAD n'a été retrouvée (Glennon et al. 2013) ce qui suggère que les modifications d'expression de *BIN1* sont exclusives de la LOAD. Enfin, la caractérisation histologique de BIN1 au niveau cérébral, chez des patients LOAD présentant des plaques séniles et un stage Braak de 5 accompagné d'une démence prononcée, présente une délocalisation de l'axone vers le compartiment somatique péri-nucléaire (Adams et al. 2016).

### 5. c. BIN1 et les oligodendrocytes

Des immunohistochimies sur des hippocampes de patients LOAD présentant des plaques amyloïdes et un stage Braak 5 et 6, révèlent une localisation préférentielle de BIN1 au niveau neuronale avec une localisation proche<sup>1</sup> du RMT. Les auteurs n'ont effectivement pas observé de co-localisation de BIN1 avec les astrocytes et les cellules de la microglie et n'ont pas réalisé de co-marquage avec les oligodendrocytes (Chapuis, Hansmannel, Gistelink, Mounier, Van Cauwenberghe, Kolen, Geller, Sottejeau, Harold, Dourlen, Grenier-Boley, Kamatani, Delepine, Demiautte, Zelenika, Zommer, Hamdane, Bellenguez, Dartigues, Hauw, Letronne, Ayrat, Slegers, Schellens, Broeck, Engelborghs, De Deyn, Vandenberghe, O'Donovan, Owen, Epelbaum, Mercken, Karran, Bantscheff, Drewes, Joberty, Campion, Octave, Berr, Lathrop,

---

<sup>1</sup> Microscopie confocale, résolution spatiale entre 200 et 400 nm. Taille des microtubules d'environ 25 nm

*Callaerts, Mann, Williams, Buee, Dewachter, Van Broeckhoven, Amouyel, Moechars, Deraut, Lambert, et al. 2013*). Cette perte de BIN1 au niveau du neuropile s'accompagne d'une perte de la matière blanche. De la même manière que reportée par *Adams et al.*, une perte de BIN1 au niveau du neuropile est observée chez les patients avec une LOAD (*De Rossi et al. 2016*). Les auteurs ont pu constater une diminution du ratio BIN1-H/BIN1-L due à la combinaison de la surexpression de BIN-L et de la sous-expression de BIN-H.

De plus chez le rat, les mêmes auteurs ont pu mettre en évidence que le profil protéique complexe révélé avec BSH3, notamment de BIN1-H, présente une augmentation d'expression entre P7 et P21 dans des cultures primaires d'oligodendrocytes. Cela met en évidence que l'enrichissement de BIN1 dans les oligodendrocytes est concomitant aux « processus de myélinisation » visualisés pour leur part par la hausse d'expression des composants basiques de la myéline (*De Rossi et al. 2016*).

#### 5. d. BIN1 et l'amyloïdogénèse

Une étude récente suggère une implication de BIN1-iso1 dans la modulation de l'amyloïdogénèse (*Miyagawa et al. 2016*). La réduction, en culture primaire neuronale, du niveau de BIN1-iso1 entraîne une augmentation de production des peptides A $\beta$ 40-42. La même diminution, par ARN interférant de BIN1 dans des cellules Hela, entraîne une perturbation du recyclage membranaire avec une augmentation d'endosome précoce présentant BACE1<sup>1</sup>, l'un des complexes enzymatiques nécessaire au clivage de l'APP (*Miyagawa et al. 2016*).

L'impact d'une surexpression de *BIN1* dans un modèle murin développant des plaques amyloïdes est en cours d'étude par la Dr Monica Rataj Baniowska dans l'équipe du Dr Yann Hérault.

#### 5. e. BIN1 et Tau

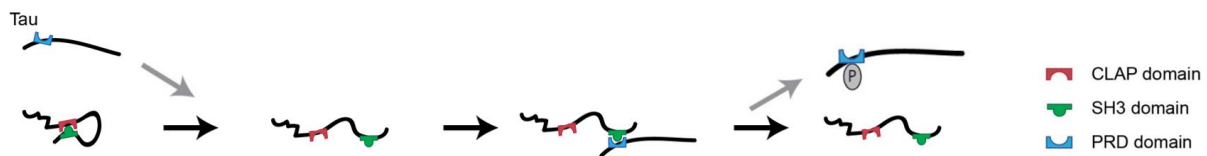
Au niveau moléculaire, le PRD (210-240) de Tau a été identifié par RMN comme interagissant avec le SH3 de BIN1-iso1 et BIN1-iso9 (*Malki et al. 2017*). De manière intéressante Tau interagit avec le domaine SH3 de BIN1-H, rompant ainsi l'affinité intramoléculaire de BIN1-iso1 (CLAP-SH3). Cela entraîne de surcroît un changement de structure tertiaire de BIN1

---

<sup>1</sup> De l'anglais, *beta-site APP cleaving enzyme 1*

## BIN1

partant d'une position « repliée » BIN1-BIN1 vers une position « ouverte » BIN1-Tau (**Figure 12** ; (Malki et al. 2017).



**Figure 12** : Tau, en fonction de la phosphorylation de Thr231, est en mesure de rompre l'interaction CLAP-SH3 et d'interagir avec BIN1-iso1 via son PRD.

Il apparaît également lors d'une expérience de liaison de proximité (PLA<sup>1</sup>) en culture neuronale primaire<sup>2</sup> que cette interaction moléculaire BIN1-Tau ait lieu au niveau somato-dendritique (Sottejeau et al. 2015). Ces mêmes PLA combinées à une immunofluorescence de l'actine montrent une possible interaction de ces complexes BIN1-Tau au niveau du cytosquelette d'actine. Les auteurs n'ont pas identifié de complexe BIN1-Tau au niveau des éléments pré- et post-synaptique. Notons que toutes ces expériences ont été conduites au cours du développement neuronal murin, sans transfection cellulaire. On ne peut donc pas présupposer que ces interactions aient également lieu à l'âge adulte pendant lequel une différence d'isoformes de Tau est constatée.

Enfin, le niveau de phosphorylation de Tau module l'interaction Tau-SH3 (Sottejeau et al. 2015). En effet, une augmentation *in vitro* de la phosphorylation de Tau à des sites<sup>3</sup> proches ou dans le PRD est en mesure de diminuer cette interaction intermoléculaire par RMN. Des expériences de PLA entre BIN1 et différents résidus phosphorylés de Tau montrent la présence d'un signal à l'exception de la phosphorylation de la Thr231 révélée avec AT180 (**Figure 12** ; (Sottejeau et al. 2015), indiquant ce résidu comme un élément régulateur de l'interaction BIN1-Tau. Nous ne pouvons pas exclure la présence d'autres sites de Tau et/ou de BIN1 qui selon leur état de phosphorylation peuvent également contribuer à cette modulation.

<sup>1</sup> De l'anglais, *proximity ligation assay*

<sup>2</sup> Co-culture de neurones corticaux et hippocampiques de rat

<sup>3</sup> Détermination non exhaustive des résidus. Identification par anticorps des épitopes phosphorylés (AT270, AT8 et AT180)



5. f. BIN1 et la toxicité de Tau *in vivo*

Parmi les modèles d'études de la tauopathie *in vivo*, la drosophile présente l'avantage d'avoir un temps de développement relativement court par rapport aux modèles murins. Cela permet d'étudier plus rapidement l'impact de modifications génétiques sur le phénotype. Ainsi, la production de l'isoforme Tau 2N4R humaine chez cette espèce permet d'induire une neurotoxicité importante au niveau des ommatidies<sup>1</sup>. De manière intéressante, le phénotype le plus prononcé de dégénérescence de cette structure, en partie composée de cellules neuronales, est obtenu avec la plus faible expression de Tau-2N4R (*Povellato et al. 2014*).

Chez la drosophile, un seul orthologue des gènes *AMPH* et *BIN1* est retrouvé avec une homologie des séquences peptidiques codantes pour les domaines BAR et SH3 de BIN1 chez les vertébrés de 60% et 58% respectivement. La perte de cette protéine qui est normalement retrouvée dans le compartiment post-synaptique à l'état larvaire, entraîne une perte importante des capacités locomotrices (*Leventis et al. 2001*).

La combinaison des modèles Tau-2N4R et de délétion du gène *amph* chez la drosophile permet de rendre compte d'une restauration partielle et significative du phénotype induit par la protéine Tau (*Chapuis, Hansmannel, Gistelinc, Mounier, Van Cauwenberghe, Kolen, Geller, Sottejeau, Harold, Dourlen, Grenier-Boley, Kamatani, Delepine, Demiautte, Zelenika, Zommer, Hamdane, Bellenguez, Dartigues, Hauw, Letronne, Ayrat, Slegers, Schellens, Broeck, Engelborghs, De Deyn, Vandenberghe, O'Donovan, Owen, Epelbaum, Mercken, Karran, Bantscheff, Drewes, Joberty, Champion, Octave, Berr, Lathrop, Callaerts, Mann, Williams, Buee, Dewachter, Van Broeckhoven, Amouyel, Moechars, Dermaut, Lambert, et al. 2013*). Cette expérience est la première caractérisation d'un lien fonctionnel *in vivo* entre la toxicité induite par Tau et le niveau d'expression d'*amph*. La différence de complexité génétique, moléculaire et physiologique entre la drosophile et l'humain ne permet pas de transposition physiologique complète. Ainsi, une étude récente a établi qu'une diminution d'expression de BIN1-iso1 à la fois en culture de cellules humaines (HEK293) et en culture de neurones de rat, entraînait la propagation de cellules en cellules, de la protéine de Tau sous sa forme mutée P301L (*Calafate et al. 2016*). Les auteurs émettent l'hypothèse que la diminution d'expression de BIN1-iso1 ne permettrait plus la séquestration de Rab5<sup>2</sup> qui est un acteur majeur dans la formation

---

<sup>1</sup> Sous-unités composant les yeux

<sup>2</sup> De l'anglais, *Ras-related protein*

## BIN1

d'endosomes précoces. Ainsi, la sur-activation de Rab5 entrainerait l'augmentation de l'internalisation neuronale des agrégats Tau présents dans la matrice extracellulaire via des processus d'endocytose et de trafic membranaire (**voir partie II. 4. d. Propagation synaptique, p. 28**). Il apparait donc que BIN1 soit un élément médiateur potentiel dans le transfert cellulaire de protéines toxiques, retrouvé dans les maladies à prions.

## Objectifs du travail de recherche

---

Dans un premier temps, ces travaux de thèse ont eu pour objectif de déterminer l'impact d'une surexpression du gène *BIN1* chez la souris et d'amener des éléments de compréhension des fonctions de BIN1 au niveau cérébral. Le modèle *TgBIN1* est pour l'heure la seule base d'étude de l'impact d'une surexpression du gène *BIN1* humain chez les mammifères, au niveau comportemental, histologique et cellulaire. Le but est d'identifier des mécanismes moléculaires, peut-être spécifiques du tissu cérébral, qui sont présent au niveau physiologique et qui pourraient devenir pathologique en condition de surexpression. Pour y répondre, des expériences moléculaires, cellulaires, histologiques et comportementales ont été réalisées. Celles-ci sont présentées dans les premières parties Résultats & Discussion traitant de la surexpression de *BIN1*. Une partie a été intégrée dans un article en cours de soumission disponible **en Annexe, partie IV. 1 Article I : TgBIN1, p. 191.**

Dans un second temps, nous avons étudié d'une combinaison de ce modèle *TgBIN1* avec le modèle de tauopathie htau. Celui-ci a eu pour but de déterminer si l'interaction de BIN1 et de Tau, fonctionnelle chez la drosophile, présente un caractère prophylactique ou délétère pour l'organisme murin. Pour déterminer l'intégrité des connectomes neuronaux, des expériences longitudinales de comportement ont été réalisées chez les mêmes souris, mâles et femelles, tous les 3 mois jusqu'à 15 mois. L'impact fonctionnel au niveau cellulaire et moléculaire chez ces animaux a ensuite été réalisé. Pour ce faire, nous avons choisi de prospecter de nouvelles voies moléculaires dévoilées par la réalisation de notre premier objectif sur le rôle physiologique de BIN1. Cette étude permet de rendre compte de l'impact d'une surexpression de BIN1 dans l'émergence et/ou la cinétique de la tauopathie, qui a été traité en deuxième partie des Résultats & Discussion. Elle permet également la réalisation d'un article scientifique en cours de rédaction et disponible **en Annexe, partie IV. 2. Article II : htau;TgBIN1, p. 192.**

Nous avons également commencé à étudier l'impact d'une diminution d'expression de *Bin1* combinée au modèle htau. Les données préliminaires et comportementales nous renseignent sur l'impact du niveau de dose de BIN1, et sont présentées en troisième partie des Résultats & Discussion.







# Matériels & Méthodes

---

Un complément d'information de cette partie Matériel et Méthodes est disponible dans les articles mis à disposition **en Annexe, partie IV. Articles, p. 191**. De plus, les figures et tableaux supplémentaires appelés Figure S et Tableau S respectivement, sont accessibles **en Annexe, partie I. Figures supplémentaires, p. 175 et II. Tableaux supplémentaires, p. 181**.

## I. Animaux utilisés

### I. 1. Procédures éthiques

Le présent projet a reçu l'approbation numéro 2014-056 par le comité d'éthique interne de l'IGBMC numéro 17 (Com'Eth) et a été accrédité par le ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche en accord avec la directive 2010/63/EU et couvre la période d'Octobre 2014 à Octobre 2019. La référence de ce projet est APAFIS#5166-2016042511148907.vl ayant pour titre « *Etude comportementale de souris transgéniques impliquant des gènes à facteur de risque dans le développement du LOAD (Late Onset Alzheimer Disease)* », déposé par l'Etablissement Utilisateur: Institut clinique de la souris, numéro d'agrément 86721840, dont le responsable est le Dr. Yann Héroult et dont le responsable de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est le Dr. Yann Héroult. J'ai obtenu mon attestation relative à l'expérimentation animale (N° R-67UNISTRA-F1-10) le 9 mai 2016.

En pratique, les animaux utilisés (mâles et femelles) ont été hébergés en milieu social avec des congénères compatibles (2 à 5 animaux par cage). Les points limites des expériences ont été préalablement fixés comme suit : les animaux présentant des signes de mal être ou de douleur (griffures/plaies, hérissément du poil, attitude voûtée, perte de poids) seront présentés au vétérinaire de la clinique de la souris (iCS) puis mis à mort par un gradient progressif de CO<sub>2</sub>. Les traitements proposés pour palier à ces problèmes peuvent interférer avec les tests comportementaux.

Tous les animaux hébergés dans des cages ventilées ont été exposés à un cycle constant de lumière 12 heures et d'obscurité 12 heures (lumière à 7h du matin) avec de l'eau et de la nourriture *ad libitum*. La pièce d'hébergement a été maintenue dans à température constante (23±1°C).

Tous les tests comportementaux effectués ont été réalisés durant la journée (phase de repos des animaux) et ont été précédés d'une phase de manipulation des animaux pour une acclimatation à l'expérimentateur durant une semaine avant le premier test. Le changement de cages fut réalisé par les animaliers de la zone de phénotypage, à l'exception des semaines de tests comportementaux où les cages ont été changées par l'expérimentateur au minimum trois jours avant une nouvelle expérience (et avec ajout d'une petite proportion de litière sale). L'ensemble des animaux et leur références sont disponibles sur le logiciel « mouse » interne à l'IGBMC.

### 1. 2. Création de la souris TgBIN1 surexprimant le gène BIN1 humain

#### 2. a. Croisements

Tous les croisements, à l'exception du croisement ayant permis la génération des animaux *Bin1*<sup>-/-</sup> ; TgBIN1 réalisé sur fond mixte C57BL/6J et 129PAS, ont été réalisés sur fond pur à plus de 97% C57BL/6J. Les souris ne présentant aucune modification génétiques sont appelés souris WT.

Les souris présentant une délétion des allèles *Bin1* (Cowling et al. 2017) ainsi que les souris surexprimant le gène *BIN1* (Daudin et al. en soumission) (Cowling et al. 2017) (Cowling et al. 2017) humain ont été générées par l'iCS. Les souris modélisant des phénotypes de tauopathies par surexpression du gène *MAPT* humain et de délétion du gène *Mapt* murin, nommées « htau », ont été commandé au Jackson Laboratory (Stock No: 005491 ; B6.Cg-*Mapt*<sup>tm1(EGFP)Kit</sup> Tg(MAPT)8cPdav/J ; (Duff et al. 2000; Tucker, Meyer, and Barde 2001; Andorfer et al. 2003).

Afin d'obtenir un minimum de 10 animaux par groupes et par sexe dans l'étude du modèle combiné de tauopathie et de de surexpression de *BIN1*, un total de 72 animaux ont été généré dans trois sous-cohorte (n≈20) et présentant un mélange homogène des génotypes et des sexes.

#### 2. b. Identification

Les nouveaux nés ont fait l'objet d'un prélèvement de leur queue à l'âge de trois semaines avec la mise en place d'une « boucle d'oreille » numérotée permettant leur identification. Etant donné l'âge avancé des animaux en fin d'étude (18 mois) et la forte probabilité de perte d'identification ainsi qu'un soucis de réduire au maximum les contentions imposés aux



animaux pouvant être générateur de stress, un tatouage à la queue a été réalisé à l'âge de 6 mois permettant une identification pérenne sans besoin d'une manipulation contraignante envers l'animal.

## 2. c. Génotypage

Les amorces utilisés lors des réactions de PCR afin d'identifier les génotypes des souris obtenus sont résumés dans la **Tableau S 1**.

## II. Design expérimental

Les deux sexes mâles et femelles ont été utilisés dans les tâches comportementales impliquant le croisement du modèle de surexpression du gène *BIN1* humain avec le modèle de délétion du gène *Bin1* murin TgBIN1 ;*Bin1*<sup>-/-</sup>, ainsi que le modèle tauopathie : *Mapt*<sup>-/-</sup>;TgMAPT ;TgBIN1 nommé « htau;TgBIN1 » et enfin le croisement du modèle de tauopathie avec la diminution d'expression du gène *Bin1* murin *Mapt*<sup>-/-</sup>;TgMAPT ;*Bin1*<sup>+/-</sup> nommé « htau;*Bin1*<sup>+/-</sup> ». Concernant les expériences comportementales, histologiques, cellulaires et moléculaires impliquant uniquement la surexpression du gène *BIN1*, toutes ces expériences ont été réalisées sur des mâles uniquement.

Les expériences comportementales réalisées sur les animaux htau;TgBIN1 ont été effectuées de manière longitudinale tous les trois mois dès l'âge de 3 mois et ce jusqu'à 15 mois. Concernant le test du conditionnement à la peur, il a été observé à partir de 12 mois une impossibilité de discriminer le niveau de locomotion des contrôles après l'administration du choc électrique rendant l'expérience ininterprétable. Ce test étant source de douleur et d'anxiété pour l'animal il a été décidé de le supprimer des tests effectués. Ainsi la cohorte 3 n'a jamais été soumise à ce test. De la même manière, le test en croix surélevées ayant montré une disparité importante de données obtenues, il ne fut pas reconduit pour la cohorte 3. La piscine de Morris n'ayant pas pu être faite à l'âge de trois mois pour la cohorte numéro 1 dû à des problèmes techniques et logistiques, l'âge de départ pour ce test est donc de 6 mois pour tous les animaux.

Lors des expériences comportementales réalisées, après une habitude à la salle d'expérimentation d'au minimum 30 minutes, les femelles furent passées en premier sous-groupes avant un nettoyage approfondis des appareils (excepté pour la piscine de Morris)

pour éviter une interaction due aux odeurs concernant le passage des mâles. Une exception a été faite au sujet du test de champ ouvert et de reconnaissance d'objet pour lequel les femelles ont été passées sur 2 jours consécutifs suivit des mâles les deux jours d'après, ainsi les deux sexes ne se sont jamais « croisés » lors de ces expériences. Les génotypes dans les sous-groupes ont été répartis de manière homogène de façon pseudo-aléatoire et les expériences n'ont pas été réalisées en totale aveugle. Cela signifie qu'un accès au génotype était possible (notamment pour la distribution des génotypes dans un sous-groupe et par la suite pour l'analyse des données) mais que lors du test aucun effort de mémorisation n'a été effectué pour éviter un biais dû à l'expérimentateur. Toutes les expériences ont été menées entre 8h et au maximum 18h.

Les souris ont ensuite été sacrifiées soit par dislocation cervicale pour extraction et dissection du cerveau dans le but de récupérer des extraits d'ARNm et/ou de protéines, soit par mise à mort par injection létale de xylazine 10% et kétamine 5% suivit d'une perfusion intracardiaque de PBS 20 ml suivit de d'un mélange de paraformaldéhyde à 4% et de tampon phosphate salin (PBS).

### III. Tests comportementaux

#### III. 1. Test de l'activité locomotrice (actimétrie)

Afin de déterminer l'activité locomotrice des animaux en fonction de l'heure du jour et de la nuit un test d'actimétrie a été mené sur 36 heures. Cependant, étant donné que les animaux étaient isolés pendant cette période et que les souris htau ont une tendance à l'agressivité, la remise des animaux en milieu social comme au préalable était parfois compliquée car source de violence et de blessures obligeant, généralement, le sacrifice de l'animal. A la vue de la complexité à générer les différents groupes d'animaux nous avons préféré arrêter cette expérience afin de conserver le plus grand nombre d'animaux par la suite. Ainsi seule la cohorte 1 a effectué ce test à l'âge de trois mois.

#### III. 2. Test du champ ouvert

Pour le paradigme de champs ouvert, les animaux ont été placés au centre d'une arène circulaire de 55 cm de diamètre, d'une hauteur de 40 cm avec une paroi opaque blanche. L'arène était située dans une salle éclairée de manière homogène à 50 lux (valeur enregistrée

au centre de l'arène). Les souris, après placement au milieu de l'arène, ont été libres d'explorer l'environnement pendant 30 minutes avant d'être replacés dans leur cage. L'arène fut systématiquement nettoyée entre chaque animal par une solution d'éthanol 50% suivit d'un rinçage à l'eau.

L'activité des souris comprenant notamment la distance parcourue, la vitesse, le temps de mobilité et de présence dans différentes zones de l'arène (centre, zone intermédiaires et périphérie) fut enregistré de manière automatique via le système Ethovision, Noldus, France.

### III. 3. Tests de Mémoire

#### 3. a. Test de la reconnaissance d'objet

Cette tâche a été effectuée dans les mêmes conditions expérimentales (arène, intensité lumineuse, nettoyage de l'arène) que celles décrites pour le champ ouvert. Les objets exposés aux animaux étaient soit des billes opaques de 2,5 cm de diamètre soit des dés en plastiques avec face blanche de 2 cm de côté. Après exposition au champ ouvert le jour 1 les animaux furent replacés dans l'arène le jour 2 en présence de deux objets identiques choisis de manière pseudo-aléatoire. Les animaux ont été placés la tête face à la paroi et à l'opposé des objets. Dès le premier événement d'exploration « *sniffing* » défini par un allongement de la tête en direction des objets dans un cercle de 5 cm de diamètre autour de l'objet exploré, l'acquisition de l'exploration était engagée pour une durée de dix minutes. A la fin de ces dix minutes, le temps passé à explorer les deux objets fut calculé et les animaux ayant explorés moins de 3 sec les objets furent exclus de l'étude et repassés une semaine plus tard. Les animaux ayant présenté une exploration de plus de trois secondes furent de nouveau exposés à l'arène 1h plus tard afin d'effectuer le test de reconnaissance. Durant cette phase un des deux objets familiers fut remplacé par un nouvel objet (dé ou bille) et la place de nouvel objet (gauche ou droite) fut choisie de manière pseudo-aléatoire pour chaque génotype. Les animaux ont été placés de la même manière que précédemment mais le décompte des dix minutes de test fut déclenché dès la présence de l'animal dans l'arène et non pas au premier événement d'exploration. Une exception a été faite à l'âge de 15 mois pour lequel tous les animaux ont eu 15 minutes d'exploration et 15 minutes de test. Les animaux ayant explorés moins de trois secondes les objets durant la phase de test furent définitivement exclus de l'étude à l'âge considéré. L'index de reconnaissance a été calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ reconnaissance} = 100 * \frac{\text{temps passé sur le nouvel objet}}{\text{temps passé sur les deux objets}}$$

### 3. b. Piscine de Morris

La piscine de Morris est une piscine circulaire de 150 cm de diamètre avec une profondeur de 60 cm rempli à 40 cm d'eau maintenue entre 20°C et 22°C et rendue opaque par l'utilisation d'une solution Acusol OP 301. La pièce permettant la visualisation des souris par ordinateur grâce au système Ethovision de Noldus, était physiquement séparée de la pièce où se situait la piscine par un rideau blanc. Les murs de cette dernière salle étaient recouverts d'images, de symboles et de peinture. La surface de la piscine a été virtuellement découpée en quatre quadrants (Sud-Est ; Sud-Ouest ; Nord-Est ; Nord-Ouest). La plateforme, constituée de plastique blanc d'un diamètre de 15 cm, permettant à la souris de s'échapper était placée à 1 cm de profondeur. La phase d'apprentissage d'une durée de 6 jours d'entraînements ou de 5 jours à l'âge de 15 mois (D1 à D6 ou D1 à D5) a été effectuée avec la plateforme immergée et donc non-visible. Chaque souris disposait de quatre essais pas jours espacés de 15 minutes avec des positions de départ aléatoirement distribuées et face contre la paroi. L'expérimentateur prenait soin de ne pas passer à côté de la plateforme sur son chemin de retour. Durant chaque essai, la souris avait un temps maximal de 90 secondes pour localiser la plateforme. Une fois la plateforme atteinte, une attente de dix seconde était nécessaire avant que la souris soit récupérée, à l'aide d'une grille fixée à un manche de 1 mètre, par l'expérimentateur. Dans le cas où la souris ne réussissait pas à localiser la plateforme à l'issue du temps imparti durant les trois premiers jours, l'expérimentateur plaçait cette dernière sur la plateforme avant de sortir de la salle pour une durée de dix seconde avant de venir la récupérer. Lors du jour du rappel (D7 à 6, 9 et 12 mois ; D6 à 15 mois), la souris était placée 24 heures après sa dernière session d'entraînement dans la piscine à l'opposé de la position de la plateforme qui fut retirée pour ce test. Ainsi, si la localisation de la plateforme était Nord-Est durant l'apprentissage, la souris sera lâchée au Sud-Ouest. Les souris disposaient alors de 60 secondes pour nager librement dans la piscine après quoi elles furent récupérées. La position de la plateforme à 6, 9 et 12 mois était au Nord-Est tandis qu'à 15 mois elle fut située au Sud-Ouest. Le temps passé dans chaque quadrant fut calculé. Une fois le test de rappel effectué, les souris furent de nouveau exposées à la piscine 24h après pour effectuer le test de vision et de locomotion. Ainsi la plateforme fut indiquée à l'aide d'un drapeau sur les trois

autres positions non utilisées de la piscine afin de déterminer si les souris étaient en mesure de trouver rapidement l'échappatoire dans un contexte indicé. Après chaque passage dans l'eau et ce quel que soit la phase d'expérimentation, les souris étaient placés dans des cages tapissés de papiers absorbant et sous lampe rouge afin de les sécher le plus efficacement possible.

### III. 4. Test force musculaire

#### 4. a. Rotarod

La coordination motrice a été testée à l'aide du rotarod (BIOSEB, Vitrolles, France). Cet appareil est constitué d'une barre circulaire de 5 cm de diamètre entourée de mousse sur laquelle les souris sont placées et faisant face au sens de rotation. Le test a été effectué sur une journée avec trois essais espacés de 5 min chacun. Chaque essai était constitué d'une phase d'habituation d'une minute à vitesse constante (4 rpm) suivit d'une phase d'accélération allant de 4rpm à 40 rpm en 4 minutes. Le temps à partir duquel chaque souris tombait fut enregistré et la moyenne des trois essais fut calculée.

#### 4. b. Grip test

La quantification de la force musculaire en Newton (N) fût réalisée à l'aide du grip test (BIOSEB, Vitrolles, France). Dans ce test chaque souris fût testée cinq fois, les souris étaient placées les quatre pattes sur la grille et un mouvement de retrait de la souris par la queue fut effectué par l'expérimentateur et la valeur maximale avant que le souris lâche la grille fut enregistrée et une moyenne des cinq essais fut calculée. Les données ont également été divisées par le poids de chaque animal (mN/g).

### III. 5. Conditionnement à la peur

Pour ce paradigme comportemental, les souris ont été placées dans une boîte fermée muni d'un éclairage plafond, d'une ampoule latérale, de parois transparente et d'un plancher constitué de barreaux métalliques. Ces boîtes de conditionnement se trouvaient à leurs tours dans une armoire fermée. Les souris n'étaient sorties de leur pièce d'hébergement qu'au moment de l'expérience pour éviter une confrontation visuelle, sonore ou odorante avec le stress véhiculé par les animaux en cours d'expérimentation. Après 4 min d'habituation à la boîte de conditionnement, un son de 80 décibels en concomitance de l'activation de

l'ampoule latérale était délivré sur une période 3 secondes avec à la fin une décharge électrique de 0,2 mA qui était délivré au niveau du plancher. Afin de s'assurer de la présence du choc électrique, l'expérimentateur a testé lui-même les cages avec sa main lors du choc et à également pu observer la réaction d'immobilisation des animaux durant le paradigme à l'aide d'un juda optique. Les souris, 2 min après ce choc, furent replacées dans leurs cages. Le lendemain deux expériences ont été menées. La première durant la matinée où les souris étaient de nouveau exposées au même contexte que la veille en l'absence du son, de la lumière latérale et du choc électrique pendant 6 minutes. L'après-midi, les souris ont été replacées dans la même boîte mais avec un contexte différent grâce à la présence d'un plancher solide en plastique gris et de parois tentées en noir, puis au bout de 2 min le son en concomitance de la lumière étaient délivrés en l'absence de choc électrique pendant 2 min et cela fut répété une seconde fois pour un total de 8 min d'expérience. Les mouvements de l'animal ont été captés par un détecteur infrarouge et enregistrés sous forme de « bin » toutes les deux secondes. L'activité par tranche de 2 min a alors été calculée et moyennée.

## IV. Etudes Moléculaire

### IV. 1. Extraction de protéines

Les souris ont été sacrifiées à l'âge de 18 mois par dislocation cervicale et le cerveau fut rapidement extrait de la boîte crânienne et placé sur une boîte de Petrie afin d'effectuer une dissection du cortex préfrontal, du striatum, de l'hippocampe, du cortex temporal et du cervelet. Pour certains génotypes une dissection du quadriceps fut réalisée. Les différentes structures furent immédiatement cryogénisées par immersion du tube dans de l'azote liquide et conservé par la suite à -80°C. L'extraction de protéine a été réalisée à l'aide d'un tampon d'extraction (Tris pH 7,5 at 20mM; NaCl 50mM; EGTA 2 mM; Triton X100 1%; NaF 10mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM; β Glycerophosphate 2 mM, Complete EDTA free) et ajusté à pH=7,5. Le système precellys fut utilisé pour broyer et homogénéiser le tissu qui a préalablement été placé dans un tube contenant des billes de céramique. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 30 min à 4°C et à 33 000 g.

Le dosage a été effectué à l'aide du kit « BCA protein assays » (Thermo Scientific) et les échantillons ont été dilués en cascade sur trois niveau et déposés en dupliquât. La gamme étalon permettant une quantification absolue a été réalisée à la BSA et les valeurs ont été

retenues uniquement quand le coefficient de corrélation linéaire de la gamme était supérieur à 0,95.

#### IV. 2. Co-immunoprécipitation

Pour la co-immunoprécipitation (Co-IP), des extraits de cerveaux total de quatre souris WT et de quatre souris *TgBIN1* âgées de 3 mois furent extraits à l'aide d'une solution d'extraction (Tris pH 7,5 at 20mM; NaCl 50mM; EGTA 2 mM; Triton X100 1%; NaF 10mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM; β Glycerophosphate 2 mM, Complete EDTA free) ajustée à pH=7,5 et maintenue à 4°C. Le système precellys fut utilisé pour broyer et homogénéiser le tissu qui a préalablement été placé dans un tube contenant des billes de céramique. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 25 min à 4°C et à 33 000 g.

Le dosage a été effectué à l'aide du kit « *BCA protein assays* » (Thermo Scientific) et les échantillons ont été dilués en cascade sur trois niveaux et déposés en dupliquant. La gamme étalon permettant une quantification absolue a été réalisée à la BSA et les valeurs ont été retenues uniquement quand le coefficient de corrélation linéaire de la gamme était supérieur à 0,95.

Les billes, couplées soit à la protéine A pour cibler les anticorps provenant de lapin soit couplées à la protéine G pour cibler les anticorps provenant de souris, utilisées pour l'IP ont préalablement été lavées avec le tampon d'extraction. Le tissu, 1mg de protéines, fut quant à lui lavé avec 100µl de billes (80% « slurry ») pendant 1h à 4°C puis les billes furent jetées. L'anticorps primaire (**Tableau S 2**), fut ajouté et l'ensemble extrait protéique-anticorps fut incubé 1h à 4°C en agitation par inversement. Les billes préalablement lavées ont ensuite été ajoutées à hauteur de 100µl par extrait et le tout fut incubé la nuit à 4°C en agitation par inversement. Le lendemain, les produits de Co-IP ont été nettoyés trois fois avec le tampon d'extraction. Comme contrôle interne à cette expérience nous avons conduit la même expérimentation soit en ne plaçant pas d'anticorps (billes seules) soit en plaçant des anticorps de la même espèce que celui utilisé pour immunoprécipiter la protéine d'intérêt mais venant d'un animal non immunisé (billes + IgG).

Pour l'immunoprécipitation des interacteurs de BIN1 nous avons utilisé un mélange des extraits obtenus des quatre animaux WT et un mélange des quatre animaux *TgBIN1* et nous avons conduit les expériences de la même manière que décrite précédemment.

#### IV. 3. Silver staining

Afin de déterminer le profil protéique résultant des Co-IP réalisées, nous avons mené une coloration argentique (résultats non présentés) permettant de visualiser les protéines avec une plus grande sensibilité que la technique du Coomassie utilisée par la suite pour la découpe des bandes avant spectrométrie. Pour cette coloration argentique, les extraits de Co-IP ont été migrés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) sur la longueur totale du gel. Le gel après migration a été fixé (40% éthanol, 10% d'acide acétique et 50% d'eau ultra pure) pendant 20 min à température ambiante. Après lavage du gel dans une solution d'éthanol 30% pendant 10 minutes le gel a été incubé dans une solution de sensibilisation (éthanol 30%, sensitizer 10%, pendant 10 min et rincé à l'éthanol 30% pendant 10 min puis à l'eau ultra pure pendant 10 minutes. Les gels ont par la suite été incubés dans une solution de coloration (1% stainer, eau ultra pure) puis lavé 30 sec à l'eau ultra pure. Enfin le développement du gel a été réalisé à l'aide d'une solution (10% developer, 1 goutte enhancer, eau ultra pure) et la durée a été déterminer par l'expérimentateur (dans notre cas 5 min et 30 seconde pour un temps pouvant varier de 4 à 8 minutes). La réaction a été stoppée par ajout d'une solution « stopper » et lavée à l'eau ultra pure avant d'être envoyée à la plateforme de spectrométrie.

#### IV. 4. Spectrométrie de masse et analyse

Les échantillons issus de la Co-IP de BIN1 dans les quatre cerveaux WT et TgBIN1 ont été utilisés pour être migrés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS). La migration a été arrêté 1 cm après être rentré dans le gel de migration. Les gels ont ensuite été coloré par la méthode de Coomassie, ceux-ci ont été fixés (10% acide acétique, 20% éthanol, 70% H<sub>2</sub>O) durant la nuit à température ambiante. Les gels ont ensuite été immergés dans la solution de Coomassie pendant 1h à température ambiante suivit de trois rinçage (10% acide acétique, 20% éthanol, 70% H<sub>2</sub>O). Les différentes bandes ainsi obtenues ont ensuite été traitées par la plateforme de spectrométrie par digestion à la trypsine/chimotrypsine puis couplées nanoLC en gradient long sur trappe ionique pour identification en MS/MS. Le premier traitement des données, effectué par la plateforme, a utilisé le logiciel Proteom Discover 1.4 (Sequest HT / Percolator) et s'est servie de



la base de données : Reference Proteome Mouse (release 2016\_07, 49153 entries) dans laquelle la séquence humaine de BIN1 a été rajoutée.

L'analyse des données a ensuite été faite de manière semi-automatique en retirant les protéines contaminantes (IgG et kératine). Nous avons décidé d'appliquer les paramètres suivant : pour chaque animal correspond une colonne 1, 2 et 3 représentant respectivement l'ensemble des protéines obtenues dans les conditions billes seule, billes + IgG et billes +  $\alpha$ -BIN1. A chaque protéine de chaque animale et pour chacune des conditions correspond une valeur quantitative du « score » PSM obtenu. Nous avons calculé le ration R d'une même protéine  $\alpha$  par division des PSM obtenus pour cette protéine entre la condition 3 (billes +  $\alpha$ -BIN1) à la condition 1 (billes seules), puis nous avons fait la même opération entre la condition 3 et la condition 2.

$$R(\text{billes seules}) = \frac{PSM \text{ billes seules}}{PSM \text{ billes} + \alpha\text{-BIN1}}$$

$$R(IgG) = \frac{PSM \text{ billes} + IgG}{PSM \text{ billes} + \alpha\text{-BIN1}}$$

Nous avons ensuite scoré ( $Sc$ ) la spécificité des protéines obtenues dans la condition positive (billes +  $\alpha$ -BIN1) par calcul logique d'exclusion où seules les protéines ayant un R supérieur à 1,5 (valeur choisie de manière arbitraire) ont été retenues.

$$\text{Si et seulement si } R(\text{billes seules}) > 1,5 \text{ ET } R(IgG) > 1,5 \equiv Sc = 1$$

Nous avons par la suite cherché le nombre d'occurrence ( $Oc$ ) des protéines ( $\alpha, \beta, \dots$ ) avec un score  $Sc=1$  chez les 4 animaux d'un même génotype et nous avons retenu les protéines ayant au minimum 3 occurrences ( $Oc=3$ ) pour un même génotype. Nous avons également effectué la même recherche pour l'ensemble des huit animaux avec un coefficient d'occurrence d'au minimum 7 ( $Oc=7$ ). Les résultats présentés n'ont pas vocation à constituer un interactome intégral mais de permettre la constitution d'une liste d'interacteurs à fort potentiel d'interaction pour être tester durant le processus de validation.

#### IV. 5. [Western Blot](#)

Dix à vingt microgrammes d'extraits protéiques ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) et transférés sur membrane de nitrocellulose. En fonction de la protéine ciblée (forme phosphorylée ou non) une saturation de la membrane a été effectuée avec de la BSA 5%, TTBS ou du lait 5 %, TTBS pendant 45 minutes à température ambiante et sous agitation. L'anticorps primaire (**Tableau S 2**) fut incubé une nuit en agitation à 4°C suivit le lendemain par 5 lavages de trois minutes au TTBS sous agitation. L'anticorps secondaire fut incubé 1h à température ambiante et sous agitation. La révélation effectuée par le kit ECL *chemiluminescence system* (SuperSignal™ ThermScientific) a été précédée par 4 lavages de trois minutes au TTBS sous agitation puis un dernier lavage à l'eau distillée. La chemi-luminescence a été photographiée avec le système Amersham™ Imager et les images TIF ont été quantifiées à l'aide d'image J. La quantification relative a été obtenue par le rapport du signal entre la protéine d'intérêt (GAPDH) révélée pour chaque membrane et faisant office de protéine de charge.

Concernant le niveau de phosphorylation, la même membrane a été utilisée afin de révéler d'une part la protéine sous sa forme phosphorylée, la protéine de charge (GAPDH), et d'autre part la protéine sous sa forme totale.

### V. Etudes cellulaires

#### V. 1. [Immunofluorescence](#)

Les souris ont été anesthésiées à l'âge de 18 mois avec un mélange de Kétamine 5% et Xyalzine 10% puis perfusées par implantation d'une aiguille dans le ventricule gauche du cœur et avec sectionnement de l'oreillette droite afin d'obtenir un circuit ouvert. La perfusion était composée dans un premier temps par une solution de tampon PBS (20 ml) afin de rincer le circuit sanguin et d'éviter la formation de caillots suivit d'une solution de PFA 4%, PBS 1X afin de fixer l'ensemble des organes. Le cerveau a ensuite été extrait et immergé dans une nouvelle solution de PFA 4%, PBS 1X durant la nuit à 4°C. Le lendemain les cerveaux ont été rincés sous hotte chimique avec 5 rinçages au PBS 1X étalés dans la matinée. Les cerveaux ont ensuite été placés dans une solution de sucrose 30%, PBS 1X et placés à 4°C pendant 2 à 3 jours jusqu'à ce que le cerveau atteigne le fond du tube. S'en est suivit une étape de cryogénéisation où les

cerveaux ont été placés dans un moule rempli d'un cryoprotecteur (O.C.T. Tissu Compound, Tissue Plus®, Scigen) et placés sur boîte de Pétrie elle-même placée dans un conteneur rempli d'azote liquide afin d'obtenir un refroidissement rapide avant d'être stocké dans de la glace carbonique pour finalement être conservé à -80°C. Par la suite les cerveaux ont été découpés de manière coronale au cryostat avec une épaisseur de 10µm. Pour l'immunofluorescence, les coupes ont premièrement été perméabilisées à l'aide d'une solution de saturation composée de PBS 1X, Triton 0,1%, sérum de cheval 10% et BSA 5% pendant 30 minutes à température ambiante. L'incubation de l'anticorps primaire (**Tableau S 2**), dilué dans la même solution de saturation, a été effectuée sur la nuit à 4°C sans agitation dans une chambre humide. Le lendemain après 5 rinçages de trois minutes au PBS 1X, Triton 0,1%, l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome, dilué dans du PBS 1X, Triton 0,1% a été appliqué 1h à température ambiante suivit de 5 minutes d'une solution de PBS 1X, Triton 0,1%, Hoechst 1/1000. Après 5 rinçages de trois minutes au PBS 1X, Triton 0,1%, les lamelles ont été montées sur lames et scellées par utilisation du Fluorsave. Les lames ont par la suite été imagées à l'aide du *nanozoomer slices scanner* (Hamamatsu Photonics) en prenant soin de laisser le temps à la lampe à émission de fluorescence de se stabiliser.

Pour chaque marqueur utilisé, un contrôle négatif en présence de l'anticorps secondaire uniquement a été réalisé sur l'ensemble des animaux. Ceci afin de valider la spécificité des anticorps et pour s'assurer qu'une variabilité de traitement des cerveaux (mauvaise fixation par exemple) ne puisse pas être à l'origine d'un phénotype observé.

### V. 2. Microscopie électronique

Les souris ont été mises à mort à l'âge de 18 mois de la même manière que précédemment cité pour l'immunofluorescence avec perfusion intracardiaque de PFA 4%, PBS 1X. Après extraction, les cerveaux ont été immergés dans une solution composée à 4% de PFA et 4% de glutaraldéhyde, PBS 1X durant la nuit à 4°C. Des sections coronales de 200µm ont été obtenues avec un vibratome et les coupes ont été sectionnées de façon à récupérer une partie de l'hippocampe avec le fornix et une partie du cortex temporal comprenant le cortex périrhinal. Les tissus ont ensuite été traités par la plateforme de microscopie électronique de l'IGBMC comme suit, post-fixation dans 1% osmium tetroxyde suivit de déshydrations successives et à gradient d'éthanol (50, 70, 90 et 100%). Les sections, avant inclusion dans de l'Epon 812, ont été traitées pendant 30 minutes dans de l'oxyde de propylène. Les sections

semi fines de 2µm obtenu avec un ultra-microtome (Leica Ultracut UCT) et les ultrafines de 70nm, coupées elles par la plateforme, ont été contrastées à l'acétate d'uranyle et observées par l'expérimentateur en aveugle à l'aide d'un microscope électronique Morgagni 268D de 70 kv. Les images ont été acquises par la caméra Méga View II (Soft Imaging System).

### V. 3. Reconstruction de l'arbre dendritique

#### 3. a. Coloration de Golgi

Quatre souris WT et quatre souris *TgBIN1* âgées de 3 mois ont été sacrifiées par dislocation cervicale et leurs cerveaux ont rapidement été transférés dans une solution de Golgi-Cox (5% de chromate de potassium, 5% de dichromate de potassium et 5% de chlorure de mercure) préalablement filtrée. Les cerveaux ont été stockés à l'obscurité et la solution de Golgi-Cox a été renouvelée après deux jours et les cerveaux ont été laissés pendant au minimum deux semaines dans cette nouvelle solution. Les cerveaux ont par la suite été déshydratés au sucrose 30%, PBS 1X pendant au minimum deux jours. Ils ont ensuite été découpés au vibratome avec une épaisseur de 250 µm et les sections de l'hippocampe dorsal ont été récupérées. L'étape de révélation de chacune des tranches s'est déroulée de la manière suivante :

- Eau distillé (1 minute)
- Hydroxyde d'ammonium (30 minutes à l'obscurité)
- Eau distillé (1 minute)
- Solution de révélation photographique Kodak Fix (30 minutes à l'obscurité)
- Eau distillé (1 minute)
- Alcool 50% 1 minute
- Alcool 70% 1 minute
- Alcool 95% 1 minute
- Trois bains d'alcool 100% de cinq minutes chacun
- Solution CXA (1/3 de Chloroforme, 1/3 de Xylène et 1/3 d'alcool 100%) (30 minutes à l'obscurité)

### 3. b. Analyse de Sholl

Les lames ont ensuite été montées avec une solution de Pertex et imagées à l'aide d'un microscope confocal Leica SP5 pour une acquisition des cellules granulaires du gyrus denté. Des piles d'images ont été générées en utilisant le mode de réflexion (70% de lumière captée venant de la réflexion des neurones marqués) et une longueur d'onde de 488 nm. Ces images ont permis grâce à l'outil « simple neurite tracer » de Fiji d'effectuer des reconstructions semi-automatique en trois dimensions des arbres dendritiques. Les neurones sélectionnés devaient présenter un arbre dendritique intégral (pas de perte de signal en profondeur ou coupé au niveau de la surface). Ces arbres reconstruits ont été analysés grâce au plugin *simple neurite tracer* permettant une analyse de Sholl en trois dimensions. Brièvement, des sphères virtuelles concentriques (centre du soma) avec un rayon croissant sont générées et le nombre de dendrites pouvant intercepter chaque sphère est comptabilisé. Nous pouvons également connaître le rayon maximal de ces sphères avant la fin de l'arbre dendritique.

## V. 4. Etudes interactions In vitro

### 4. a. Culture de neurones primaires hippocampiques

Après dislocation cervicale de la femelles porteuse, l'abdomen de la femelle a été ouvert afin d'en extraire les sacs embryonnaires au stade E18.5. Les embryons ont été placés dans une boîte de Pétri sur glace contenant un milieu stérile d'hibernate-A (Thermo Fisher Scientific) puis ont été disséqués séparément dans le même milieu sous loupe binoculaire afin de prélever les queues pour génotypage et d'en extraire l'hippocampe qui fut lui aussi placé dans le milieu d'hibernate-A. Les hippocampes ont ensuite été placés dans un milieu de dissociation enzymatique (Hibernat-A, Trypsine et DNase) pour être incubé à 37°C avec inversement réguliers. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 5 min à 16 000g, le surnageant a été remplacé par un milieu de dissociation mécanique (Hibernat-A, DNase) pour être dissocié à l'aide d'une P 1000 en réalisant 30 aller-retour. La solution obtenue a ensuite été filtrée sur stericup (20µm) puis centrifugée à 1500g pendant 10 min. Le surnageant a ensuite été remplacé par du milieu neurobasal (Neurobasal medium, L-Glutamine, B27, Pénicilline, Streptomycine). Entre 50 000 et 70 000 cellules ont été déposés par puit dans une plaque 24 puits contenant une lamelle en verre préalablement « coaté » avec de la L-poly-lysine. Les cellules ont été laissées en phase de croissance avec changement de milieu si nécessaire

pendant 4 jours (DIV4) dans un incubateur maintenu à 37°C et 5% de dioxyde de carbone. Après la phase de croissance les cellules ont été lavées de leur milieu de culture au PBS 1X puis fixé avec du PFA 4%, PBS 1X pendant 15 minutes sous hotte. Trois rinçages successifs au PBS 1X sous hotte ont été réalisés avant d'être maintenu dans de l'éthanol à 70% pendant au maximum 2 semaines.

### 4. b. Proximity Ligation Assay

Les neurones préalablement mis en culture ont été incubés avec un milieu de saturation composé de PBS 1X, Triton 0,1%, sérum de cheval 10% et BSA 5% pendant 30 min à température ambiante. L'anticorps primaire (**Tableau S 2**) utilisé a été incubé 1 heure à température ambiante puis lavé par trois rinçages de cinq minutes de PBS 1X, Triton 0,1%. Les sondes PLA ont ensuite été ajoutées dans le milieu de saturation pendant 1 heure à 37°C. Après des lavages comme précédemment décrits, la ligase et son tampon ont été incubés pendant 30 min à 37°C. De la même manière, après lavage, l'enzyme polymérase permettant l'amplification et son tampon permettant la fixation des fluorophores (fluorescent dans le rouge) ont été ajoutés pendant 100 min à 37°C. S'en est suivie une immunocytochimie classique permettant la visualisation de la tubuline à l'aide d'un anticorps secondaire fluorescent dans le vert et d'une incubation au Hoechst au 1/1000<sup>ème</sup>. Enfin le tout fut monté dans une solution Duo-link *In situ* Mounting avec une lamelle de verre scellée au vernis. Les images ont par la suite été acquises à l'aide d'un microscope confocal Leica SP5. Ces expériences de PLA ont été reproduites sur trois animaux WT et trois animaux *Bin1*<sup>-/-</sup> tous issus de trois portés différentes.

### 4. c. Transfection cellulaire

#### *c. i. Amplification des plasmides pour transfection cellulaire*

Afin d'amplifier les plasmides utilisés pour les transfections de cellules COS-1, des bactéries compétentes à la transformation DH5α étaient décongelées sur glace pendant 15 minutes avant qu'un microgramme du plasmide d'intérêt soit ajouté en condition stérile (utilisation d'un bac benzène). L'ensemble était laissé sur glace pendant 15 min avec quelques tapotements du tube pour homogénéisation. Puis, les tubes furent soumis à un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes suivit de 5 min sur glace, le tout sans agitation. 120 µl de milieu LB furent ajoutés avant incubation sous agitation à 37°C. Après une heure, 30µl ou

90µl de solution étaient déposés sur des boîtes de Pétrie présentant un antibiotique relatif au plasmide à amplifier et celles-ci furent placées en incubation à 37°C durant la nuit. Le lendemain, une colonie isolée était déposée dans un tube contenant 2ml de LB et l'antibiotique d'intérêt pour être laissé sous agitation à 37°C pendant la journée. Le soir l'ensemble était versé dans un Erlenmeyer de 500 ml, contenant 200 ml de LB et 2µl d'antibiotique avant d'être incubé sous agitation à 37°C. Enfin le lendemain une purification des plasmides était réalisée à l'aide du kit midi-prep kit DNA/RNA Nucleospin Pasmid (Thermo Fisher Scientific).

#### *c. ii. Culture de COS et transfection cellulaire*

Les cellules COS-1 ont été commandées auprès du service culture de l'IGBMC. Celles-ci étaient stockées dans des flasques de culture 75 cm<sup>2</sup> pour croissance avant d'être mise en culture dans des boîtes 6 puits. Pour ce faire, la flasque était rincée au PBS stérile avant d'être incubé 5 min à 37°C en présence de trypsine diluée. L'ensemble était récupéré dans un Falcon 15 ml et centrifugé 3 min à 250g, après remplacement du surnageant par le milieu de culture (DMEM, Glucose 1g/l, 5% FCS 202, Gentamycine). Après homogénéisation, l'ensemble était déposé dans des boîtes 6 puits présentant une lamelle en verre. Après 24 heures d'incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) les cultures étaient transfectées à la lipofectamine 3000. Avant incubation de la solution de transfection pour une durée de 24h, un mix était de deux solution A (5µl P3000 reagent, 5µl ADN [500 ng/µl], 115 µl optiMEM) et B (4 µl Lipo 3000, 121 µl optiMEM) était préparé et incubé 15 minutes à température ambiante. 24 heures après transfection, les cellules furent fixées de la même manière que décrite pour les cultures de neurones hippocampiques.

#### 4. d. Culture de MEF

Après dislocation cervicale de la femelles porteuse à E18,5, l'abdomen de la femelle a été ouvert afin d'en extraire les sacs embryonnaires. Ceux-ci ont été placés dans une boîte de Pétri sur glace contenant du PBS 1X stérile. Après décapitation de l'embryon et récupération d'une partie de la tête pour génotypage, les organes internes étaient vidés pour ne garder essentiellement que la peau de l'animal. Cette « peau » était ensuite dissociée mécaniquement à l'aide d'une seringue avant d'être placée dans un milieu contenant du DMEM, Glutamax-I, Pénicilline et Streptomycine et déposée dans une flasque de culture.

Lorsque les cellules arrivaient à 80% de confluence, les flasques étaient lavées au PBS 1X avant d'être incubées à 37°C en présence de Trypsine 0,25% EDTA Free pendant 4 minutes. L'ensemble était alors centrifugé 5 min à 670g, le surnageant était remplacé par du nouveau milieu de culture et cette solution a étéensemencé dans des boîtes de culture 6 puits avec lamelles en verre jusqu'à confluence de 60-70%. Le protocole de fixation est le même que celui précédemment décrit (**CCulture de neurones primaires hippocampiques**) et des immunocytochimies classiques étaient alors réalisées.

### V. 5. Extraction des ARNm et transcription inverse

L'extraction des ARNm a été réalisée à partir d'un hippocampe de femelle *Bin1<sup>-/-</sup>*;Tg*BIN1* et réalisée à l'aide du kit d'extraction « kit acid nucleic QUIAGEN ». Après lecture de DO des acides nucléiques obtenus, une réaction de transcription inverse a été opérée. Un mix sur glace contenant 1µg d'ARNm a été mélangé et incubé 10 min à 25°C puis 30 min à 50°C puis 5 min à 85°C avant d'être remis sur glace pour enfin être incubé 20 min à 37°C en présence d'E.Coli RNase H. Une réaction de PCR comprenant des amorces ciblant les exons 1 et 20 de *BIN1* humain **Tableau S 3** a été réalisée et son produit utilisé par la suite pour un clonage.

### V. 6. Clonage et séquençage

Les produits de PCR préalablement obtenus ont été utilisés pour être clonés et séquencés. La ligation a été effectuée dans un vecteur pGEM avec ligase T4. Après 1h d'incubation une transformation à l'aide bactérie compétente DH5α a été réalisée comme décrite précédemment (**Amplification des plasmides pour transfection cellulaire**). Les boîtes de Pétri LB/Ampicilline résistantes ont préalablement été traitées au X-Gal et à l'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside avant étalement des bactéries. Après une incubation à 37°C sur la nuit, seules les colonies blanches ont été sélectionnées pour être déposées sur une nouvelle boîte de Pétri traité de la même manière que précédemment. Le lendemain, une réaction de PCR a été effectuée afin d'amplifier *BIN1* humain en utilisant des amorces exon 1 et exon 20 **Tableau S 3** pour ensuite être envoyé à séquencer par l'entreprise GATC.



## VI. Production et validation d'anticorps anti BIN1

Des anticorps polyclonaux issus de lapins ont été réalisés afin de cibler soit l'exon 7 ou 16 des domaines CLAP de BIN1 spécifiques des isoformes cérébrales. Pour ce faire, la plateforme « synthèse de peptide » dirigée par Pascal EBERLING a synthétisé les peptides suivants :

1- C-K-L-Q-A-H-L-V-A-Q-T-N-L-L-R-N-Q, position 190 à 205, exon 7 (isoforme cérébrales), domaine BAR.

2- W-P-S-Q-T-A-E-P-C, position 461 à 468, exon 16 (isoformes cérébrales), domaine CLAP

Les peptides ont ensuite été couplés à la Keyhole limpet hemocyanin avant d'être injectés dans deux lapins pour chaque peptide soit un total de quatre lapins utilisés. Après un mois, une nouvelle injection est réalisée et le sang est récupéré deux semaines après. Les anticorps sont extraits à partir du sérum et purifiés sur colonne (Pierce). Brièvement, de la résine sulfolink a été ajoutée à la colonne puis 15 ml de sérum de lapin ont été incubés dans cette même colonne. Après 45 min en agitation par inversement, la colonne fut drainée par un tampon acide (50 tris-HCl, 5 mM EDTA) ajusté à un pH de 8,5. Différentes fractions d'élution ont été récupérées et dialysées sur la nuit avec une membrane à dialyse et un tampon PBS 1X.

## VII. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 7. Lorsque les data appartenant aux différents groupes testés respectaient une loi normale (effectué à l'aide du test de Shapiro-Wilk) et présentaient des variances homogènes (effectué à l'aide du test de Bartlett) alors des tests paramétriques étaient utilisés. Ceux-ci comprenaient le test t de Student, l'ANOVA à un facteur suivie d'une analyse *post-hoc* de Bonferroni ou à deux facteurs suivie d'une analyse *post-hoc* de Tukey ou le « one-sample t-test ». Lorsque les data ne respectaient pas l'une des deux conditions préalablement citées, des tests non paramétriques étaient utilisées. Ceux-ci comprenaient le test de Mann-Whitney et le test de Kruskal-Wallis suivit d'une analyse *post-hoc* de de comparaison multiple avec le test de Dunn.

# Résultats

---

Les résultats obtenus tout au long du doctorat ont été dispersés dans plusieurs articles [Daudin et al., en cours de soumission](#) ou [Sartori, Mendes, Desai et al., en cours de soumission](#). Tous les deux sont disponibles en Annexe. De plus, [Daudin et al.](#), a été également déposé sur BioArXiv. Dans un souci de clarté, l'ensemble de mes données ainsi que celles des équipes d'accueil sont décrites dans la partie résultat. De plus, les figures et tableaux supplémentaires appelés Figure S et Tableau S respectivement, sont accessibles **en Annexe, partie I. Figures supplémentaires, p. 175 et II. Tableaux supplémentaires, p. 181**. La discussion permettra quant à elle d'exposer de manière intégrée l'ensemble des constatations effectuées et de proposer de nouvelles stratégies de recherche pour le futur.

## I. Etude du modèle de surexpression du gène humain *BIN1*

Afin de déterminer les effets *in vivo* chez la souris d'une surexpression du gène *BIN1*, un modèle de surexpression de ce gène humain chez la souris a été créé. Ce modèle *TgBIN1* a été validé par des méthodes en partie décrites dans ce manuscrit et a fait l'objet d'études comportementales, histologiques, cellulaires et moléculaires.

### I. 1. [Validation génétique et moléculaire du modèle](#)

#### 1. a. Séquençage

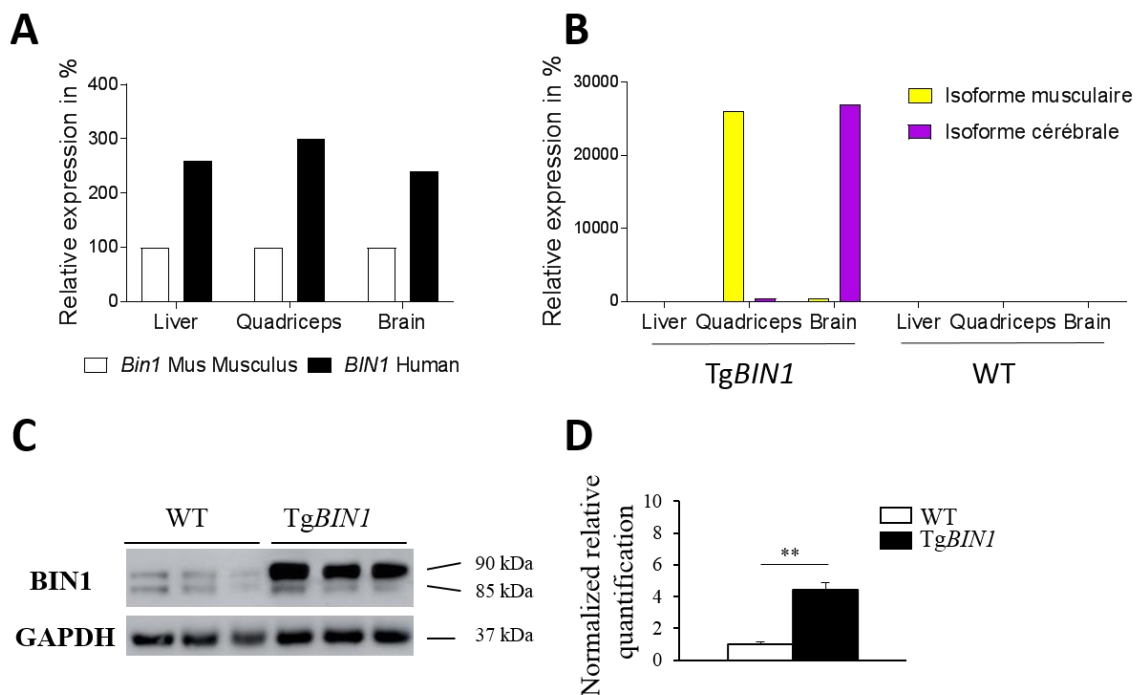
Dans un premier temps, nous avons réalisé le séquençage de tous les exons du clone utilisé pour le modèle murin *TgBIN1*. Ceci nous a permis de valider la présence de l'intégralité des exons (**Figure S 1**) sans apparition de mutation ponctuelle.

Dans un second temps, nous avons investigué la présence de polymorphismes dans la région promotrice du gène humain utilisé. Les séquençages n'ont révélé aucun polymorphisme corrélé à la surexpression de *BIN1* (rs59335482), à la progression de la maladie d'Alzheimer et au déclin cognitif (rs744373) ou à l'amincissement du cortex entorhinal et temporal (rs7561528 ; **Figure S 2**)

1. b. Choix de la lignée utilisée

Afin d'induire une surexpression du gène *BIN1* humain chez la souris, un transfert de matériel génétique grâce à la technologie de recombinaison par chromosome bactérien artificiel a été mise en place par l'iCS. L'intégration du matériel génétique s'est faite dans un bras chromosomique non identifié. Cette procédure expérimentale a été réalisée avant l'entrée en doctorat sous la supervision du Dr. Marie-Christine Birling.

Parmi l'ensemble des différentes lignées de souris générées (**Figure 13A**), notre choix s'est porté sur la lignée U154.16.16 présentant la plus forte expression d'ARNm quantifiée par PCR quantitative. En effet l'expression relative des ARNm montre une expression du gène humain 2,5 fois plus importante que celle du gène murin au niveau du foie. De la même manière, le gène humain a été surexprimé près de 2,5 et 3 fois dans le cerveau et le quadriceps respectivement. L'ensemble de ces quantifications a été réalisé par le service de validation des modèles de l'iCS.



**Figure 13 : Récapitulatif de la lignée de souris dans laquelle une insertion du gène *BIN1* humain a été réalisée.**

Cette lignée présente une surexpression en ARNm (quantifiée par qPCR) du gène *BIN1* humain par rapport à l'expression endogène du gène murin dans le foie, le quadriceps et le cerveau (A). L'expression en ARNm du gène *BIN1* humain après épissage dans les tissus murins révèle une expression de l'isoforme musculaire (violet) uniquement dans le muscle et une expression de l'isoforme neuronale (jaune) uniquement dans le cerveau (B). Les amorces ayant permis l'amplification en qPCR sont représentées par des flèches bleues dans la représentation des protéines produites. Le niveau d'expression de BIN1 a été révélé après migration sur gel

d'extraits d'hippocampe de souris WT et TgBIN1 âgées de 3 mois (C). La densité optique mesurée a été normalisée et moyennée  $\pm$  SEM avec le niveau de la GAPDH. L'analyse statistique s'est faite avec un t-test de test Mann-Whitney (D). \*\* p-valeur < 0,01. Ces données sont présentées dans l'article de [Daudin et al., en cours de soumission](#)

### 1. c. Validation de l'expression

Le service de validation l'ICS a également permis de mettre en évidence par PCR quantitative l'expression du gène humain *BIN1* de manière tissu spécifique. Ainsi, l'isoforme musculaire présentant une inclusion de l'exon 11 n'a été retrouvée que dans le quadriceps alors que la présence du domaine CLAP spécifique des isoforme cérébrales a quant à elle été retrouvée uniquement dans le cerveau (**Figure 13B**).

De plus, le Dr. Damien Maréchal a confirmé la surexpression protéique de l'isoforme neuronale de BIN1 en réalisant des expériences de WB à partir d'extraits d'hippocampe de souris, âgées de 3 mois (**Figure 13C-D**). Il est intéressant de noter que sur le duo de bandes d'environ 100 kDa, correspondant au profil BIN1-H, pour dont une seule est surexprimée. Nous ne connaissons pas, à ce jour, l'identité des différents profils protéiques observés. Ces mêmes WB indiquaient l'absence d'une modification d'expression au niveau du profil ubiquitaire BIN1-L (données non présentées).

## I. 2. Validation physiologique et comportementale du modèle

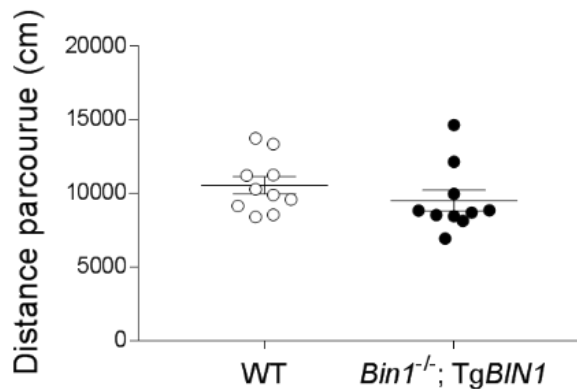
### 2. a. Sauvetage du modèle *Bin1*<sup>-/-</sup>

Un modèle murin de délétion constitutive du gène *Bin1* ([Cowling et al. 2017](#)) a été utilisé afin de déterminer si la surexpression du gène *BIN1* humain pouvait combler la perte de fonction du gène murin. Des croisements, sur fond mixte C57BL6/J et 129PAS, de souris *Bin1*<sup>+/-</sup> et *Bin1*<sup>+/-</sup>;TgBIN1 ont permis la génération d'animaux sauvage (WT) et *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1. Ce croisement a permis de mettre en évidence que ce modèle de délétion homozygote de *Bin1* entraînait une létalité périnatale que cela soit sur fond pur C57BL6/J ([Muller et al. 2003](#)) ou sur fond mixte car aucun animal *Bin1*<sup>-/-</sup> n'a été identifié après génotypage. Il apparaît également que la surexpression du gène *BIN1* humain est en mesure de restaurer la perte de fonction du gène murin et de prévenir la létalité périnatale. Ainsi, une cohorte de dix animaux WT et de dix animaux *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1 a été générée (cinq mâles et cinq femelles dans chaque groupe).

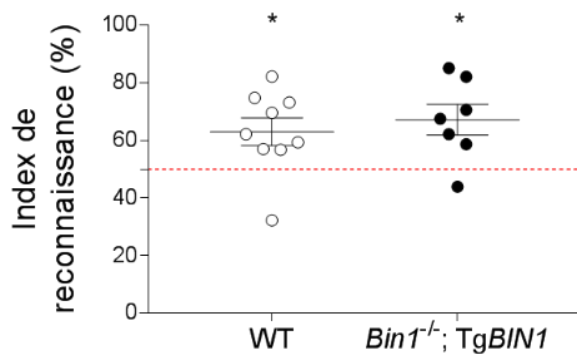
Cette cohorte a été étudiée sur un plan comportemental avant d'être sacrifiée à l'âge de 4 mois pour différentes expériences *in vivo* et *post-mortem*. L'analyse de l'ensemble des résultats comportementaux a été réalisée sans distinction de sexe.

*a. i. Test du champ ouvert*

Le test du champ ouvert a été réalisé à l'âge de 3 mois sur l'ensemble des animaux WT et *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1. Ce test a révélé une activité locomotrice des animaux *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1 similaire à celle des animaux WT (**Figure 14**). Ce test de champ ouvert a également permis d'habituer les animaux à ce nouvel environnement. En effet, cette même arène a été réutilisée pour réaliser un test de mémoire à court terme par reconnaissance d'objet.



**Figure 14 : Distance parcourue (en cm) par les souris *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1 âgées de 3 mois durant trente minutes.** Les moyennes des distances des animaux WT et *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1 sont représentées ± SEM. Les données ont été analysées avec le test t de Student car elles suivent une loi normale selon le test Shapiro-Wilk. Seuil  $\alpha=0,05$



**Figure 15 : Index de reconnaissance après une heure de rétention chez les souris *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1 âgées de 3 mois.** Les moyennes des index de reconnaissance sont représentées ± SEM. La ligne rouge discontinue représente un index de 50% pour lequel aucune préférence ne peut être visualisée. Les données qui suivent une loi normale selon le test Shapiro-Wilk ont été analysées avec le «one-simple t-test» avec une valeur théorique de 50%. \* p-valeur < 0,05.

*a. ii. Test de reconnaissance d'objet*

Le test de reconnaissance d'objet avec une heure de rétention permet de rendre compte de la capacité des animaux à effectuer un rappel sur le court terme. Ce test, réalisé 24 heures après le test du champ ouvert, met en évidence une capacité similaire des animaux WT et *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1 à discriminer le nouvel objet de l'objet familier (**Figure 15**). En effet lors de la

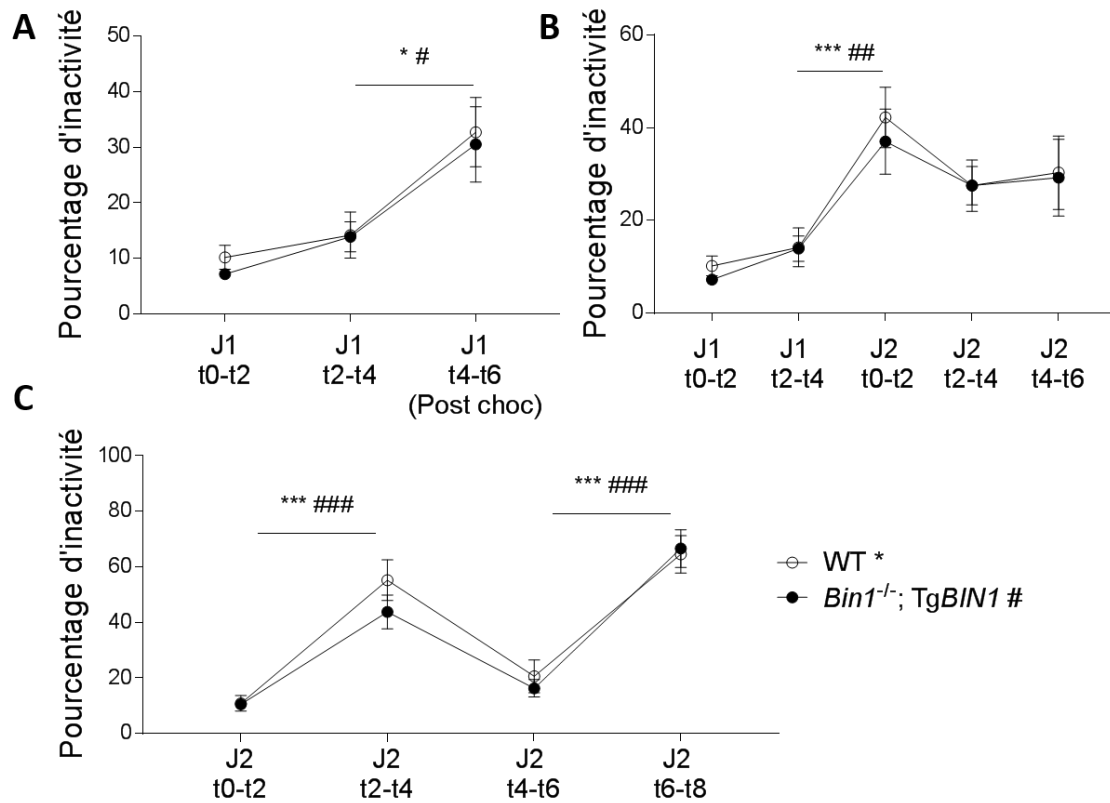
phase de rappel, les deux groupes expérimentaux sont en mesure de passer un temps supérieur au hasard sur le nouvel objet, mettant ainsi en évidence un processus de mémorisation de l'objet familier.

*a. iii. Test du conditionnement à la peur*

Le dernier test comportemental effectué avant le sacrifice a été le test du conditionnement à la peur ou test de conditionnement Pavlovien. Durant la phase d'habituation à la boîte de conditionnement, d'une durée de 4 minutes, nous observons que l'inactivité des animaux WT et *Bin1<sup>-/-</sup>;TgBIN1* oscille entre 7 et 12 %. Après administration du choc électrique concomitant à la présentation d'un son et de la lumière latérale, l'inactivité de l'ensemble des animaux passe alors de 12 à 30 % environ (**Figure 16A**). Ce résultat nous indique que les animaux sont bien sensibles au stress induit par le choc électrique et nous permet de passer le lendemain aux phases de rappels contextuels et indicés.

Dans un premier temps, la phase de rappel contextuel consiste à exposer les souris au même environnement appréhendé durant le conditionnement mais sans les indices sonores et lumineux. La courbe représente à la fois l'habituation de la veille sur les quatre premières minutes (J1 t0-t4) et le rappel sur les six minutes suivantes (J2 t0-t6). Nous observons que les animaux présentent une augmentation significative de leur inactivité, oscillant entre 30 et 42%, durant toute la durée du test de rappel en comparaison à l'inactivité basale de la veille oscillant entre 7 et 12% (**Figure 16B**).

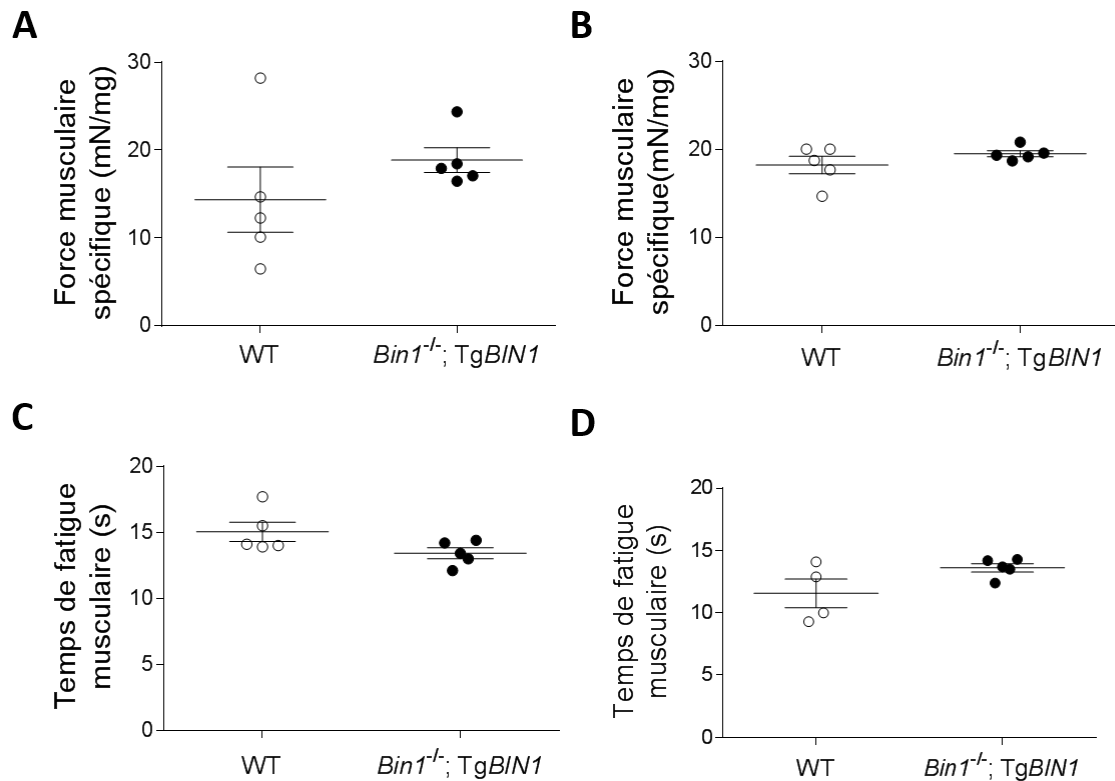
Dans un second temps, la phase de rappel indicé consiste à placer les souris dans un environnement modifié et donc nouveau. Après deux minutes d'habituation, les animaux sont exposés pendant deux minutes aux indices sonores et lumineux présentés la veille durant le choc électrique. Au bout de ces deux minutes, un nouveau cycle est reproduit. Nous observons de manière significative que tous les animaux présentent une inactivité locomotrice plus importante lors des présentations des stimuli visuels et auditifs, et ce, durant les deux cycles et indépendamment du génotype considéré (**Figure 16C**). Ces résultats indiquent une capacité préservée du rappel contextuel et indicé.



**Figure 16 : Pourcentage d'inactivité des souris *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1 âgées de 3 mois après un test de conditionnement à la peur.** (A) Une phase d'habituation a été réalisée le premier jour durant les quatre premières minutes (J1 t0-t2 et J1 t2-t4). Cette phase d'habituation a été suivie d'un choc électrique concomitant à la présence d'une lumière latérale et d'un son (J1 t4-t6). (B) Le deuxième jour, les animaux ont été replacés dans le même contexte. Les données représentent d'une part les valeurs d'inactivité obtenues durant la phase d'habituation effectuée la veille (J1 t0-t2 et J1 t2-t4) et d'autre part l'inactivité des animaux lors du test de rappel contextuel (J2 t0-t2, J2 t2-t4 et J2 t4-t6). (C) Les animaux ont ensuite été placés le même jour dans un nouvel environnement pour un test de rappel indicé. Lors de ce test, les animaux ont été exposés soit au nouveau contexte seul (J2 t0-t2 et J2 t4-t6) soit au nouveau contexte avec émission du son et la lumière présents lors du conditionnement (J2 t2-t4 et J2 t6-t8). Les données sont représentées avec la moyenne ± SEM. L'analyse statistique a été effectuée par ANOVA à mesures répétées, suivie d'un test post hoc de comparaisons multiples de Tukey afin de déterminer au sein de chaque génotype les différences pouvant exister entre les différentes phases. \* et # p-valeur < 0,05; ## p-valeur < 0,01; \*\*\* et ### p-valeur < 0,001

*a. iv. Test de la force musculaire*

À la fin de l'étude comportementale, les animaux ont été sacrifiés à l'âge de 4 mois, afin de réaliser dans un premier temps une étude de la force musculaire *in vivo* par transducteur de force (AURORA) au niveau du muscle tibial antérieur. Ce test, réalisé par la Dr. Belinda Cowling, ne montre pas de différence dans la force absolue de contraction musculaire (Figure 17A-B), ni dans la fatigue musculaire (Figure 17C-D) entre les animaux WT et *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1 que ce soit chez les mâles ou les femelles.



**Figure 17 : Force et fatigue musculaire des souris *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1 âgées de 4 mois.** Le test de transduction de force permet de visualiser la force musculaire du muscle tibial antérieur relativement à sa masse chez les mâles (A) et les femelles (B). Il permet également de déterminer le temps de fatigue musculaire équivalent à une perte de 50% de la force absolue après stimulation tétaïque chez les mâles (C) et les femelles (D). Les données représentées avec la moyenne ± SEM, ont été analysées avec le test non paramétrique de Mann-Whitney

## 2. b. Etude histologique

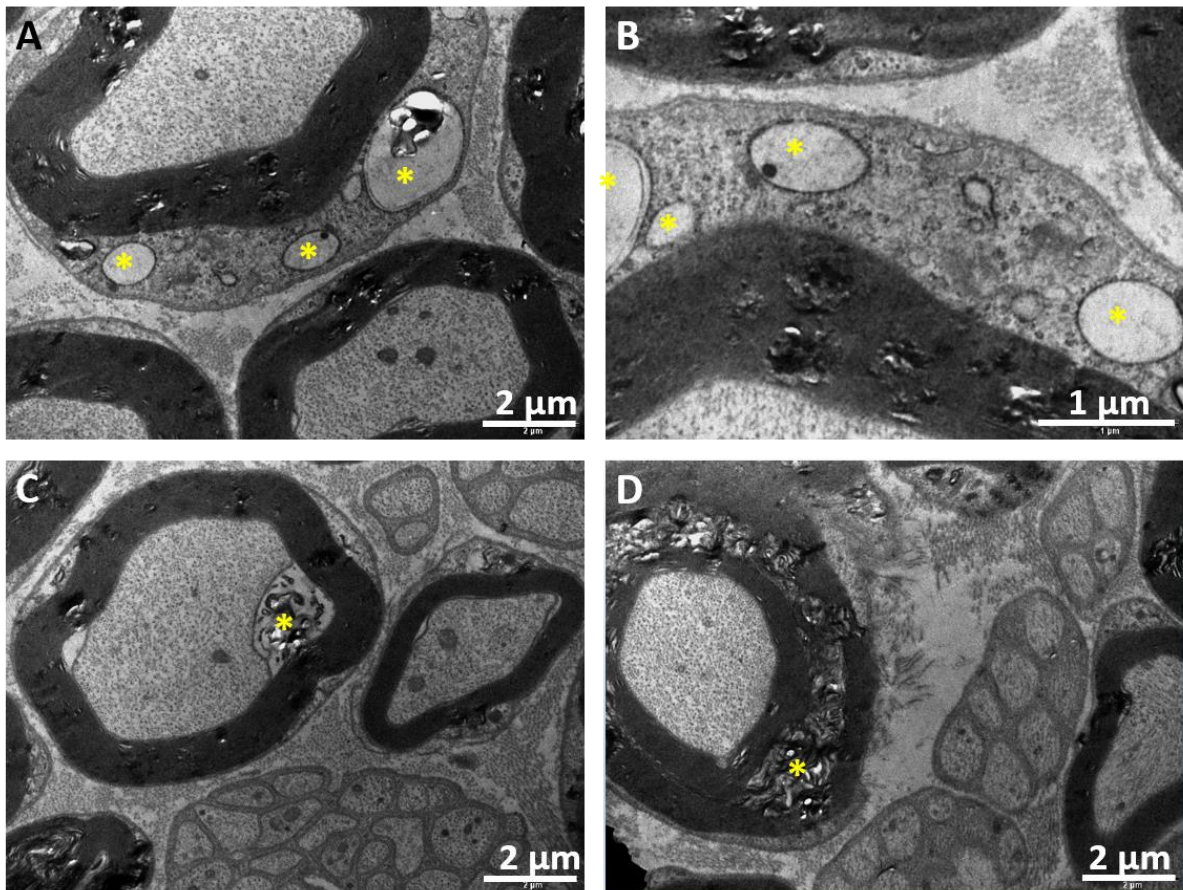
Différents organes exprimant BIN1 ont été prélevés chez les mâles et les femelles. Leurs analyses histologiques ont été réalisées par la plateforme d'histologie de l'ICS (Dr. Hugues Jacob et Dr. Olivia Wendling). Ces analyses effectuées sur le foie, les testicules, la trachée, le cœur et les poumons n'ont pas révélées d'effets au niveau relatifs à la surexpression de *BIN1* en condition de perte homozygote du gène murin (données qualitatives non présentées).

### b. i. Microscopie électronique des nerfs sciatiques

Les nerfs sciatiques de deux mâles WT et deux mâles *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1 ont été prélevés dans la patte controlatérale à celle utilisée pour le test de force musculaire et ont été étudiés en microscopie électronique. Les coupes des nerfs, sans distinction du type de faisceau (sensoriel ou moteur) a mis en évidence des défauts structurels majeurs liés à la combinaison de la surexpression de *BIN1* et de la délétion de ce même gène murin.



Nous avons noté une dilatation importante du réticulum endoplasmique rugueux des cellules de Schwann permettant la myélinisation des nerfs périphériques. En effet nous avons observé une vacuolisation importante de cette organelle recouverte à sa périphérie de ribosomes (Figure 18A-B).



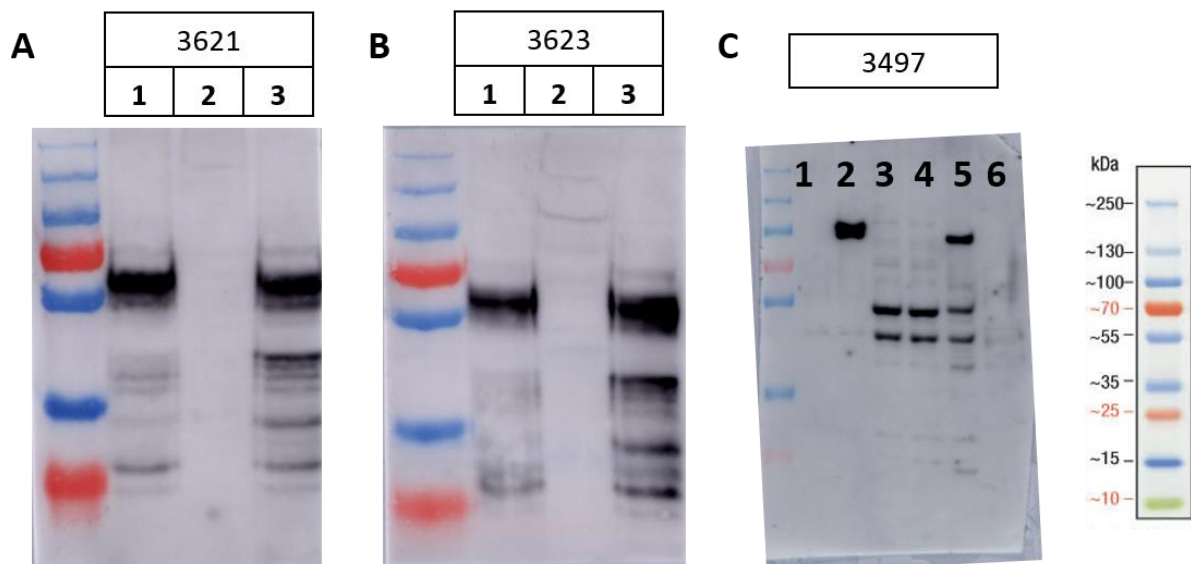
**Figure 18 : Microscopie électronique des nerfs sciatiques de souris *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1 âgées de 4 mois.** Des défauts structuraux majeurs (étoiles jaunes) apparaissent chez les souris *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1 dans la structure du réticulum endoplasmique (A, B) ainsi que dans la structure de la membrane plasmique avec inclusions intracellulaires (C) et dans la structure de la myéline (D).

Nous avons également observé des anomalies concernant l'ultrastructure des gaines de myélines. En effet chez les animaux *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1, nous visualisons aisément des replis de la membrane plasmique avec des inclusions de matériels non identifiés (Figure 18C) ainsi que des décollements de la gaine de myéline (Figure 18D).

2. c. Epissage alternatif de *BIN1*

Des ARNm issus de l'hippocampe d'une souris *Bin1<sup>-/-</sup>;TgBIN1* âgée de 4 mois ont été clonés. Ce clonage a mis en évidence la production de l'isoforme cérébrale BIN1-iso1 (**Figure S 3A**), l'isoforme ubiquitaire BIN1-iso9 (**Figure S 3B**) mais également différentes isoformes non décrites dans la littérature (**Figure S 3C**). La faible quantité de clones obtenus ne nous permet pas pour l'heure de déterminer plus précisément la proportion de ces différentes isoformes. La production d'isoformes, non-décrites dans la littérature, dans le tissu musculaire de ces souris *TgBIN1* ont également été retrouvées par un autre expérimentateur du laboratoire et par clonage (données non présentées).

Au niveau protéique, nous avons analysé des extraits de cerveau entier. Nous avons constaté que les animaux *TgBIN1* montrent des profils d'expression de BIN1 à de faibles poids moléculaires en dessous de BIN1-L (**Figure 19A-B**). Les anticorps polyclonaux utilisés en WB (n°3421 et 3423) ciblent le domaine C-terminal de BIN1. Cependant, nous n'avons pas observé avec ces anticorps des isoformes neuronales présentant une taille relative de 100 kDa. Il nous est apparu important que les anticorps choisis pour les expériences à venir soient capable de détecter cette isoforme.



**Figure 19 : Spécificité des anticorps  $\alpha$ -BIN1.** Les anticorps 3621 (A) et 3623 (B) ciblent la partie c-terminale de BIN1. Des extraits de cerveaux entiers WT (1), *Bin1<sup>-/-</sup>* (2) et *TgBIN1* (3) ont été utilisés. L'anticorps 3497-BAR-BIN1 (C) cible le CLAP domaine spécifique des isoformes cérébrales. Des extraits de cellules COS transfectées avec BIN-iso9 (1) ou avec BIN1-iso1 (2), des extraits de cerveaux néonataux de souris WT (3) ou *Bin1<sup>-/-</sup>* (4), des extraits d'hippocampe de souris *Bin1<sup>-/-</sup>;TgBIN1* de 4 mois (5) et des extraits de muscles de souris *TgBIN1* adultes (6) ont été utilisés.

*c. i. Développement d'un anticorps spécifique de l'isoforme neuronale*

Nous avons donc développé<sup>1</sup>des anticorps polyclonaux de lapin permettant la reconnaissance du domaine CLAP et BAR (exon 7) spécifiques des isoformes neuronales (séquence peptidique localisée dans l'exon 16). Parmi les deux peptides immunogéniques produits et les sérums obtenus à partir de quatre lapins, nous présenterons uniquement les résultats relatifs aux l'anticorps 3497-BIN1-BAR et  $\alpha$ -CLAP-BIN1. Ces anticorps ont été testés en WB, en immunofluorescence et en Co-IP. Dans nos conditions expérimentales, seule l'utilisation en WB est validée. Les résultats obtenus en Co-IP et en immunofluorescence ne seront pas présentés dans ce manuscrit.

*c. ii. Western Blot 3497-BAR-BIN1*

L'anticorps 3497-BIN1-BAR met en évidence BIN1-H à une taille relative de 100 kDa dans les cellules transfectées et dans les extraits d'hippocampe de souris *Bin1*<sup>-/-</sup>;*TgBIN1* (**Figure 19C**) Nous avons, comme précédemment, observé avec cet anticorps 3497-BIN1-BAR des profils à de faibles poids moléculaires dans des extraits de cerveaux. Cependant, ces profils n'ont pas été retrouvés dans les cellules transfectées et dans les extraits de tissu musculaire d'animaux *TgBIN1*, indiquant la présence du domaine CLAP de ces isoformes au niveau du tissu cérébral. Sans le concours d'une étude de l'expression en ARNm de *BIN1*, nous ne pouvons pas définir si ces profils à de faibles poids moléculaires sont la résultante d'isoformes inconnues ou d'une dégradation protéique de BIN1.

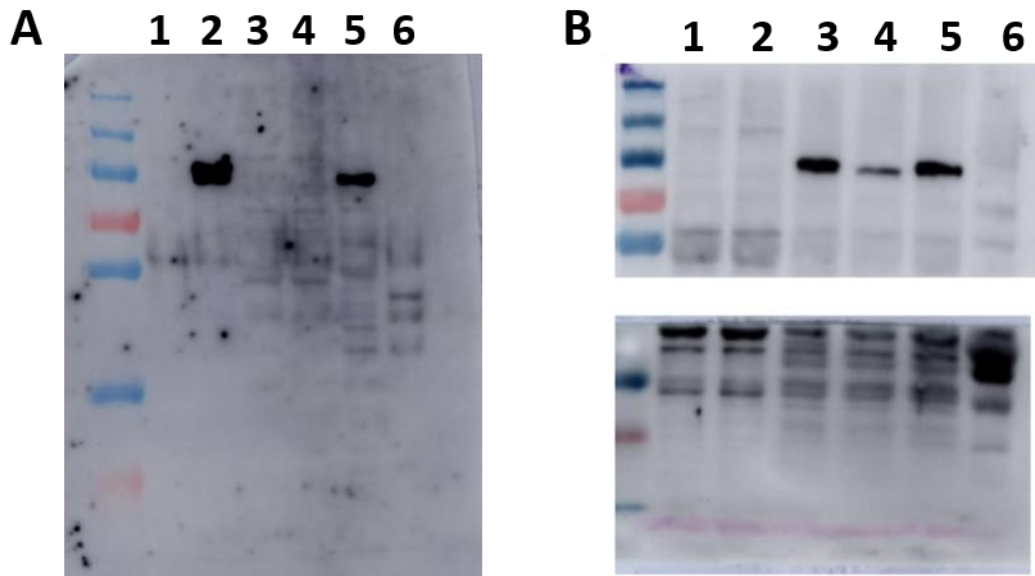
*c. iii. Western Blot  $\alpha$ -CLAP-BIN1 (3496)*

L'anticorps  $\alpha$ -CLAP-BIN1 met en évidence BIN-H à une taille relative de 100 kDa dans les cellules COS transfectées avec l'isoforme neuronale de BIN1 et dans les extraits d'hippocampe de souris *Bin1*<sup>-/-</sup>;*TgBIN1*. Comme attendu, nous avons observé une absence d'identification de BIN1 lorsque l'exon 16 n'est pas exprimé dans les cellules transfectées avec BIN1-iso9 ainsi que dans l'extrait musculaire (**Figure 20A**). L'absence de signal à la fois dans la condition *Bin1*<sup>-/-</sup> et la condition WT à P0 nous à mener à penser que ce domaine présente un épissage alternatif durant le développement cérébral au stade embryonnaire. Pour lever le doute, un deuxième WB a été conduit en utilisant les mêmes extraits de cerveaux néonataux (WT et *Bin1*<sup>-/-</sup>) et des extraits de cerveaux d'animaux plus âgés (**Figure 20B**). Nous avons observé,

---

<sup>1</sup> Avec le concours des plateformes de production de peptides et d'anticorps de l'IGBMC

qu'effectivement qu'une partie du domaine CLAP, *a minima* contenant l'épitope ciblé, présente un épissage alternatif durant le développement embryonnaire chez les animaux WT. Le domaine CLAP a ainsi été visualisé à l'âge adulte quel que soit le génotype considéré (WT, TgBIN1, ou Bin1<sup>-/-</sup>;TgBIN1).



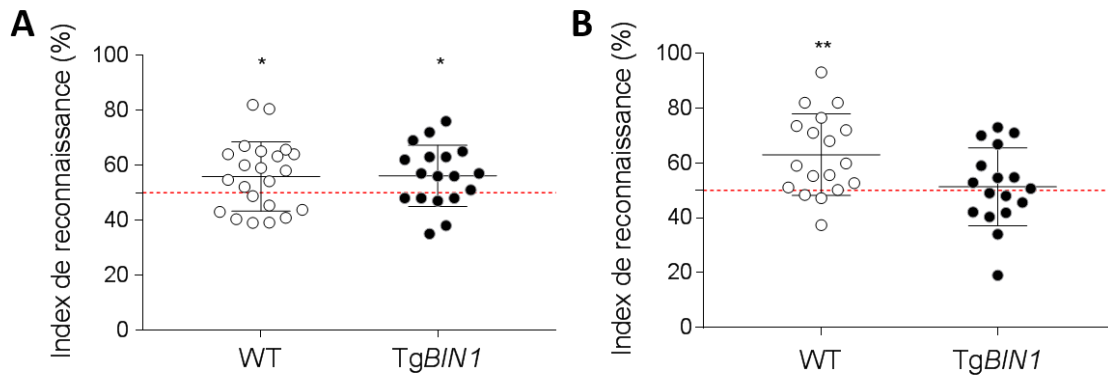
**Figure 20 : Validation de l'anticorps  $\alpha$ -CLAP-BIN1.** Un premier WB (A) a été réalisé en utilisant des extraits de cellules COS transfectées avec BIN-iso9 (1), ou avec BIN-iso1 (2), des extraits de cerveaux néonataux de souris WT (3), ou Bin1<sup>-/-</sup> (4), des extraits d'hippocampe de souris adultes (4 mois) de souris Bin1<sup>-/-</sup>;TgBIN1 (5) et des extraits de muscles de souris TgBIN1 adultes (6). Un second WB (B) a été réalisé avec des extraits de cerveaux néonataux de souris WT (1), des extraits de cerveaux néonataux de souris Bin1<sup>-/-</sup> (2), des extraits d'hippocampe de souris adultes WT de 4 mois (3), d'extraits d'hippocampe de souris WT de 15 mois (4), d'extraits d'hippocampe de souris Bin1<sup>-/-</sup>;TgBIN1 âgées de 4 mois (5) et des extraits de quadriceps de souris TgBIN1 âgées de 15 mois (6).

### I. 3. Etude comportementale du modèle TgBIN1

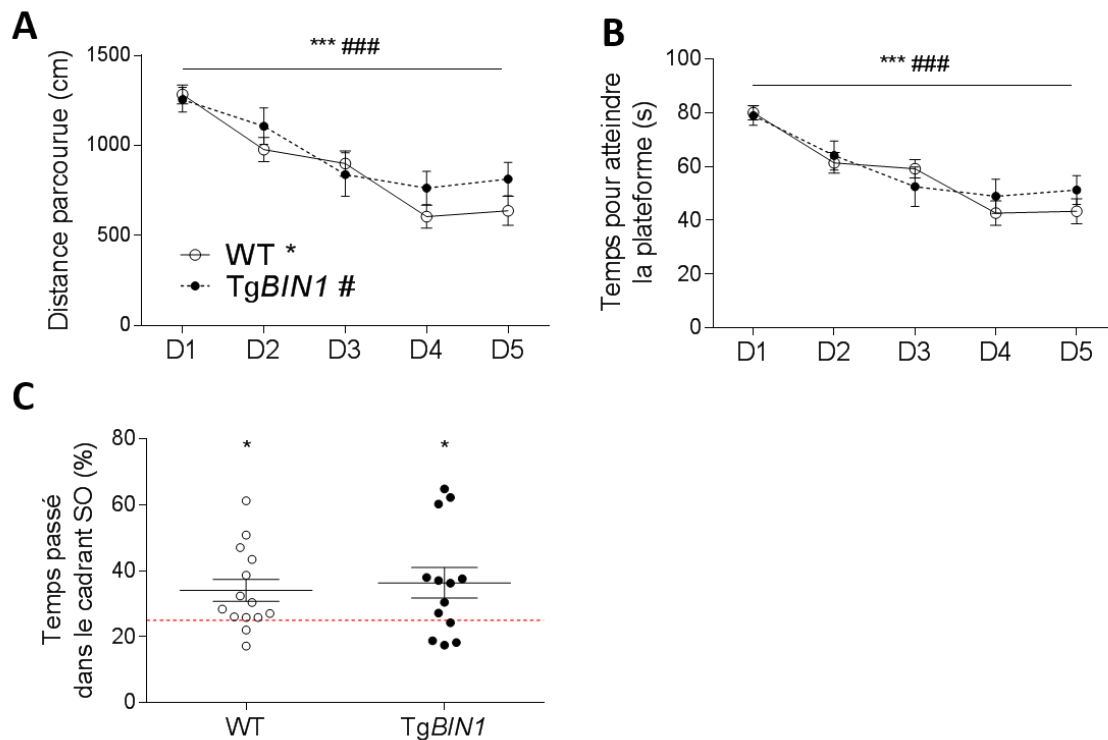
Différentes cohortes de souris WT et TgBIN1 ont été réalisées afin de caractériser de manière longitudinale les effets de la surexpression de ce gène sur les capacités mnésiques de ces souris.

#### 3. a. Phénotypes de reconnaissance d'objet

Un phénotype de déficit de mémoire à court terme lié à une incapacité de reconnaissance d'objet a été observé par le Dr. Maréchal dès l'âge de 6 mois chez les animaux TgBIN1. En effet, si ces animaux, à l'instar des WT, sont en mesure de discriminer les objets familier et nouveau à l'âge de 3 mois (Figure 21A), ils ne sont plus en mesure d'effectuer ce rappel à l'âge de 6 mois (Figure 21B).



**Figure 21 : Index de reconnaissance après une heure de rétention chez les souris TgBIN1 âgées de 3 (A) et 6 mois (B).** La ligne rouge discontinue représente un index de 50% pour lequel aucune préférence ne peut être visualisée. Les données, représentées avec la moyenne  $\pm$  SEM, ont été analysées avec le «one-simple t-test» car elles suivent une loi normale selon le test de Shapiro-Wilk. \* p-valeur < 0,05; \*\* p-valeur < 0,01



**Figure 22 : Impact de la surexpression de BIN1 sur la mémoire spatiale chez les souris mâles TgBIN1 à l'âge de 15 mois.** Courbe d'apprentissage de la distance (A) et du temps (B) nécessaire pour localiser la plateforme cachée au Sud-ouest (SO). Un test de rappel, durant lequel la plateforme est retirée, a été effectué 24 heures après la dernière session d'apprentissage chez les mâles (C). La ligne rouge discontinue représente un pourcentage de 25% pour lequel aucune préférence ne peut être visualisée. Les données moyennées  $\pm$  SEM suivent une loi normal selon le test de Shapiro-Wilk. Une ANOVA à mesures répétées suivie d'un test post hoc de comparaison multiples de Tukey a été effectuée pour l'apprentissage. Seule la différence entre le premier et le dernier jour d'apprentissage a été reportée. \*\*\* et ### p < 0,05. Le rappel a été analysé avec le «one-simple t-test». \* p < 0,05

### 3. b. Phénotype de mémoire à long terme en piscine de Morris

Afin de déterminer si un défaut de mémoire à long terme est présent chez ces animaux, un test de mémoire spatiale a été conduit en piscine de Morris. Des animaux non-naïfs âgés de 15 mois WT et TgBIN1 ont été utilisés. La phase d'apprentissage permet de s'assurer que l'ensemble des animaux présentent une diminution significative de la distance (**Figure 22A**) et du temps (**Figure 22B**) nécessaire pour localiser la plateforme cachée au Sud-Ouest signifiant un apprentissage correct de ces souris. Aucun effet gène n'a été observé.

Lors du test de rappel effectué 24 heures après la dernière session d'apprentissage, aucune différence dans le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible, où la plateforme était préalablement située, n'a été observée entre les deux génotypes (**Figure 22C**).

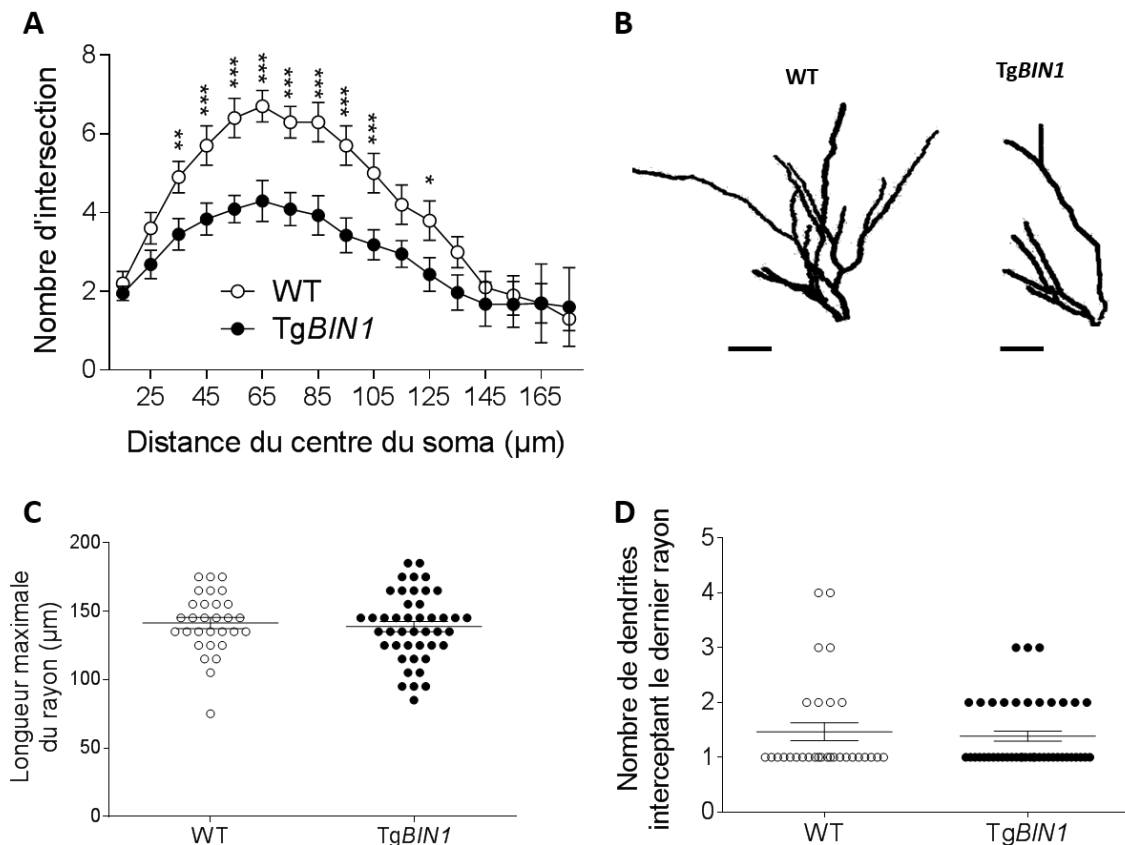
## I. 4. Etude histologique du modèle TgBIN1

### 4. a. Arborisation dendritique des cellules granulaires du gyrus denté

Des expériences de *pattern separation* réalisées par le Dr. Maréchal ont mis en évidence un défaut des animaux TgBIN1a effectuer cette tâche dès l'âge de 9 mois (*Daudin et al. en soumission*). Cette capacité est majoritairement supportée par le GD. De plus, des enregistrements d'électrophysiologie extracellulaire ont été réalisés par l'équipe du Pr. Simonneau. La voie perforante (CE → GD) de souris âgées de 3 mois a été stimulée et l'enregistrement s'est effectué au niveau des cellules granulaires du GD. Un défaut de potentialisation à long terme a été mis en évidence chez les animaux TgBIN1 (*Daudin et al. en soumission*). Nous nous sommes alors intéressés à déterminer si des défauts structurels de ces cellules granulaires pouvaient rendre compte en partie de ces défauts comportementaux et électrophysiologiques.

Un marquage aléatoire des cellules granulaires du GD par coloration de Golgi-Coxa a donc été réalisé sur des animaux mâles WT et TgBIN1 âgés de 3 mois. Après acquisition en microscopie confocale des neurones et reconstruction en 3D de leurs arborisations dendritiques, une analyse de Sholl en 3D a été effectuée. Les courbes représentant le nombre d'intersections des neurites au niveau des sphères virtuelles en fonction de la distance au centre du soma montrent une diminution drastique de la complexité dendritique chez les animaux TgBIN1

(Figure 23A). Cette diminution s’observe sur une reconstitution représentative en 2D des échantillons analysés (Figure 23B). Pour autant nous n’avons pas trouvé de différence dans le rayon maximal atteint par les sphères virtuelles (Figure 23C) et dans le nombre de dendrites pouvant atteindre cette longueur maximale entre les deux génotypes (Figure 23D). Ces résultats indiquent un impact de *BIN1* sur la complexité architecturale neuritique mais pas sur la capacité maximale de croissance des dendrites.

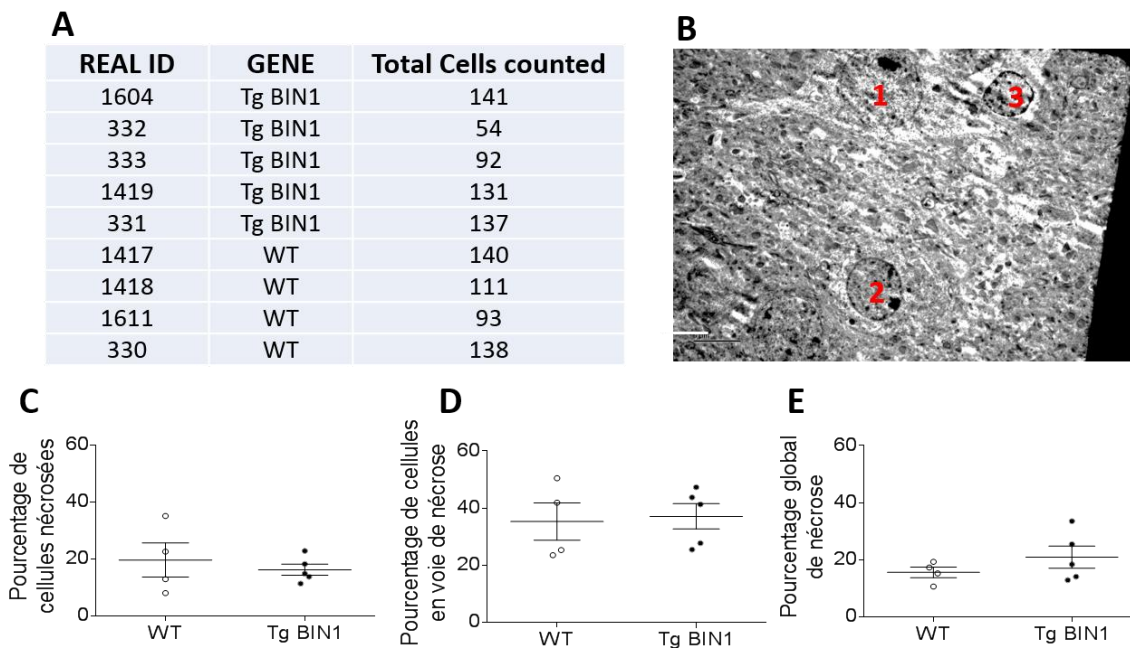


**Figure 23 : Architecture dendritique des cellules granulaires chez les souris mâles *TgBIN1* âgés de 3 mois.** Nombre d’intersections des neurites au niveau des sphères virtuelles en fonction de la distance au centre du soma par analyse de Sholl en 3D (A). WT; n=30 neurones, N=4 animaux et *TgBIN1*; n=44 neurones, N=4 animaux. Représentation de deux arbres dendritiques WT et *TgBIN1* en 2D (B). Longueur maximale du rayon de la dernière sphère pour chaque neurone en fonction du génotype (C). Nombre de dendrites interceptant cette dernière sphère en fonction du génotype (D). Les données (moyenne ± SEM) suivent une loi normale selon le test de Shapiro Wilk. Une ANOVA à mesures répétées suivie d’un test post hoc de Tukey a été effectuée pour l’analyse des intersections. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 et \*\*\* p < 0,001. Un t-test de Student a été effectué pour la longueur et le nombre de dendrites. \* p < 0,05. Echelle = 20 μm

#### 4. b. Microscopie électronique du cortex périrhinal à 15 mois

Le test de reconnaissance d’objet à court terme sollicite en grande partie le cortex périrhinal. Nous pouvons supposer que le défaut observé chez les *TgBIN1* dès 6 mois implique une

neurodégénérescence de cette structure. Nous avons donc mené des expériences de microscopie électronique sur le CP de ces animaux WT et TgBIN1 âgés de dix-huit mois (**Figure 24A**). Les neurones observés ont été différenciés en trois catégories. Ces catégories regroupent les neurones d'aspect normal, les neurones en voie de nécrose (condensation du noyau à sa périphérie) et les neurones nécrotiques présentant une forte condensation du noyau et un cytoplasme vidé de matériel (**Figure 24B**). Le nombre de neurones obtenus pour chacune de ces catégories a ensuite été normalisé par le nombre total de neurones visualisés. Les données recueillies mettent en évidence un processus de nécrose chez les animaux WT et TgBIN1. Nous n'avons pas relevé de différence en fonction du génotype dans le nombre de cellules nécrosées (**Figure 24C**), en voie de nécrose (**Figure 24D**) ou regroupant ces deux catégories (**Figure 24E**).



**Figure 24 : Microscopie électronique du cortex périrhinal chez les souris TgBIN1 âgées de 15 mois.** Nombre de neurones et d'animaux analysés (**A**). Trois catégories ont été établies en se basant sur des aspects structuraux (**B**) : des neurones normaux (1), des neurones en stade nécrotique avec une condensation de la chromatine au niveau de l'enveloppe nucléaire (2) et les neurones nécrosés avec une condensation et une absence de matériel cellulaire (3). Pourcentage moyen ( $\pm$  SEM) de cellules nécrosés (**C**), en voie de nécrose (**D**) ou apparentant à ces deux catégories (**E**) après normalisation par le nombre total de neurones. Un test de Mann-Whitney a été effectué pour l'analyse statistique. Seuil  $\alpha < 0,05$ . Echelle = 6  $\mu$ m



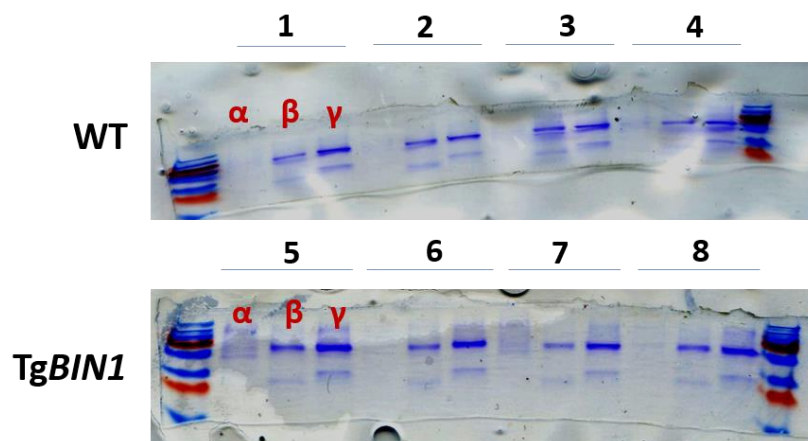
## I. 5. Etude moléculaire et cellulaire du modèle TgBIN1

### 5. a. Interactome préliminaire de BIN1

Les voies moléculaires engagées par BIN1 dans le système nerveux central ne sont pas encore complètement élucidées. En conséquence, l'impact d'une surexpression de ce gène sur ces voies n'a encore pas été étudié. Dans un souci de compréhension des mécanismes cellulaires impliquant un niveau physiologique et surexprimé de *BIN1*, des expériences de Co-IP ont été menées à l'aide d'un anticorps (C99D) ciblant l'exon 18 du domaine MBD présent dans toutes les isoformes référencées de BIN1.

#### a. i. Profil obtenu en coloration de Coomassie

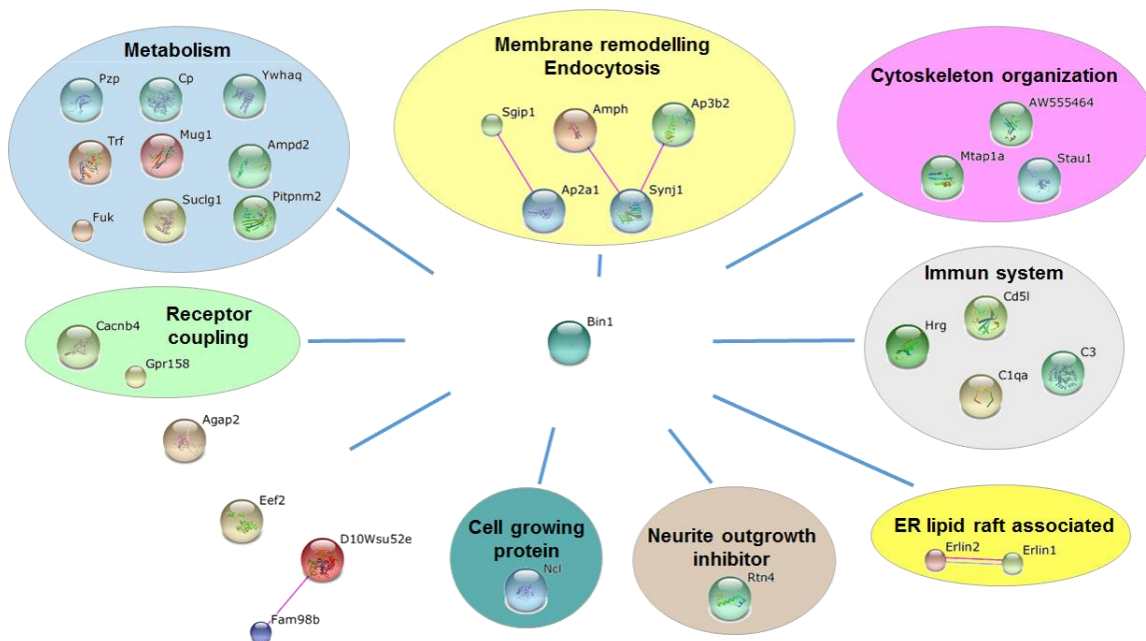
Après Co-IP, les échantillons obtenus à partir des quatre animaux WT et des quatre animaux TgBIN1 ont été colorés au bleu de Coomassie après avoir migré sur gel de SDS-polyacrylamide (**Figure 25**). Des bandes bleues de forte intensité sont nettement visibles dans les conditions avec anticorps (IgG et C99D) à une taille relative comprise entre 50 et 70 kDa. Ces profils pourraient être majoritairement composés de la forme ubiquitaire de BIN1 et des chaînes lourdes des anticorps ayant servis à l'immunoprécipitation. En effet, avant migration, l'ensemble protéique a été dénaturé et nous pouvons également observer les chaînes légères révélées avec une taille apparente de 25-35 kDa. Ces deux profils bleus ont été découpés puis analysés en spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) séparément du reste de chaque piste.



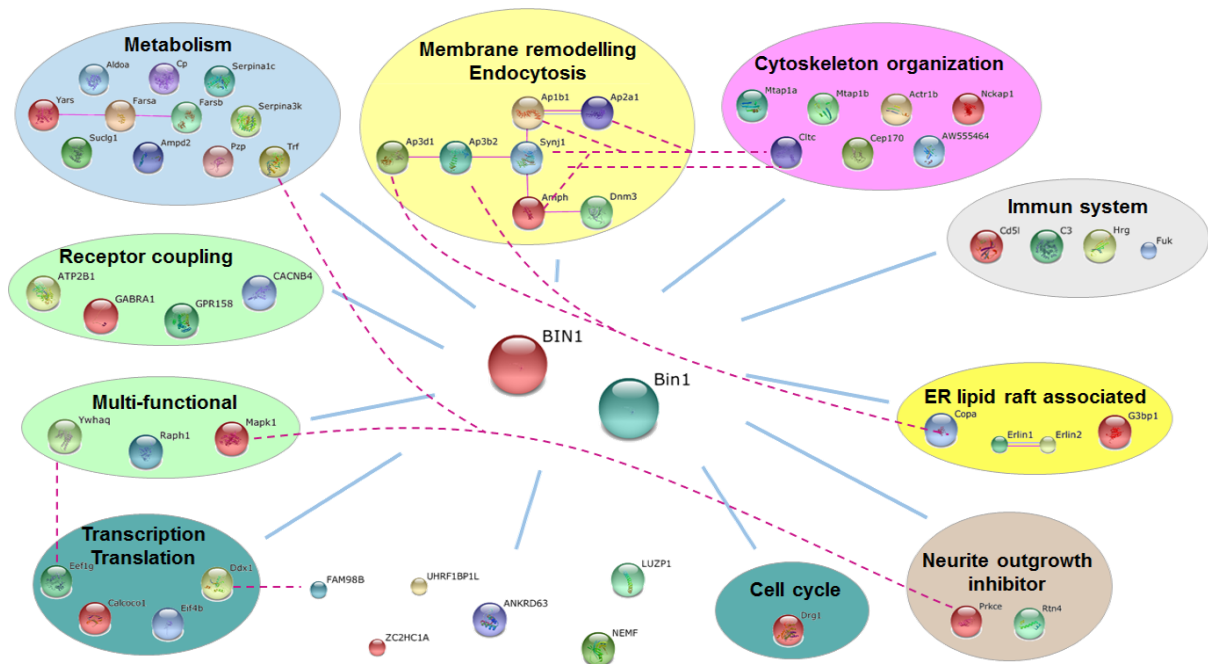
**Figure 25 : Gels de polyacrylamide après migration des produits de Co-IP de BIN1.** Pour chaque animal (1,2,...,8) sont associées trois pistes représentant les produits issus de la condition avec les billes uniquement ( $\alpha$ ), les anticorps IgG contrôles ( $\beta$ ) et les anticorps anti-BIN1-C99D ( $\gamma$ ).

a. ii. Interactome des animaux WT

A l'issue de l'analyse des données obtenues sur les quatre animaux WT et en utilisant les paramètres décrits dans le matériel et méthode ( $Sc=1$  ;  $Oc=3$ ), nous avons isolé des interacteurs potentiels de la protéine BIN1 (**Figure 26**). Nous avons alors regroupé les protéines selon leurs fonctions qui sont d'intervenir dans le métabolisme, le couplage aux récepteurs, dans l'endocytose et le remodelage membranaire, dans la régulation du cytosquelette, dans le système immunitaire, dans les « radeaux » lipidiques associés au réticulum endoplasmique, dans la croissance cellulaire et enfin dans la croissance neuritique, la myélinisation et la régulation du RE. Nous avons noté que certains interacteurs connus de BIN1 ont pu être identifiés comme l'AMPH1. Si nous n'avons pas obtenu d'interaction avec la protéine Tau, nous avons isolé une autre protéine intervenant dans la régulation du cytosquelette de microtubules, Mtap1a (*microtubule associated protein 1a*).



**Figure 26 : Interactome des animaux WT.** Les protéines ont été regroupées selon leurs fonctions. Certaines protéines peuvent appartenir à deux catégories. La catégorie finale a été décidée selon l'implication de la protéine dans les phénotypes préalablement observés chez les TgBIN1. En violet sont représentées les interactions déjà démontrées expérimentalement et identifiées avec String ([www.string-db.org](http://www.string-db.org)) avec un degré de confiance élevé de 0.7



**Figure 27 : Interactome des animaux TgBIN1.** Les protéines ont été regroupées selon leurs fonctions. Certaines protéines peuvent appartenir à deux catégories. La catégorie finale a été décidée selon l'implication de la protéine dans les phénotypes préalablement observés chez les TgBIN1. En violet sont représentées les interactions déjà démontrées expérimentalement et identifiées avec String ([www.string-db.org](http://www.string-db.org)) avec un degré de confiance élevé de 0.7

*a. iii. Interactome des animaux TgBIN1*

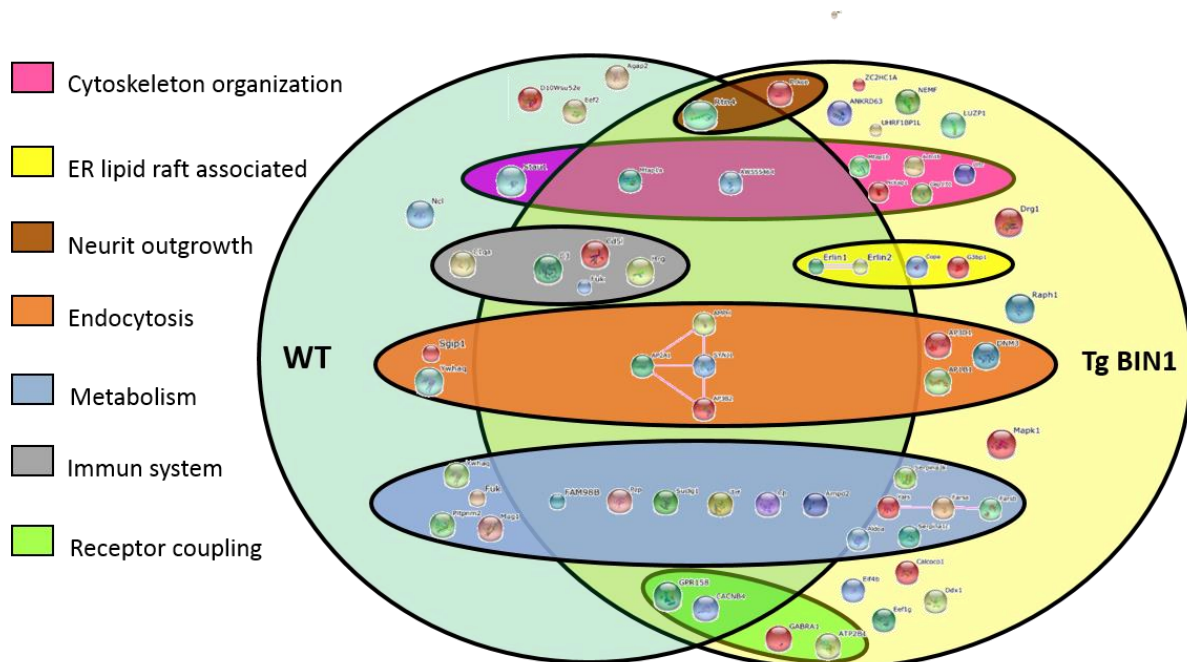
De la même manière et en utilisant les mêmes paramètres que précédemment, l'interactome potentiel issu des animaux TgBIN1 (**Figure 27**) permet de rendre compte d'une gamme plus étendue d'interacteurs (53 interacteurs) que ceux obtenus dans la condition WT (31 interacteurs). Nous avons également observé la présence de la forme murine et humaine de BIN1. Concernant les fonctions cellulaires impliquées par ces protéines, nous obtenons les mêmes groupes complétés par un groupe de protéines impliquées dans la transcription et la traduction. A l'instar de la condition WT, nos expériences ne nous ont pas permis d'identifier la protéine Tau mais nous avons retrouvé Mtap1a et Mtap1b.

*a. iv. Interactome global*

Enfin, s'agissant de l'analyse croisée sur l'ensemble des animaux (Sc=1 ; Oc=7) un interactome potentiel global a été généré. Celui-ci, sous forme de diagramme de Venn (**Figure 28**), permet de visualiser les interacteurs uniques ou communs aux deux génotypes. Un glossaire

récapitulant l'ensemble de ces protéines et de leur fonction est disponible **en annexe**

**III. Glossaire, p. 184.**



**Figure 28 : Interactome global des animaux WT et TgBIN1.** Les protéines ont été regroupées selon leurs fonctions. Certaines protéines peuvent appartenir à deux catégories. La catégorie finale a été décidée selon l'implication de la protéine dans les phénotypes préalablement observés chez les souris TgBIN1.

### 5. b. Choix des interacteurs et validation

L'interactome potentiel généré a servi de base afin de sélectionner des interacteurs selon des critères objectifs. Ceux-ci comprennent la nouveauté par rapport à ce qui est connu de BIN1, l'implication potentielle de ces interacteurs dans la maladie d'Alzheimer et leurs rôles subcellulaires qui pourraient être en lien avec un ou des phénotypes observés chez les souris TgBIN1 et/ou Bin1<sup>-/-</sup>;TgBIN1.

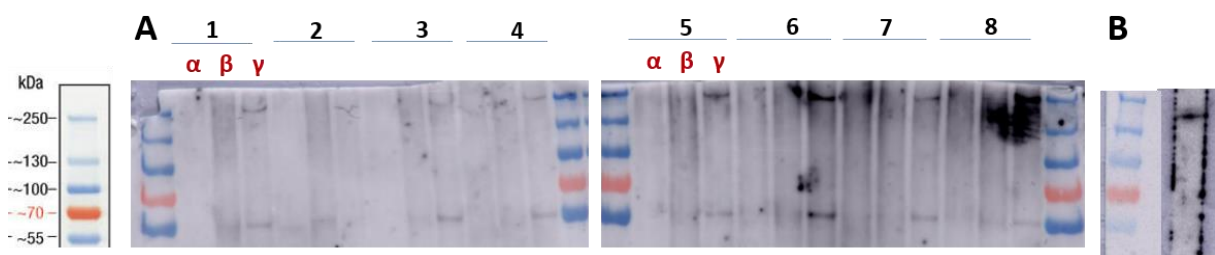
Après sélection des candidats, l'interaction avec BIN1 a été testée avec un processus reposant sur trois étapes. Premièrement, un WB a été réalisé avec les produits de Co-IP de BIN1 et des anticorps ciblant les interacteurs potentiels ont été utilisés. Deuxièmement, une Co-IP des interacteurs a été effectuée sur un pool des quatre animaux WT et des quatre animaux TgBIN1. Les produits de ces Co-IP « inverses » ont été migrés par WB et une détection de BIN1 (C99D) a été effectuée. Enfin, des expériences de PLA ont été effectuées sur des cultures de neurones primaires hippocampiques.

Les protéines sélectionnées sont : RTN4-A/Nogo-A<sup>1</sup>, Synaptojanine1, Erlin2, COP1 et G3BP<sup>2</sup>.

*b. i. RTN4-A*

L'analyse par MS/MS a permis l'identification chez tous les animaux WT et TgBIN1 de la protéine : RTN4-A. Cette protéine, qui est retrouvée surexprimée dans des extraits de cerveaux de patients Alzheimer, est surtout connue pour son rôle à la fois dans le remodelage du réticulum endoplasmique, dans sa participation dans les processus de myélinisation et dans la croissance neuritique. Nos précédentes observations de la perturbation de l'ensemble de ces éléments dans les modèles utilisés nous a conduit à cibler prioritairement ce nouvel interacteur potentiel.

Les WB effectués avec les produits de la Co-IP de BIN1 et incubés avec l'anticorps  $\alpha$ -RTN4-A permettent de visualiser la présence d'un signal uniquement dans la condition positive chez tous les animaux WT et TgBIN1 (**Figure 29A**). Le profil visualisé présente une taille moléculaire apparente conforme à la taille attendue d'environ 200 kDa et retrouvée dans des WB d'extrait de cerveaux (**Figure 29B**).



**Figure 29 : Gels de polyacrylamide après migration des produits de Co-IP de BIN1 chez les animaux WT et TgBIN1 (A).** Pour chaque animal (1,2,...,8) sont associées trois pistes représentant les produits issus de la condition avec les billes uniquement ( $\alpha$ ), les anticorps IgG contrôles ( $\beta$ ) et les anticorps anti RTN4-A ( $\gamma$ ). Un extrait de cerveaux WT a été migré et incubé avec  $\alpha$ -RTN4-A (**B**)

De la même manière, cette interaction a été identifiée par Co-IP inverse dans le pool d'animaux TgBIN1 et ce uniquement dans la condition positive ( $\alpha$ -RTN4-A ; **Figure 30**). Nous avons également noté que le profil moléculaire de BIN1 révélé en WB correspond à un poids moléculaire ( $\approx$  100 kDa) correspondant aux isoformes cérébrales.

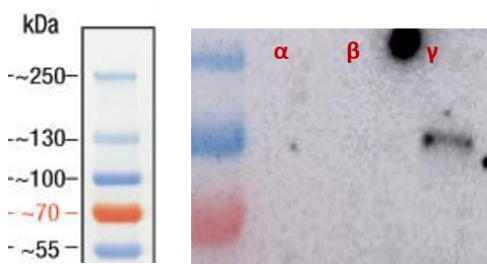
<sup>1</sup> La protéine a été baptisée sous un nom différent été explicité en discussion. Dans cette partie résultat, nous garderons RTN4-A pour nommer la protéine

<sup>2</sup> De l'anglais, *GTPase Activating Protein (SH3 Domain) Binding Protein*

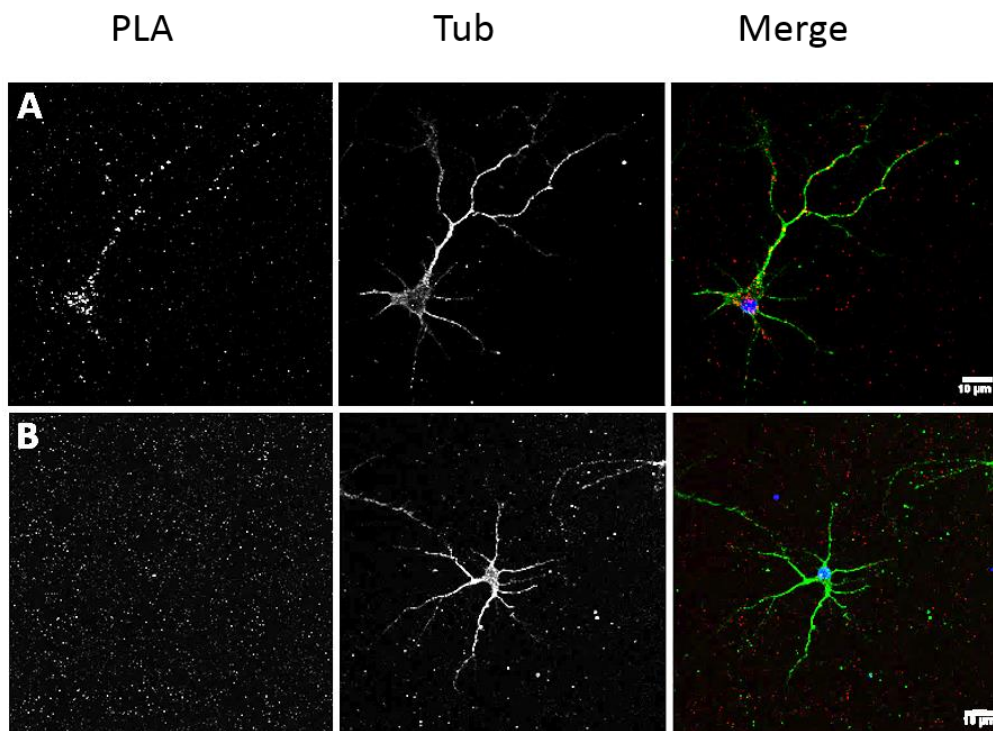
Les expériences de PLA montrent un signal somato-neuritique, observé uniquement dans la condition positive ( $\alpha$ -BIN1 +  $\alpha$ -RTN4-A ; **Figure 31A-B**).

Le co-immunomarquage avec  $\alpha$ -RTN4-A et  $\alpha$ -Tubuline montre une expression de RTN4-A dans l'ensemble de la cellule (**Figure 32**). Le signal observé présente également une forte intensité au niveau péri-nucléaire et au niveau du cône de croissance. Ce dernier étant majoritairement constitué de faisceaux d'actine.

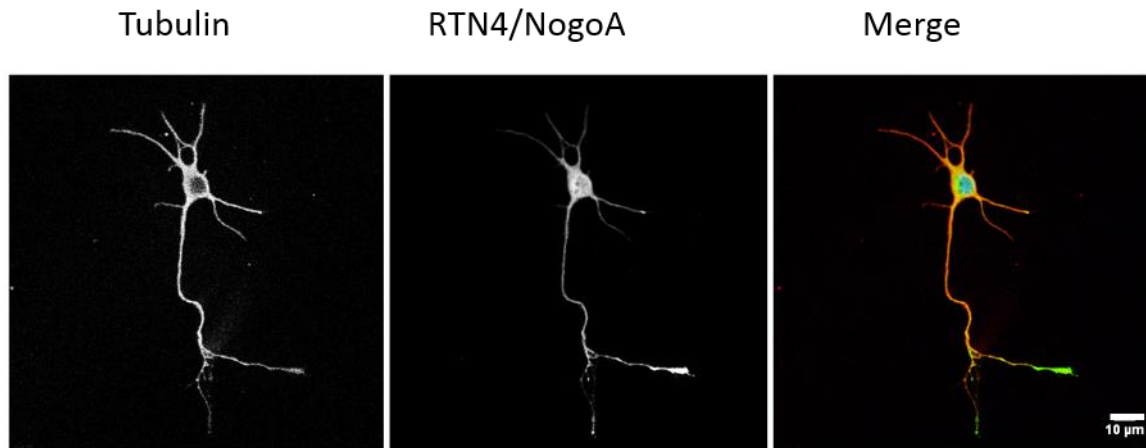
Enfin, il apparaît qu'une séquence consensus de reconnaissance par les domaines SH3 est retrouvée sur la séquence primaire de RTN4-A.



**Figure 30 : Gels de polyacrylamide après migration des produits de Co-IP de RTN4-A chez les animaux TgBIN1.** Pour chaque animal (1,2,...,8) sont associées trois pistes représentant les produits issus de la condition avec les billes uniquement ( $\alpha$ ), les anticorps IgG contrôles ( $\beta$ ) et les anticorps anti-BIN1 ( $\gamma$ )



**Figure 31 : PLA sur culture de neurones hippocampiques de souris WT.** En rouge l'interaction des deux anticorps  $\alpha$ -RTN4-A et  $\alpha$ -BIN1-C99D, en vert le marquage à la tubuline, en bleu le marquage du noyau au Hoechst (**A**). En contrôle, seul l'anticorps  $\alpha$ -BIN1-C99D a été ajouté à la culture (**B**). L'ensemble de ces conditions a été répété trois fois sur trois animaux issus de portées différentes. Les images présentées sont représentatives des observations effectuées.



**Figure 32 : Localisation cellulaire de RTN4-A.** Des immunomarquages de RTN4-A (rouge) et de la tubuline (vert) ont été réalisés sur des cultures de neurones hippocampiques d’animaux WT.

*b. ii. Autres interacteurs*

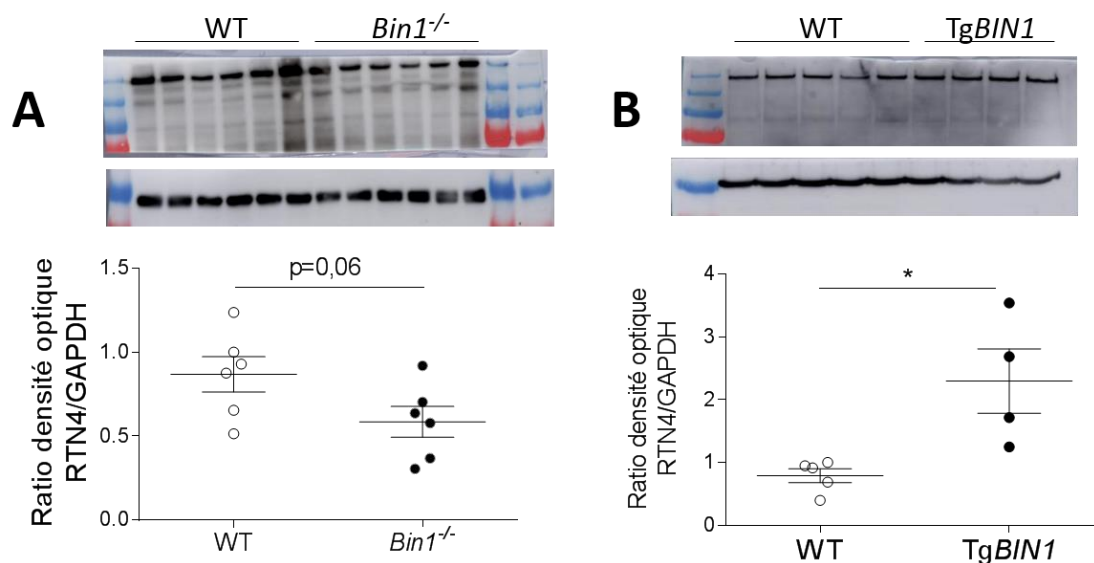
Dans la discussion de ce manuscrit, il ne sera pas fait mention des résultats obtenus avec les autres interacteurs connus ou sélectionnés pour le processus de validation, ceux-ci n’ayant pas passé complètement le processus de validation. Cependant, un tableau de synthèse récapitulant l’ensemble des observations est disponible en annexe (**Tableau S 4**).

*b. iii. Impact du niveau de BIN1 sur le niveau de RTN4-A*

Comme précédemment décrit, le niveau de RTN4-A a été identifié comme perturbé dans le cerveau de patients Alzheimer. Nous nous sommes interrogés sur la possible variation de niveau protéique de RTN4-A en fonction du niveau d’expression de BIN1.

Un WB effectué avec des extraits de cerveaux embryonnaires (E18,5) WT et *Bin1*<sup>-/-</sup> permet de rendre compte d’une tendance ( $p=0,06$ ) à une réduction de 32,5% du niveau de RTN4-A chez les souris *Bin1*<sup>-/-</sup> (**Figure 33A**).

Inversement, une surexpression de *BIN1* dans le modèle *TgBIN1* est en mesure d’induire une hausse d’un facteur de 2,9 de RTN4-A dans l’hippocampe de ces souris par rapport aux animaux WT (**Figure 33B**).



**Figure 33 : Niveau d'expression de RTN4-A en fonction du niveau de BIN1.** Les échantillons proviennent de cerveaux de souris WT et *Bin1*<sup>-/-</sup> à l'âge de E18,5 (**A**) ou d'hippocampes de souris WT et *TgBIN1* âgées de 18 mois (**B**). La densité optique mesurée a été normalisée par rapport au niveau de la GAPDH. L'analyse statistique s'est faite avec un t-test de Student (**A**) pour les données suivant une loi normale selon le test de Shapiro-Wilk ou sinon un test de Mann-Whitney (**B**). \*  $p < 0,05$

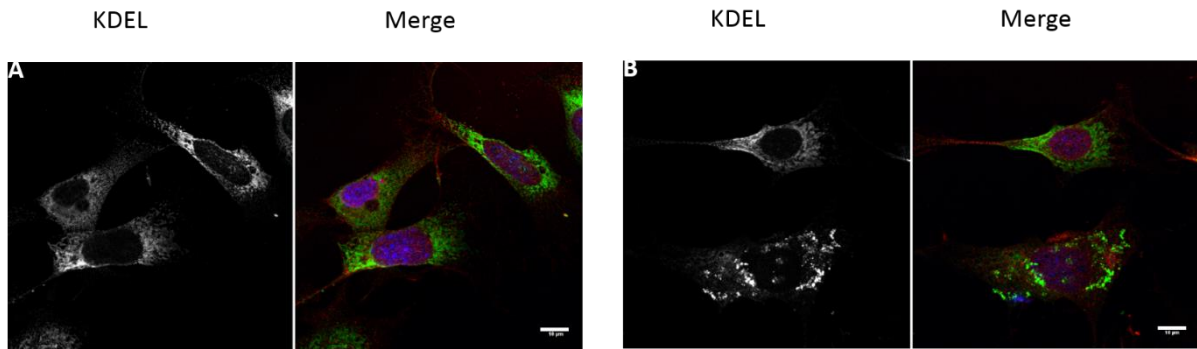
## I. 6. Etude cellulaire du modèle

Par la suite, nous avons voulu déterminer si la surexpression de BIN1 peut avoir des impacts sur les fonctions cellulaires impliquées dans les voies régulées par RTN4-A. Ainsi, nous nous sommes focalisés sur la régulation de la structure du réticulum endoplasmique. Des immunomarquages ont été réalisés sur des fibroblastes murins (MEF) ainsi que sur des cellules COS.

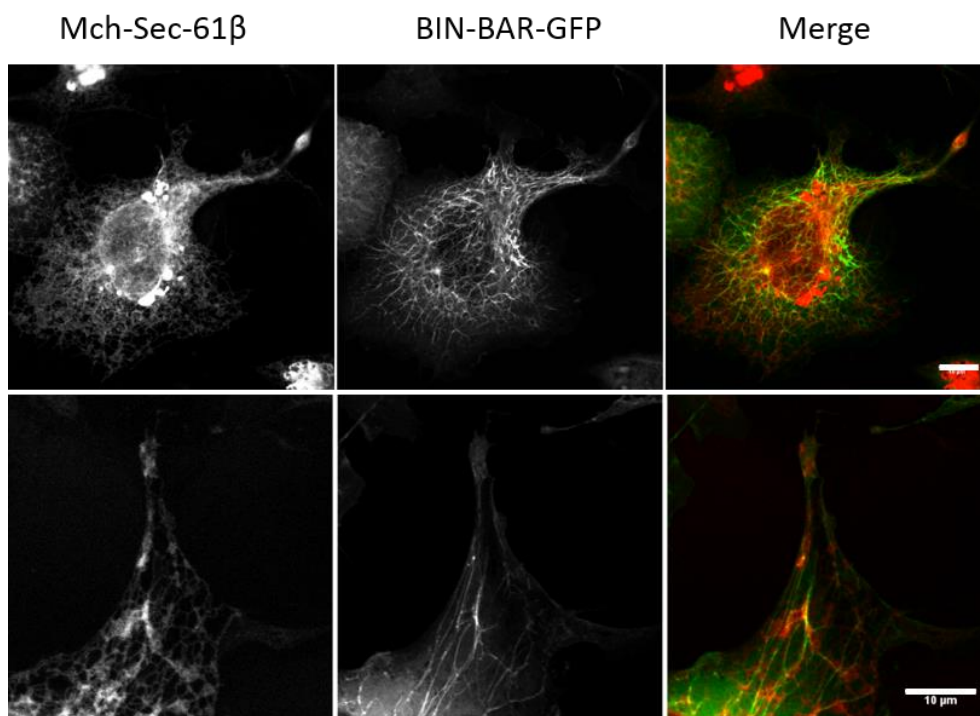
### 6. a. Phénotypes cellulaires observés dans les MEF

L'immunomarquage du RE avec l'anticorps  $\alpha$ -KDEL montre un réticulum diffus dans les MEF WT (**Figure 34A**). Cependant, nous avons observé que certaines cellules provenant d'animaux *TgBIN1* présentent un phénotype aberrant du réticulum qui se retrouve compacté (**Figure 34B**). Même si aucune anomalie n'a été observée dans les MEF issues des quatre animaux WT, il est tout de même nécessaire de quantifier le nombre de ces événements chez les quatre animaux *TgBIN1* afin d'assurer l'interprétation de ces données (travail en cours).





**Figure 34** : Immunomarquage du réticulum endoplasmique de MEF provenant d'animaux WT (A) et TgBIN1 (B). En rouge BIN1, en vert le réticulum endoplasmique et en bleu le noyau marqué au Hoechst. Echelle = 10 µm



**Figure 35** : Co-transfection d'une sonde ciblant le RE et de BIN1-BAR\* dans cellules COS. En vert le domaine BAR\* de BIN1 couplé à la GFP et en rouge la sonde du réticulum Sec-61β (mcherry). Le panel du bas est un agrandissement du panel du haut. Echelle=10µm

## 6. b. Phénotypes cellulaires observés dans les cellules COS

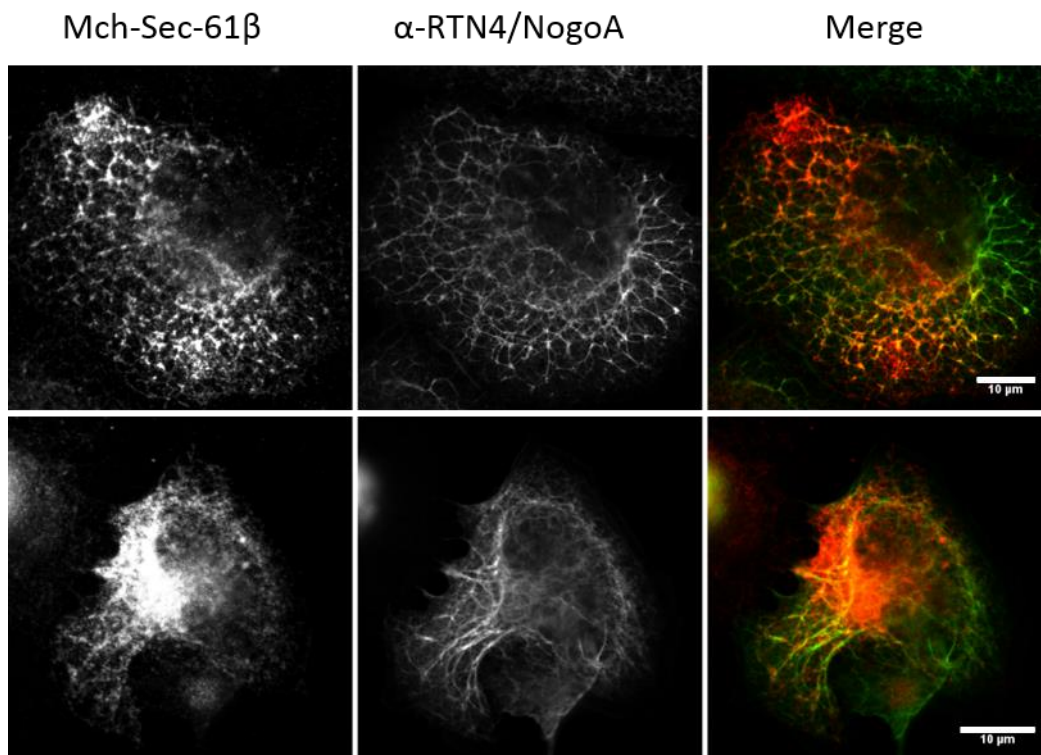
### *b. i. Tubulation induite par le domaine BAR de BIN1*

Nous avons observé que, comme décrit dans la littérature (Nicot et al. 2007), la surexpression du domaine BAR\*<sup>1</sup> couplé à la GFP dans des cellules COS est en mesure d'entraîner un

<sup>1</sup> Acides aminés 1-282 de BIN1, le domaine BAR\* contient le domaine de liaison aux phosphoinositides qui est codé par l'exon 11 spécifique du tissu musculaire.

phénotype de tubulation en étoile. Afin de déterminer si ces tubulations membranaires sont composées de réticulum endoplasmique, nous avons effectué un immunomarquage du RE ( $\alpha$ -KDEL) ou une co-transfection (sonde Sec-61 $\beta$ ). Les résultats préliminaires semblent indiquer une faible co-localisation observée en microscopie confocale (résolution de 200 nm maximum) entre le réticulum endoplasmique et ces tubulations (**Figure 35**). Il n'est donc pas exclu que ces tubulations aient en partie recours à cet organelle pour leur formation.

Nous avons également réalisé un immunomarquage de RTN4-A sur des cellules COS préalablement transfectées avec le domaine BAR\*. Nous avons observé une plus grande de co-localisation des tubulations en étoiles avec la protéine RTN4-A (**Figure 36**).



**Figure 36 : Transfection de BIN1-BAR\* et immunomarquage de RTN4-A dans cellules COS.** En rouge RTN4-A et en vert BIN1-BAR\* (GFP). Le panel du bas est un agrandissement du panel du haut. Echelle=10 $\mu$ m

*b. ii. Résumé du modèle TgBIN1*

En résumé, le gène *BIN1* est en mesure de combler, en partie, la perte endogène de *Bin1*. Nos données semble indiquer un fonctionnement complexe de la machinerie d'épissage du gène *Bin1* chez la souris et il n'est pas exclu que des éléments transcriptionnels nécessaire à l'épissage correct du gène humain ne soit pas présents dans la souris Tg*BIN1*. Au niveau du complexe moléculaire impliquant BIN1, les protéines issues de ces deux gènes *BIN1/Bin1*

présentent une interaction avec RTN4-A. Cette interaction peut être directe ou peut impliquer un complexe moléculaire multipartite. Si RTN4-A est une piste intéressante au regard des phénotypes observés *ex vivo* dans l'architecture du RE des cellules de Schwann et de la myéline, ces données ne permettent pas de savoir si ces aberrations sont également présentes dans le SNC. Nous ne pouvons pas non plus déterminer qui de la perte de fonction et/ou de la surexpression de *BIN1* est causative. Ce modèle *TgBIN1* présente une surexpression d'une partie du complexe BIN1-H, sans atteinte au niveau de BIN1-L, ce qui se traduit par une augmentation du ratio BIN1-H/BIN1-L. Cette surexpression est en mesure d'induire un déficit de mémoire à court terme précoce et de mémoire conditionnée à un âge tardif. L'étendue des atteintes cognitives avec l'âge, ainsi qu'une corrélation entre l'arborisation dendritique du GD et sa perte de potentialisation à long terme mettent en avant un processus dysfonctionnel chez cette souris *TgBIN1*. D'autres données disponibles dans la publication **en annexe (IV. 1. Article 1: TgBIN1, p. 191)** exhibent des changements micro-structuraux des voies hippocampiques observés en imagerie par résonance magnétique (IRM) ainsi qu'une réduction des épines dendritiques des cellules granulaires du GD.

## II. Effets croisés de la surexpression de BIN1 et de MAPT

Dans le but de déterminer les impacts comportementaux, cellulaires et moléculaires d'une surexpression de *BIN1* dans un contexte de tauopathie, nous avons croisé des modèles surexprimant *BIN1* et *MAPT*. L'ensemble des souris générées a permis la constitution de trois groupes incluant des mâles et des femelles, et dont le comportement a été suivi de manière longitudinale tous les trois mois. A la suite de cette étude comportementale, l'ensemble des animaux a été sacrifié pour des études histologiques et moléculaires. Afin de faciliter la lecture des résultats le groupe contrôle (*Mapt<sup>+/-</sup>*) sera nommé « Control », le groupe modélisant la tauopathie (*Mapt<sup>-/-</sup>* ; *TgMAPT*) sera nommé « htau » et enfin le groupe de surexpression conjointe de Tau et de BIN1 (*Mapt<sup>-/-</sup>* ; *TgMAPT* ; *TgBIN1*) sera nommé « htau;*TgBIN1* ».

Le poids des animaux a été évalué tous les trois mois en amont des tests effectués. Les histogrammes obtenus permettent de s'assurer qu'aucune variation de poids entre les groupes mâles et femelles n'a été enregistrée en fonction de l'âge (**Figure S 5**).

## II. 1. Etude comportementale longitudinale

### 1. a. Activité locomotrice en champs ouvert

#### a. i. *Activité enregistrée à 3 mois*

L'analyse de la distance totale parcourue, de la vitesse et de la mobilité à 3 mois nous indique que les mâles *htau ethtau;TgBIN1* ne présentent pas de différence par rapport aux animaux contrôles (**Figure 37A, C et E**). Les femelles *htau* présentent quant à elles une hypolocomotion par rapport aux femelles contrôles (**Figure 37B, D et F**) et une diminution du temps de mobilité par rapport aux animaux deux groupes (**Figure 37F**).

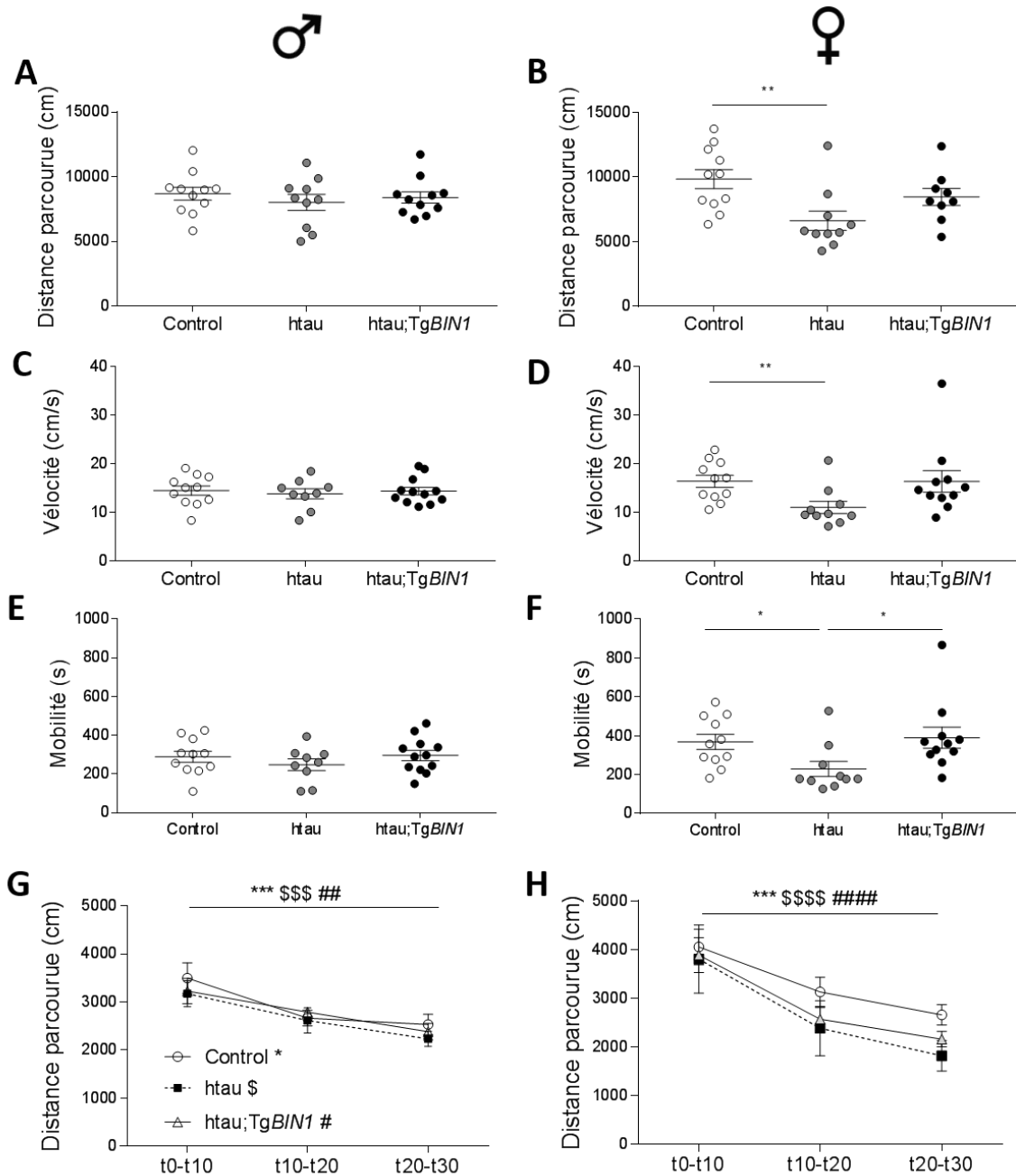
Ainsi ces données mettent en exergue une hypoactivité induite par la surexpression de *MAPT* chez les femelles qui est partiellement compensée par la surexpression de *BIN1*.

L'analyse de la distance parcourue par tranche de dix minutes nous permet de déterminer la capacité des animaux à explorer et à mémoriser leur nouvel environnement. Les courbes d'apprentissage obtenues chez les mâles et les femelles indiquent dans les deux cas une activité décroissante dans le temps, indépendamment du génotype considéré (**Figure 37G-H**). Ces résultats nous renseignent sur la capacité intacte des animaux à effectuer un processus d'apprentissage.

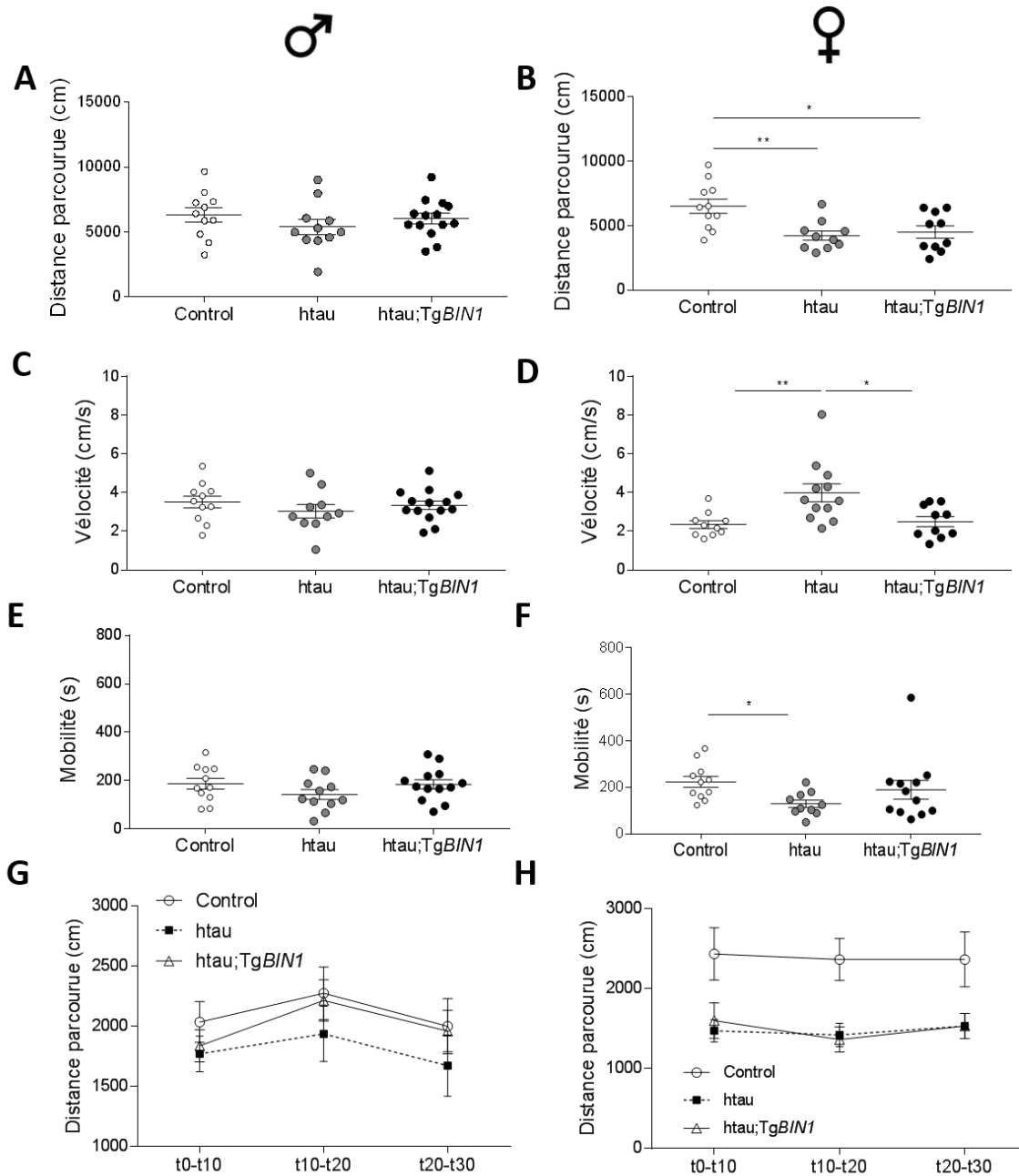
#### a. ii. *Activité enregistrée à 6 mois*

Comme précédemment, la distance parcourue ainsi que la vitesse moyenne et la mobilité ne présentent pas de différence au sein du groupe mâle à 6 mois d'âge (**Figure 38A, C et E**). Les résultats obtenus chez les femelles montrent quant à eux une hypolocomotion des animaux *htau* et *htau;TgBIN1* par rapport aux contrôles avec une diminution respective de 35% et 31% de la distance parcourue (**Figure 38B**). Ces différences ont également été observées pour la mobilité (**Figure 38D**) et pour la vitesse entre les femelles *htau* et les contrôles (**Figure 38F**). Ainsi ces données mettent toujours en exergue une hypoactivité induite par la surexpression de *MAPT* chez les femelles

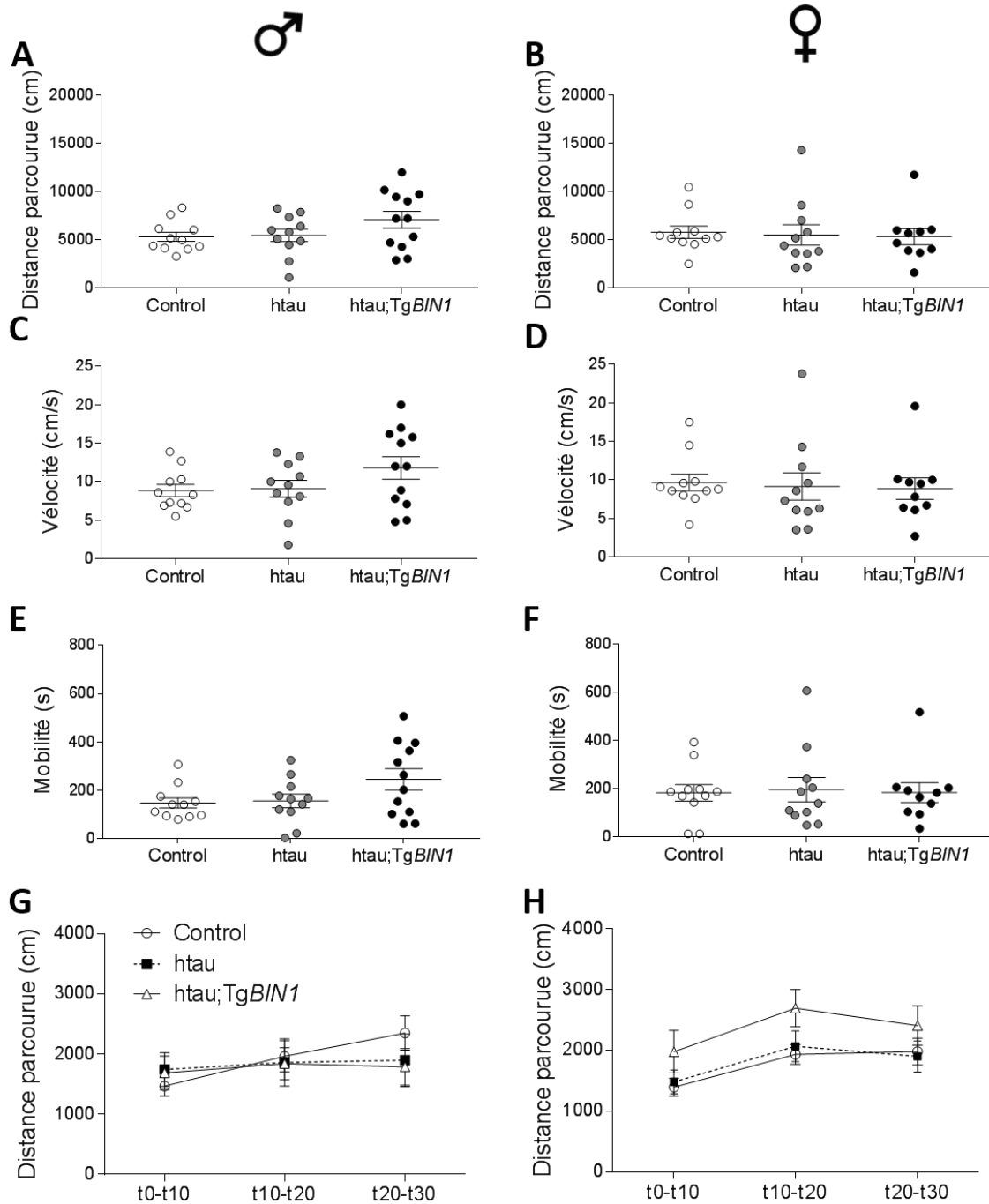
Les courbes d'apprentissage réalisées par tranches de dix minutes ne montrent pas d'activité locomotrice décroissante en fonction du temps. Cette observation a été faite chez tous les génotypes indépendamment du sexe considéré (**Figure 38G-H**), ce qui indique l'absence d'un processus d'apprentissage de l'environnement.



**Figure 37 : Activité locomotrice en champ ouvert pendant 30 minutes des souris htau;TgBIN1 à 3 mois.** Les mâles sont présentés à gauche (A,C,E et G) et les femelles à droite (B,D,F et H). Les données extraites permettent de déterminer la distance totale parcourue en cm (A et B), la vitesse en cm/s (C et D) et la mobilité en s (E et J). L'ANOVA à un facteur a été suivie si nécessaire d'un test post hoc de comparaisons multiples de Bonferroni. En cas d'absence de distribution normale des données, celles-ci ont été analysées par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc de comparaisons multiples de Dunn. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . La distance parcourue par tranche de dix minutes permet de déterminer l'habituation à l'environnement (G et H). L'ANOVA à mesures répétées a été suivie si nécessaire d'un test post hoc de comparaisons multiples de Tukey pour étudier l'effet temps dans chaque génotype. \*\*\*, \$\$\$ et ###  $p < 0,001$ , \$\$\$\$ et ####  $p < 0,0001$



**Figure 38 : Activité locomotrice en champ ouvert pendant 30 minutes des souris htau;TgBIN1 à 6 mois.** Les mâles sont présentés à gauche (A,C,E et G) et les femelles à droite (B,D,F et H). Les données extraites permettent de déterminer la distance totale parcourue en cm (A et B), la vélocité en cm/s (C et D) et la mobilité en s (E et J). L'ANOVA à un facteur a été suivie si nécessaire d'un test post hoc de comparaisons multiples de Bonferroni. En cas d'absence de distribution normale des données, celles-ci ont été analysées par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc de comparaisons multiples de Dunn. \* p < 0,05, \*\* p La distance parcourue par tranche de dix minutes permet de déterminer l'habituation à l'environnement (G et H). L'ANOVA à mesures répétées a été suivie si nécessaire d'un test post hoc de comparaisons multiples de Tukey pour étudier l'effet temps dans chaque génotype



**Figure 39 : Activité locomotrice en champ ouvert pendant 30 minutes des souris htau;TgBIN1 à 9 mois.** Les mâles sont présentés à gauche (**A,C,E et G**) et les femelles à droite (**B,D,F et H**). Les données extraites permettent de déterminer la distance totale parcourue en cm (**A et B**), la vélocité en cm/s (**C et D**) et la mobilité en s (**E et J**). L'ANOVA à un facteur a été suivie si nécessaire d'un test post hoc de comparaisons multiples de Bonferroni. En cas d'absence de distribution normale des données, celles-ci ont été analysées par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc de comparaisons multiples de Dunn. La distance parcourue par tranche de dix minutes permet de déterminer l'habituation à l'environnement (**G et H**). L'ANOVA à mesures répétées a été suivie si nécessaire d'un test post hoc de comparaisons multiples de Tukey pour étudier l'effet temps dans chaque génotype

*a. iii. Activité enregistrée à 9 mois*

À 9 mois, aucune différence significative n'a été enregistrée au niveau de la distance, de la vitesse ou de la mobilité à la fois chez les animaux mâles (**Figure 39A, C et E**) et femelles (**Figure 39B, D et F**). Aucune différence n'a été observée également au niveau des courbes d'apprentissage (**Figure 39G-H**).

*a. iv. Activité enregistrée à 12 mois*

À 12 mois, nous avons observé chez les mâles des disparités d'activité locomotrice en fonction du génotype. Ainsi, les animaux htau;TgBIN1 présentent une plus grande distance parcourue (+58%) par rapport aux animaux contrôles et les animaux htau présentent une tendance ( $p=0,0628$ ) à l'augmentation (+60%) de la distance parcourue par rapport aux animaux contrôles (**Figure 40A**). L'étude de la vitesse indique une augmentation significative de ce paramètre chez les animaux htau par rapport aux contrôles (**Figure 40C**). L'étude de la mobilité ne montre pas de différence significative entre les différents groupes mâles (**Figure 40E**). Les courbes du décours temporel de l'activité locomotrice indiquent elles aussi une hyperactivité des animaux htau et htau;TgBIN1 par rapport aux contrôles entre dix et vingt minutes (**Figure 40H**), sans aucun effet du temps sur la distance parcourue.

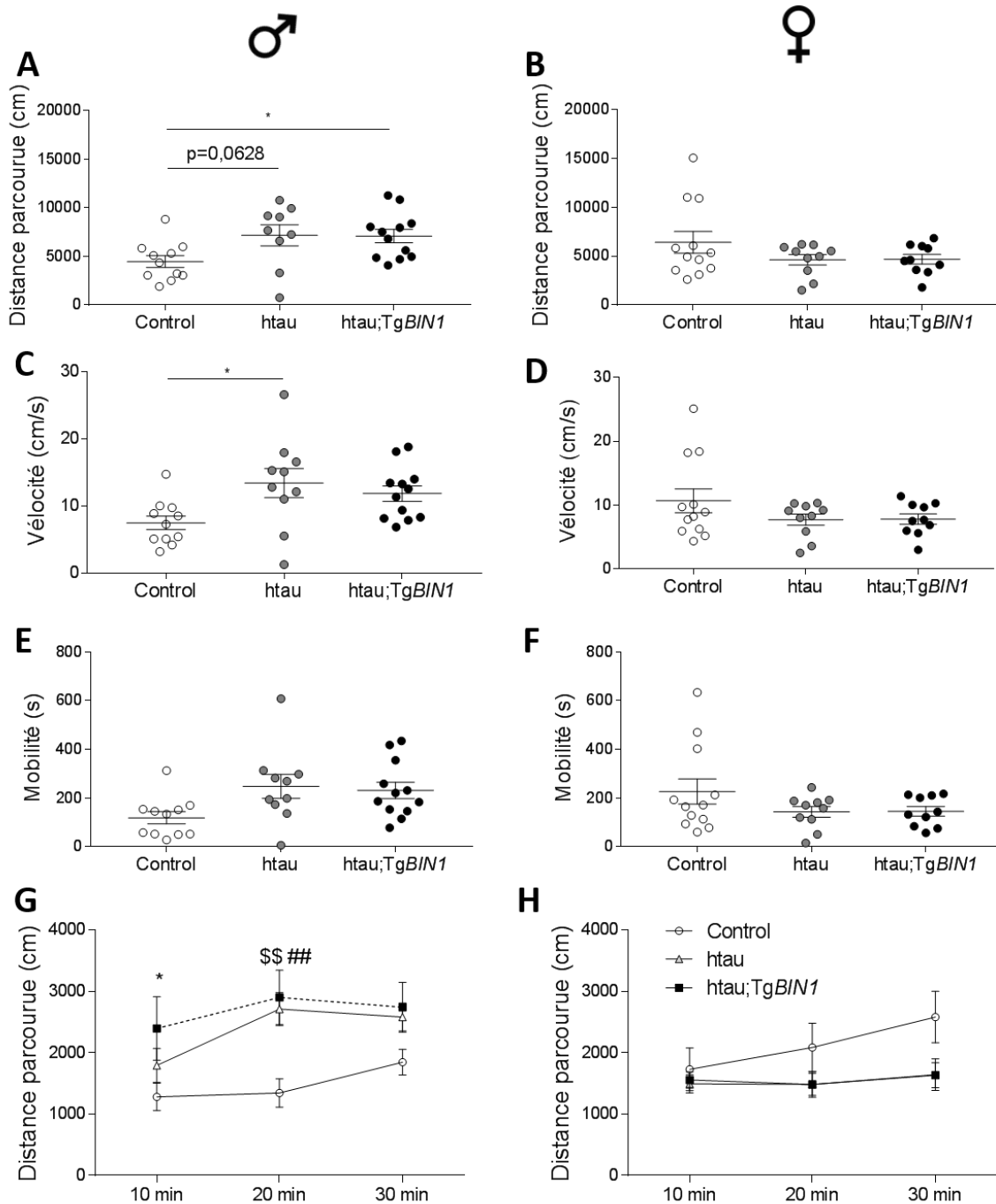
Concernant les femelles, aucune variation à cet âge n'a été mesurée (**Figure 40B, D, F et H**).

*a. v. Activité enregistrée à 15 mois*

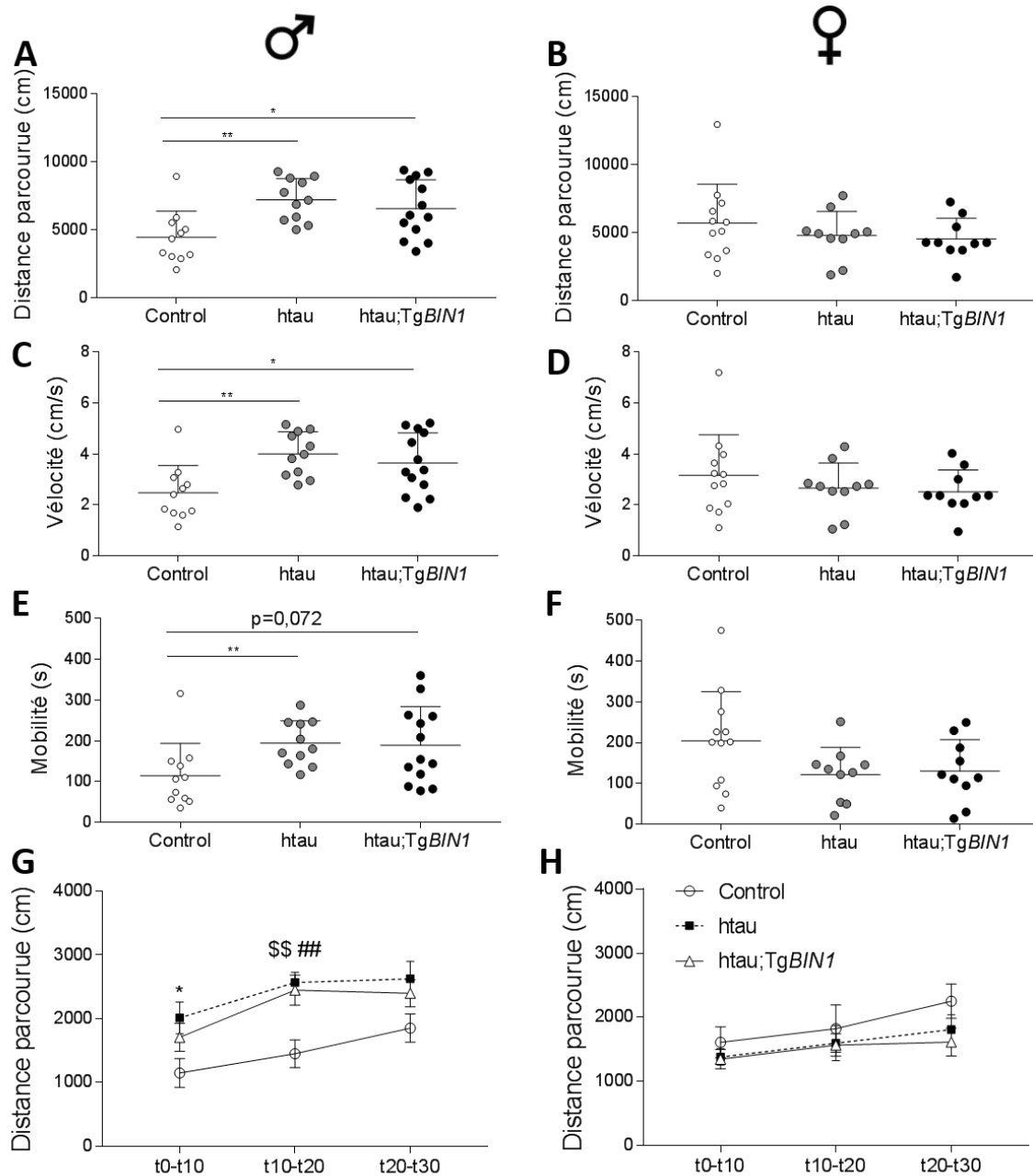
À 15 mois, nous avons de nouveau observé que les mâles htau et htau;TgBIN1 présentent une augmentation significative de la distance parcourue, respectivement de 62% et 47% (**Figure 41A**) et de la vitesse (**Figure 41C**) par rapport aux animaux contrôles. S'agissant de la mobilité, les animaux htau présentent une hausse significative de cet indice par rapport aux animaux contrôles, et les animaux htau;TgBIN1 présente une tendance à la hausse avec une  $p$ -valeur associée de 0,072 (**Figure 41E**). La hausse de l'activité locomotrice a de nouveau été visualisée entre dix et vingt minutes sans que le temps influence la distance parcourue (**Figure 41A**).

De la même manière qu'à 12 mois, aucune variation chez les femelles âgées de 15 mois n'a été identifiée (**Figure 41B, D, F et H**).

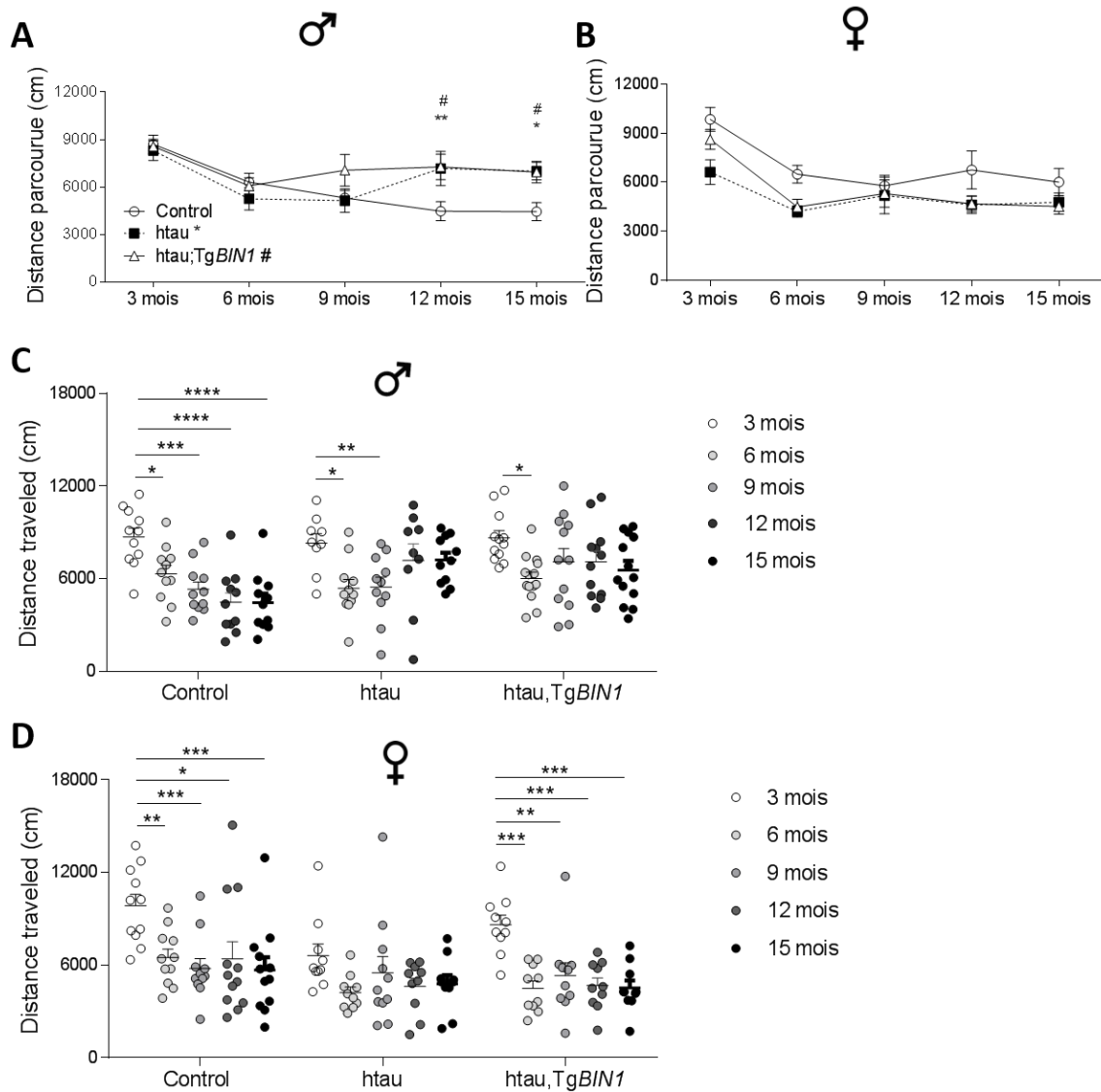




**Figure 40 : Activité locomotrice en champ ouvert pendant 30 minutes des souris htau;TgBIN1 à 12 mois.** Les mâles sont présentés à gauche (**A,C,E et G**) et les femelles à droite (**B,D,F et H**). Les données extraites permettent de déterminer la distance totale parcourue en cm (**A et B**), la vélocité en cm/s (**C et D**) et la mobilité en s (**E et J**). L'ANOVA à un facteur a été suivie si nécessaire d'un test post hoc de comparaisons multiples de Bonferroni. En cas d'absence de distribution normale des données, celles-ci ont été analysées par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc de comparaisons multiples de Dunn. \*  $p < 0,05$ . La distance parcourue par tranche de dix minutes permet de déterminer l'habituation à l'environnement (**G et H**). L'ANOVA à mesures répétées a été suivie si nécessaire d'un test post hoc de comparaisons multiples de Tukey pour étudier l'effet temps dans chaque génotype. \$\$, ###  $p < 0,01$



**Figure 41 : Activité locomotrice en champ ouvert pendant 30 minutes des souris htau;TgBIN1 à 15 mois.** Les mâles sont présentés à gauche (**A,C,E et G**) et les femelles à droite (**B,D,F et H**). Les données extraites permettent de déterminer la distance totale parcourue en cm (**A et B**), la vélocité en cm/s (**C et D**) et la mobilité en s (**E et J**). L'ANOVA à un facteur a été suivie si nécessaire d'un test post hoc de comparaisons multiples de Bonferroni. En cas d'absence de distribution normale des données, celles-ci ont été analysées par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'un test post hoc de comparaisons multiples de Dunn. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01. La distance parcourue par tranche de dix minutes permet de déterminer l'habituation à l'environnement (**G et H**). L'ANOVA à mesures répétées a été suivie si nécessaire d'un test post hoc de comparaisons multiples de Tukey pour étudier l'effet temps dans chaque génotype. \$\$, ### p < 0,01



**Figure 42 : Impact de l'âge et du génotype sur l'activité locomotrice des souris htau;TgBIN1.** Distance parcourue pendant 30 minutes à un âge donné en fonction du génotype chez les mâles (**A**) et les femelles (**B**). Distance parcourue pendant 30 minutes au sein de chaque génotype en fonction de l'âge des souris mâles (**C**) et femelles (**D**). Une ANOVA à mesures répétées suivie si nécessaire d'un test post hoc de comparaison multiples de Tukey afin de déterminer l'effet du génotype à chaque point horaire (**A,B**) ou les différences de chaque point horaire par rapport à 3 mois dans chaque génotype (**C,D**). \*,# p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001

*a. vi. Activité locomotrice globale au cours de l'âge*

L'ensemble des données préalablement exposées ont été regroupées dans des graphiques permettant de déterminer l'impact de chaque génotype sur la distance parcourue à un âge donné (**Figure 42A-B**) et à l'inverse, l'impact de l'âge sur la distance parcourue au sein de chaque génotype (**Figure 42C-D**). Nous avons constaté une diminution significative de l'activité locomotrice, entre 3 et 6 mois, de tous les animaux à l'exception des femelles htau.

Ainsi les mâles contrôles, htau et htau;TgBIN1 présentent respectivement une diminution d'activité de 27,5% ; 35,2% et 31,3%. La même diminution a été observée chez les femelles contrôles htau;TgBIN1 avec respectivement une diminution de 34,1% ; 36,3% et 48%. Il apparaît que de manière globale, les femelles htau présentent un phénotype d'hypolocomotion.

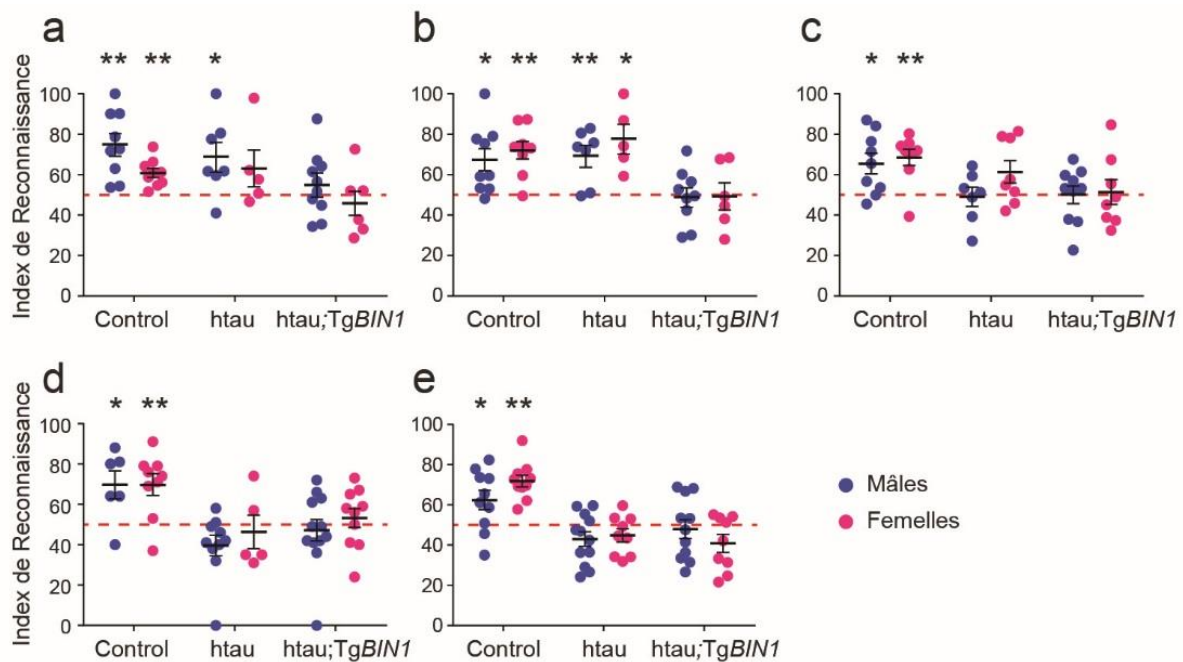
Entre 6 et 9 mois, nous avons observé une diminution de l'activité locomotrice des animaux contrôles mâles et femelles de respectivement 15,9% et 11%. Cependant, nous avons constaté un regain d'activité, entre ces deux âges, chez les mâles htau et htau;TgBIN1 de respectivement +1,2% et +18,2%. Cette hausse a également été observée chez les femelles htau (+30%) et htau;TgBIN1 (+18%).

Alors que ce regain est plus ou moins stabilisé chez les femelles entre 9 et 15 mois, nous pouvons observer chez les mâles htau une nouvelle hausse de l'activité locomotrice de 31,5% entre 9 et 12 mois. Ainsi il apparaît que les mâles htau et htau;TgBIN1 présentent une hyperactivité locomotrice entre 9 et 12 mois avant stabilisation. Nous avons noté que les contrôles mâles présentent une activité locomotrice en constante décroissance jusqu'à l'âge de 12 mois.

#### 1. b. Déficit de reconnaissance d'objet

Le test de reconnaissance d'objet, effectué avec une heure de rétention entre la phase de présentation et la phase de rappel, a été réalisé 24 heures après la présentation de l'environnement du champ ouvert (**Figure 43**). Quel que soit l'âge considéré, il est intéressant de noter l'absence d'effet de la délétion hétérozygote du gène *Mapt* puisque tous les animaux contrôles mâles et femelles sont en mesure de discriminer le nouvel objet de l'objet familier. Cependant, si les animaux mâles et femelles htau ne sont plus en mesure d'effectuer cette reconnaissance dès l'âge de 9 mois ce phénotype est exacerbé par la présence du gène *BIN1* avec un déficit précoce retrouvé à l'âge de 3 mois, indépendamment du sexe considéré.

Nous avons noté l'absence d'une préférence d'objet ou de place à tous les âges quel que soit le génotype considéré (**Figure S 6**).



**Figure 43 : Index de reconnaissance chez les souris htau;TgBIN1 âgées de 3 (A), 6 (B), 9 (C), 12 (D), 15 mois (E).** Les mâles ont été représentés en bleu et les femelles en rose. La ligne rouge discontinue représente un index de 50% pour lequel aucune préférence ne peut être visualisée. Les données, représentées avec la moyenne  $\pm$  SEM, ont été analysées avec le «one-simple t-test» car elles suivent une loi normale selon le test de Shapiro-Wilk. \* p < 0,05

### 1. c. Mémoire spatiale

Le test de la mémoire spatiale en piscine de Morris a été effectué tous les 3 mois dès l'âge de 6 mois. Ce test permet de déterminer l'intégrité d'une forme de mémoire à long terme. Cependant, les données relatives à ce test effectué à 6 mois ne sont pas présentées dans ce manuscrit. En effet, des événements extérieurs<sup>1</sup> nous empêchent d'exploiter les résultats obtenus. Il est tout de même important de mentionner la réalisation de ce test puisque la sollicitation cognitive est une donnée à considérer dans l'établissement des maladies neurodégénératives.

#### c. i. Résultats à 9 mois

Durant la phase d'apprentissage effectuée sur une période de six jours consécutifs, nous avons observé chez tous les groupes une diminution du temps et de la distance nécessaire pour localiser la plateforme. Ces résultats indiquent une capacité des animaux à mémoriser la localisation de la plateforme. Cette dernière était située à la même position qu'à l'âge de 6

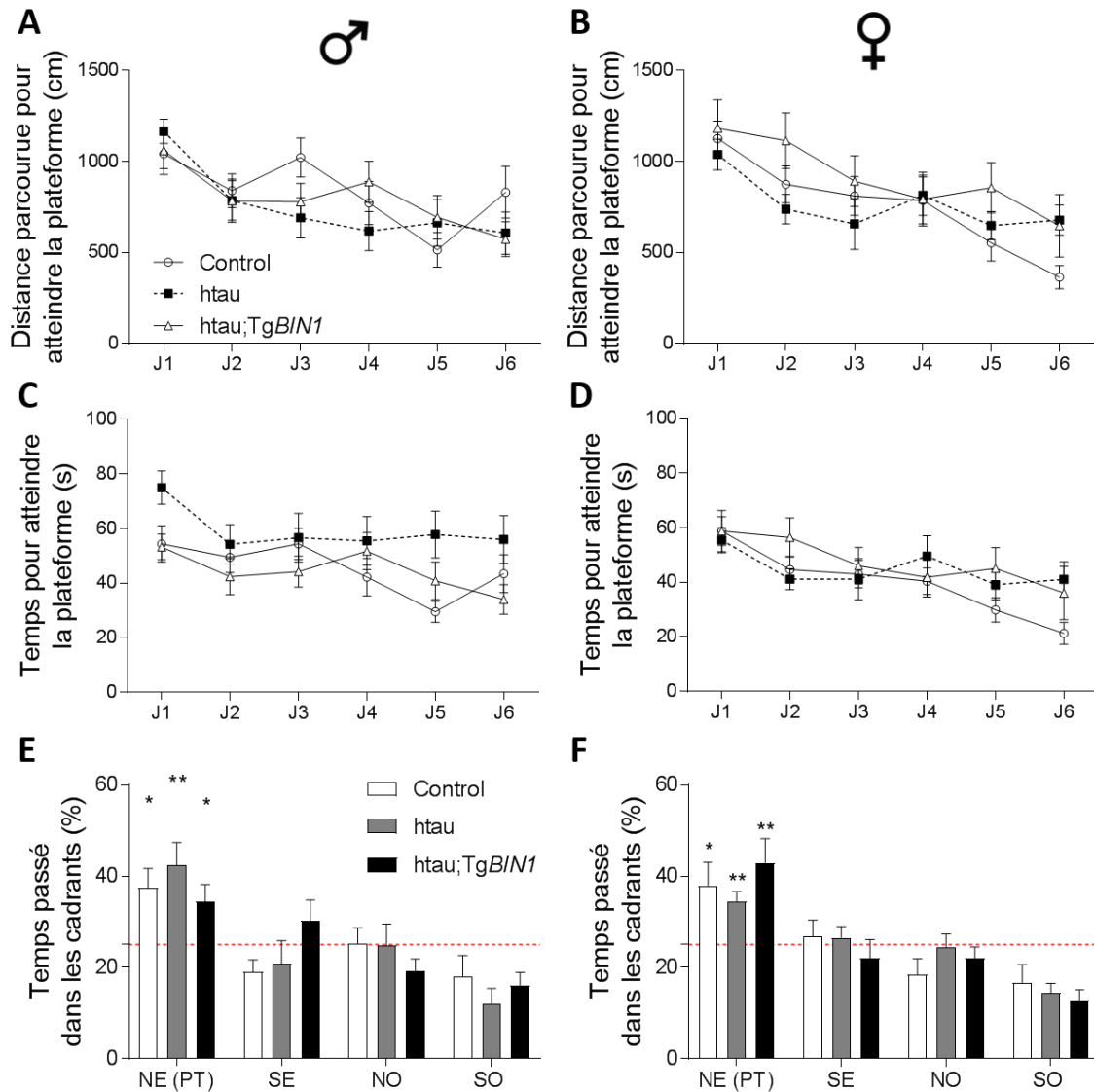
<sup>1</sup> Travaux sonores non prévus à l'étage supérieur

mois, dans le quadrant Nord-Est (**Figure 44A-D**). Le septième jour, soit 24 heures après la dernière session d'apprentissage, les animaux sont soumis au test de rappel durant lequel la plateforme a été retirée. Les animaux disposent alors de 60 secondes pour nager librement dans l'enceinte. Les résultats de ce test sont représentés en termes de pourcentage de temps passé dans les différents quadrants. Nous pouvons constater qu'à l'âge de 9 mois, tous les animaux mâles et femelles sont en mesure de passer une proportion de temps dans le quadrant cible significativement supérieure au hasard (**Figure 44E-F**). Dans l'analyse des données, nous considérons que ce test est un test en go/no-go (présence de performance supérieur à 25% ou non). Cela signifie que nous n'analyserons pas les données en comparant les performances des groupes entre eux mais uniquement par rapport au hasard (25%). Dès lors, on peut considérer qu'à l'âge de 9 mois l'ensemble des animaux présente un effet plafond de performance. Ainsi, seule une diminution de ces performances pourrait se produire à l'avenir.

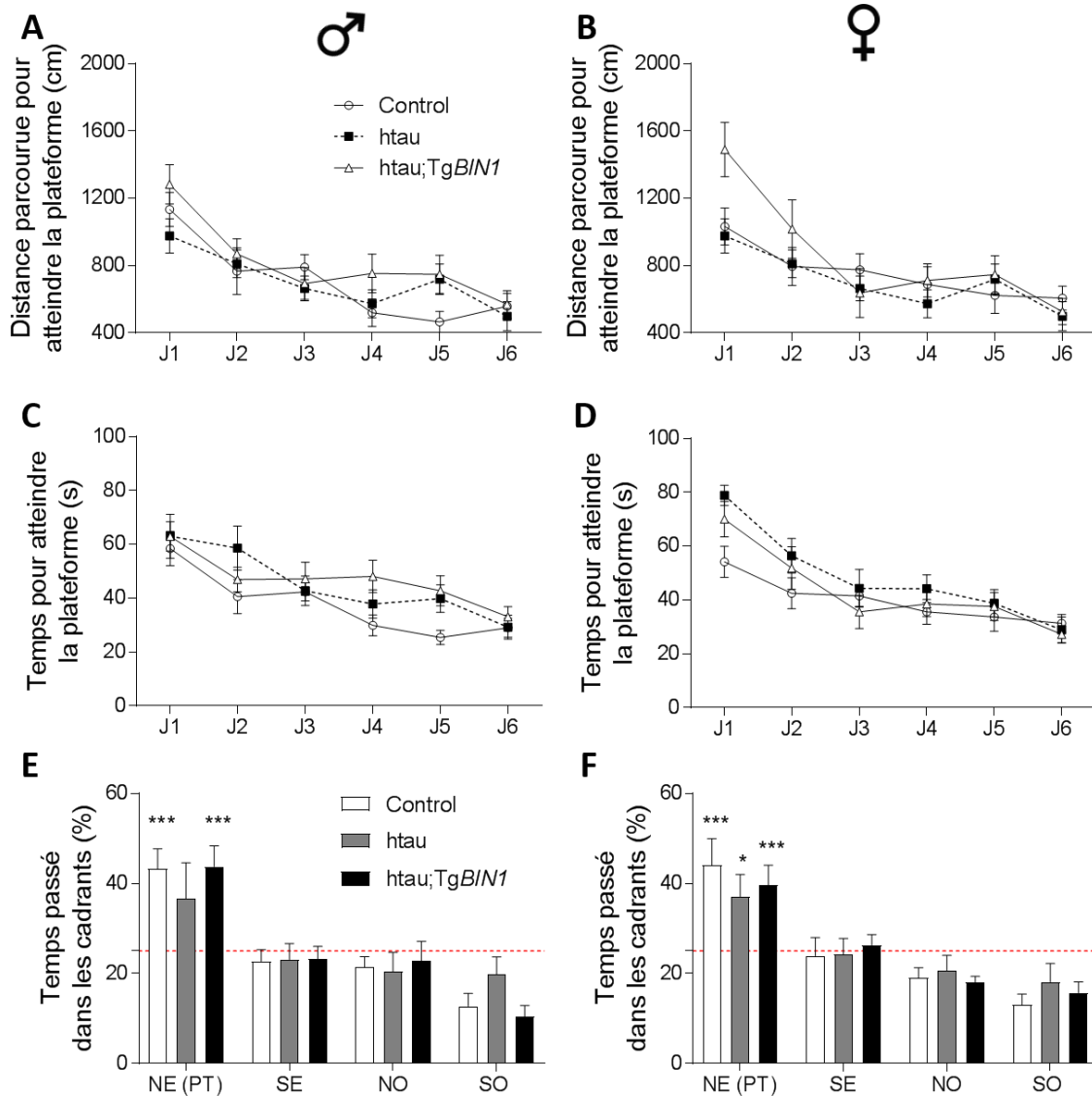
*c. ii. Résultats à 12 mois*

Comme précédemment, nous avons observé durant la phase d'apprentissage une capacité des animaux à décroître le temps et la distance nécessaire pour localiser la plateforme située à la même position qu'à l'âge de 6 et 9 mois. Ce résultat est retrouvé chez tous les groupes indépendamment du sexe considéré, indiquant que tous les groupes apprennent la position de la plateforme situé en Nord-Est (**Figure 45A-D**).

Nous avons constaté lors du test de rappel que les mâles contrôles et htau;TgBIN1 sont en mesure de passer une proportion de temps dans le quadrant cible (Nord-Est) significativement supérieure au hasard (**Figure 45E**). Néanmoins, cette capacité de rappel de l'emplacement de la plateforme n'a pas été retrouvée chez les animaux htau. Nous avons également remarqué que les mêmes résultats ont été obtenus chez les femelles (**Figure 45F**). Ainsi, seules les femelles contrôles et htau;TgBIN1, contrairement aux femelles htau, sont en mesure de rappeler l'emplacement de la plateforme.



**Figure 44 : Impact de la surexpression de *BIN1* sur la mémoire spatiale chez les souris *htau;TgBIN1* à l'âge de 9 mois.** Distance parcourue par les mâles (A) et les femelles (B) ainsi que le temps (C et D respectivement) nécessaire pour atteindre la plateforme (PT) située au quadrant Nord-Est (NE), durant la phase d'apprentissage. Pourcentage du temps passé dans les différents cadrants de la piscine chez les mâles (E) et les femelles (F) lors du test de rappel. La ligne rouge discontinue représente un pourcentage de 25% pour lequel aucune préférence ne peut être visualisée. Les données (moyennés ± SEM) suivent une loi normale selon le test de Shapiro-Wilk. L'analyse des différences entre les jours pour chaque groupe est déterminée par une ANOVA à mesures répétées pour s'assurer d'un effet du temps sur la distance parcourue et le temps. Un « one simple t-test » pour le pourcentage de temps passé. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$



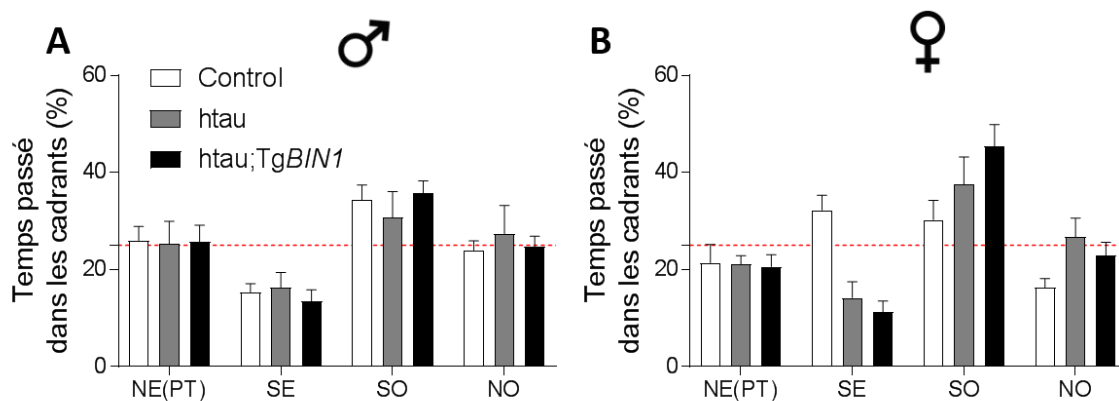
**Figure 45 : Impact de la surexpression de *BIN1* sur la mémoire spatiale chez les souris *htau;TgBIN1* à l'âge de 12 mois.** Distance parcourue par les mâles (A) et les femelles (B) ainsi que le temps (C et D respectivement) nécessaire pour atteindre la plateforme (PT) située au quadrant Nord-Est (NE), durant la phase d'apprentissage. Pourcentage du temps passé dans les différents cadrants de la piscine chez les mâles (E) et les femelles (F) lors du test de rappel. La ligne rouge discontinue représente un pourcentage de 25% pour lequel aucune préférence ne peut être visualisée. Les données (moyennés ± SEM) suivent une loi normale selon le test de Shapiro-Wilk. L'analyse des différences entre les jours pour chaque groupe est déterminée par une ANOVA à mesures répétées pour s'assurer d'un effet du temps sur la distance parcourue et le temps. Un « one simple t-test » pour le pourcentage de temps passé

*c. iii. Résultats à 15 mois*

À 15 mois, les animaux ont été soumis à un test de rappel à long terme, soit 3 mois, avant une nouvelle session d'apprentissage. Nous avons constaté qu'aucun groupe n'est en mesure de



passer un temps supérieur au hasard dans le quadrant Nord-Est dans lequel la plateforme était située à 12 mois (**Figure 46A-B**).



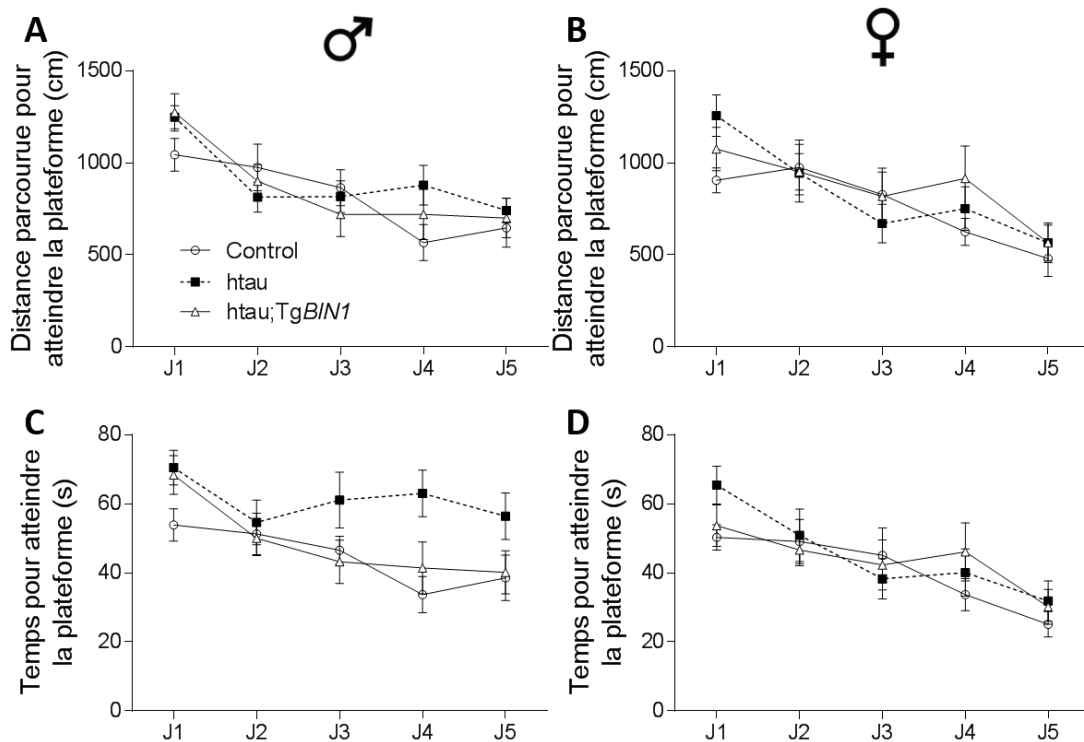
**Figure 46 : Rappel de la mémoire spatiale à très long terme chez les souris htau;TgBIN1 à l'âge de 15 mois.** Pourcentage du temps passé dans les différents quadrants de la piscine chez les mâles (A) et les femelles (B) lors du test de rappel avant la phase d'apprentissage. La ligne rouge discontinue représente un pourcentage de 25% pour lequel aucune préférence ne peut être visualisée. Les données (moyennés  $\pm$  SEM) suivent une loi normale selon le test de Shapiro-Wilk. Un « one simple t-test » pour le pourcentage de temps passé

Durant l'apprentissage, l'ensemble des animaux est en mesure de décroître la distance et le temps nécessaire à la localisation de la plateforme située au Sud-Ouest, ce qui indique leur apprentissage du nouvel emplacement de la plateforme (**Figure47A-B**). Les résultats obtenus durant la phase de rappel chez les mâles sont identiques à ceux observés à l'âge de 12 mois. Ainsi, seuls les animaux contrôles et htau;TgBIN1 sont en mesure de passer un temps significativement supérieur au hasard dans le quadrant cible, ce qui indique un rappel de l'emplacement supposé de la plateforme.

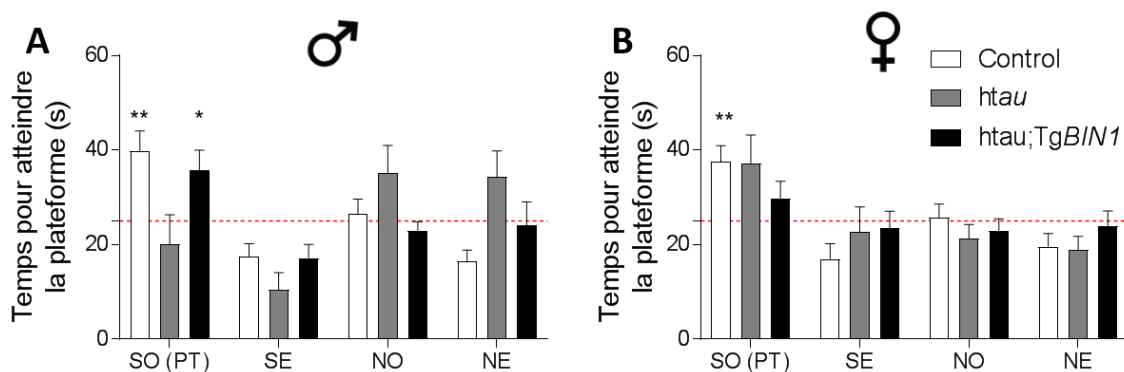
Les résultats obtenus à cet âge chez les femelles indiquent quant à eux une détérioration des capacités cognitives au sein du groupe htau;TgBIN1 (**Figure 48A-D**). En effet à cet âge, seul le groupe contrôle est en mesure de rappeler l'emplacement de la plateforme. Les groupes htau et htau;TgBIN1 ne présentent quant à eux pas de préférence pour le quadrant cible, suggérant un oubli de l'emplacement.

Enfin, nous pouvons nous assurer que l'ensemble des génotypes mâles et femelles ne présentent pas de défauts locomoteurs ou visuels à l'aide du test de la plateforme indiquée. En effet, 24 heures après le test de rappel, l'ensemble des animaux a été replacé dans la piscine où une plateforme était indiquée à l'aide d'un drapeau. La plateforme indiquée se trouvait successivement dans un des quadrants qui n'ont pas été utilisés durant l'apprentissage. La

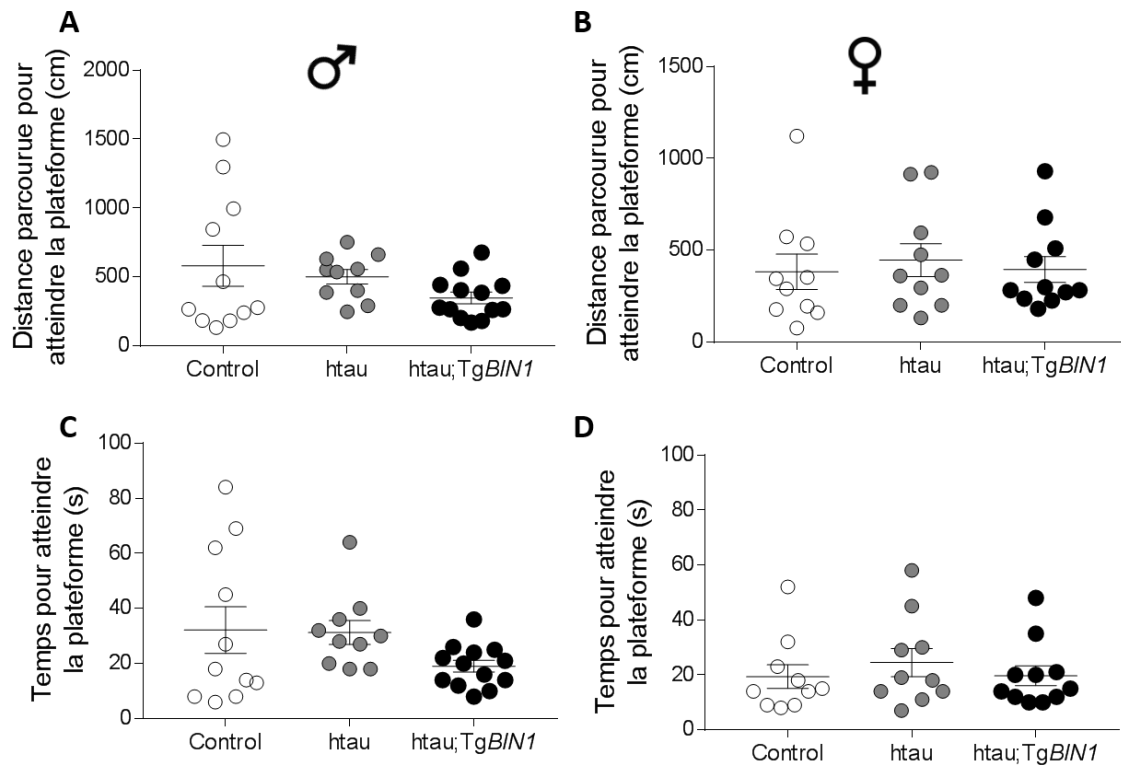
distance et le temps calculés sur la moyenne des trois essais sont similaires entre les différents groupes (Figure 49A-D).



**Figure 47 : Apprentissage de la mémoire spatiale chez les souris htau;TgBIN1 à l'âge de 15 mois.** Distance parcourue par les mâles (A) et les femelles (B) ainsi que le temps (C et D respectivement) nécessaire pour atteindre la plateforme (PT) située au quadrant Nord-Est (NE), durant la phase d'apprentissage. La ligne rouge discontinue représente un pourcentage de 25% pour lequel aucune préférence ne peut être visualisée. Les données (moyennés ± SEM) suivent une loi normale selon le test de Shapiro-Wilk. L'analyse des différences entre les jours pour chaque groupe est déterminée par une ANOVA à mesures répétées pour s'assurer d'un effet du temps sur la distance parcourue et le temps. Un « one simple t-test » pour le pourcentage de temps passé



**Figure 48 : Rappel de la mémoire à long terme, 24h après la dernière session d'apprentissage chez les souris htau;TgBIN1.** Pourcentage du temps passé dans les différents quadrants de la piscine chez les mâles (A) et les femelles (B). La ligne rouge discontinue représente un pourcentage de 25% pour lequel aucune préférence ne peut être visualisée. Les données (moyennés ± SEM) suivent une loi normale selon le test de Shapiro-Wilk ont été analysées avec le «one-simple t-test». \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

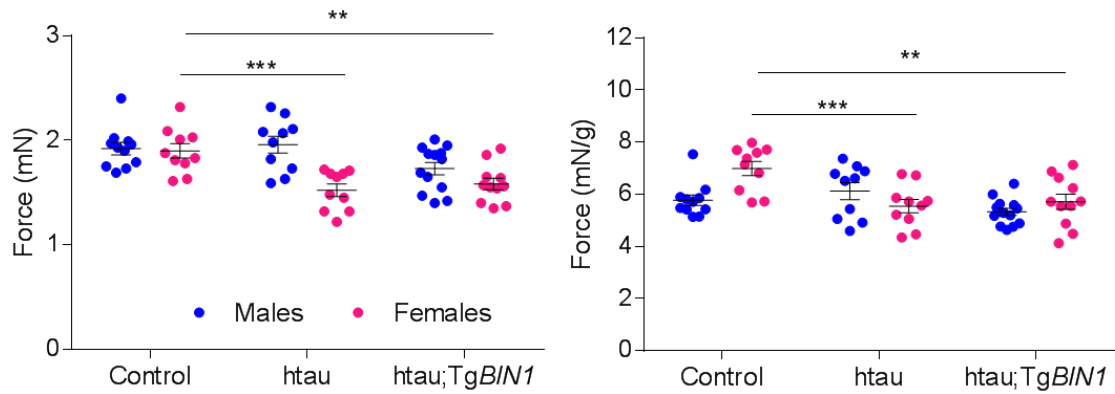


**Figure 49 : Test visuo-locomoteur en piscine de Morris chez les souris htau;TgBIN1, 24h après le test de rappel.** Pendant le test, les trois autres positions (SE, NE et NO) qui n'ont pas été utilisées précédemment pour l'apprentissage à 15 mois, ont été indiquées avec un drapeau. Ceci a permis de déterminer la distance (**A et B**) et le temps (**C et D**) nécessaire aux animaux pour atteindre une plateforme visible. Les données (moyennés  $\pm$  SEM) suivent une loi normale selon le test de Shapiro-Wilk. L'analyse de la variance à un facteur a été suivie si nécessaire d'un test post hoc de comparaisons multiples de Bonferroni.

## 1. d. Test de coordination et de force musculaire

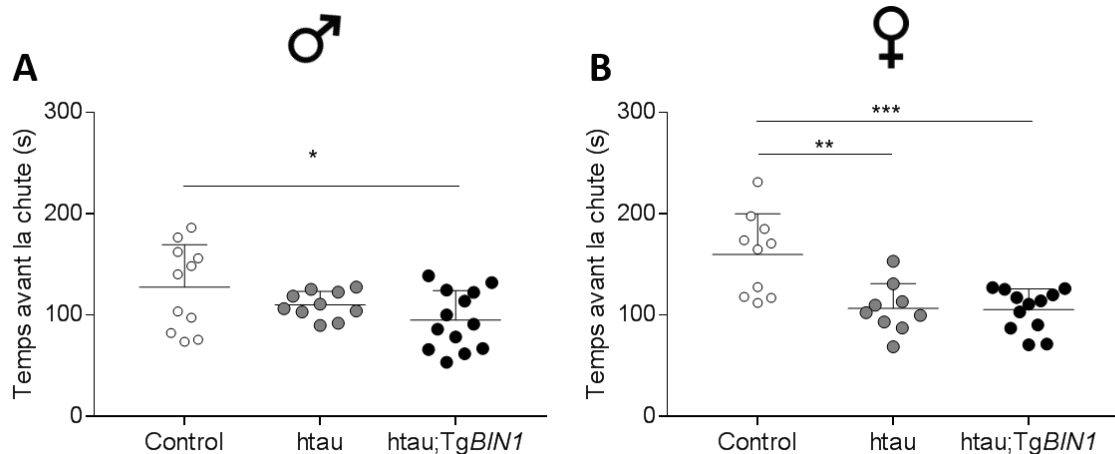
### d. i. Grip test

Afin de déterminer les capacités de force musculaire des différents modèles en fin d'étude comportementale, soit à 15 mois, un test d'accrochement ou *grip test* a été effectué sur les quatre pattes. Nous n'avons pas observé de différence chez les mâles quel que soit leur génotype, en ce qui concerne la force musculaire absolue (**Figure 50A**) ou celle normalisée avec le poids des animaux ( $\approx 6$  mN/g; **Figure 50B**). Néanmoins il apparaît que chez les femelles le génotype a une incidence sur la force musculaire. Alors que le groupe contrôle présente une force normalisée au poids d'environ 7 mN/g, les groupes htau et htau;TgBIN1 montrent une force significativement inférieure d'environ 6 mN/g, une valeur qui est similaire à celles observées chez les mâles.



**Figure 50 : Force musculaire des quatre pattes (grip test) chez les souris htau;TgBIN1 âgées de 15 mois.** Force absolue (A) et la force relative au poids de chaque souris (B) avec les mâles en bleu et les femelles en rose. Les données, moyenne  $\pm$  SEM, ont été analysées avec une ANOVA à deux facteurs (sexe et génotype), suivie si nécessaire d'un test *post hoc* de comparaisons multiples de Tukey pour déterminer les différences entre les génotypes. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

*d. ii. Rotarod*



**Figure 51 : Coordination motrice (rotarod) sans apprentissage chez les souris htau;TgBIN1 âgées de 15 mois.** Temps avant la chute chez les mâles (A) et les femelles (B). Les données, moyenne  $\pm$  SEM, ont été analysées avec une ANOVA à un facteur, suivie si nécessaire d'un test *post hoc* de comparaisons multiples de Bonferroni. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

Le test du rotarod est utilisé afin de déterminer la capacité des animaux à synchroniser leurs quatre pattes et donc de tester leur coordination locomotrice. La vitesse de rotation des rouleaux, sur lesquels courent les souris, accélère avec le temps et nous analysons pendant combien de temps les animaux sont capables de tenir. Ainsi, les mâles htau;TgBIN1 échouent plus vite et montrent donc une capacité amoindrie dans cette tâche que le groupe contrôle (**Figure 51A**). L'étude chez les femelles révèle le même phénomène préalablement observé

avec le *grip test* (**Figure 51B**). En effet, les femelles contrôles présentent une capacité de coordination significativement supérieure à celle enregistrée chez les femelles htau et htau;TgBIN1.

## II. 2. Etude histologique et moléculaire des modèles

Suite à l'étude comportementale, l'ensemble des animaux a été sacrifié à 18 mois afin d'effectuer des expériences de biologie moléculaire et histologique. Seule l'expérience de microscopie électronique a utilisé des animaux dits naïfs, c'est-à-dire des animaux n'ayant jamais effectué de tests comportementaux de leur vie.

Les résultats présentés dans ce manuscrit feront uniquement mention des mâles pour lesquels une restauration de la perte de mémoire spatiale à long terme a été observée lors de la surexpression du gène *BIN1*.

### 2. a. Distribution spatiale de phospho-tau

#### *a. i. Note sur l'anticorps « Tau total » utilisé*

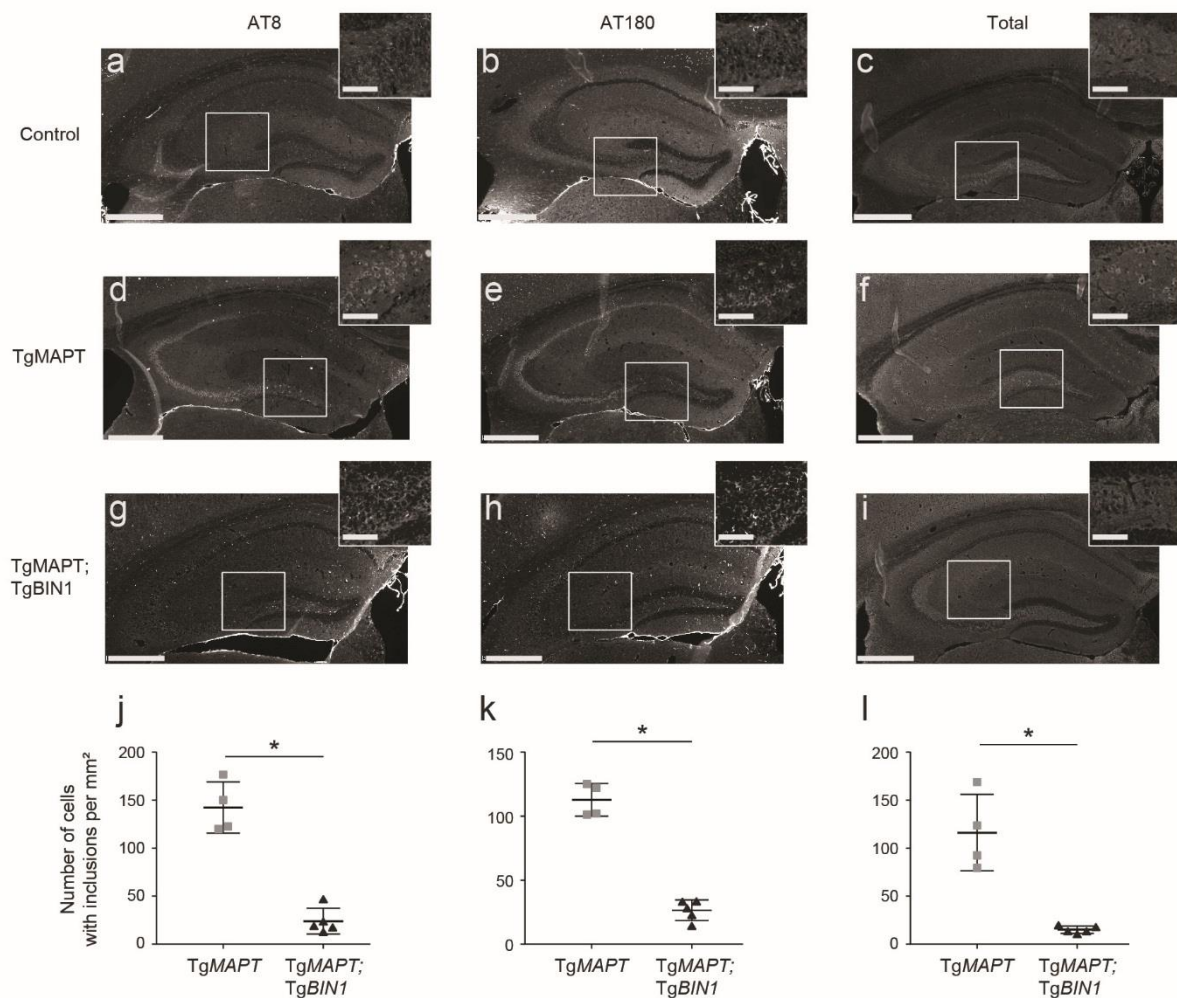
Afin de normaliser le niveau de phosphorylation de Tau avec le niveau total et soluble de cette protéine, nous avons eu recours à un anticorps provenant d'Abcam® clone [E178], différent de l'anticorps Tau-1 précédemment utilisé en laboratoire mais dont le dernier lot s'est révélé de mauvaise qualité. Cet anticorps a également été utilisé dans ces travaux afin d'immunomarquer la localisation de Tau. Abcam® se réserve le droit de conserver pour elle seule la séquence peptidique utilisée dans le développement de cet anticorps pour lequel il n'est pas mentionné de reconnaissance d'un épitope phosphorylé. Les deux premières références, fournis par Abcam®, de cet anticorps mentionne son utilisation dans la même finalité de normalisation en WB et d'immunomarquage ([Wagner et al. 2015](#); [Schmidt et al. 2016](#)). Je dois reconnaître qu'une erreur a été commise de ma part dans la sélection de ce clone, erreur qui a également été faite dans d'autres publications d'ores et déjà acceptées. En effet, il apparait que cet anticorps permet la reconnaissance de la Ser396 sous sa forme phosphorylée ([Yu et al. 2011](#)). Notons que la phosphorylation de ce résidu est retrouvé en condition physiologique ([Sergeant et al. 2008](#)) et également dans les cerveaux de patients Alzheimer ([Simic et al. 2016](#)). Enfin, l'état de phosphorylation de la Ser396 n'a pas d'impact sur la liaison de Tau à BIN1 en PLA sur culture neuronale ([Sottejeau et al. 2015](#)).

*a. ii. Au niveau hippocampique*

Au niveau de l'hippocampe dorsal, le marquage de pTau-396 montre chez les animaux contrôles une distribution axonale de cette protéine (**Figure 52A**). Cette observation est visible de manière prépondérante dans les fibres de projections issues du gyrus denté vers la CA3. Cette distribution se retrouve complètement perturbée dans le modèle htau, pour lequel nous observons une relocalisation de la protéine Tau dans le soma (**Figure 52B**), et ceci pour tous les niveaux anatomiques de l'hippocampe (hîle du gyrus denté, CA3, CA2 et CA1). De manière surprenante, ce phénotype n'a pas été retrouvé chez les animaux htau;TgBIN1 (**Figure 52C**). Ainsi, ce dernier groupe présente une distribution cellulaire de Tau similaire à celle observée chez les contrôles, avec un marquage prépondérant au niveau axonal et une faible présence de cellules dont le marquage est somatique. La quantification du nombre de cellules présentant ces inclusions somatiques a été réalisée chez les animaux htau et htau;TgBIN1 (**Figure 52D**). Nous avons sciemment omis la quantification de ce marqueur chez les animaux contrôles qui ne présentaient pas ce phénotype afin d'alléger le niveau de comparaison. Nous avons pu alors déterminer que la surexpression du gène *BIN1* est en mesure de réduire de plus de 92% le nombre de cellules présentant ces inclusions.

Par la suite nous avons testé un duo d'anticorps spécifiques des sites phosphorylés de Tau au niveau de la Ser202 et de la Thr205 (AT8) ainsi que de la Thr231 (AT180). Le marquage de ces formes phosphorylées ne montre aucun signal dans le groupe contrôle (**Figure 52E et I**). Ce marquage est trouvé de manière abondante dans le groupe htau pour lequel un marquage somatique (inclusion intracellulaire) a de nouveau été identifié (**Figure 52F et J**).

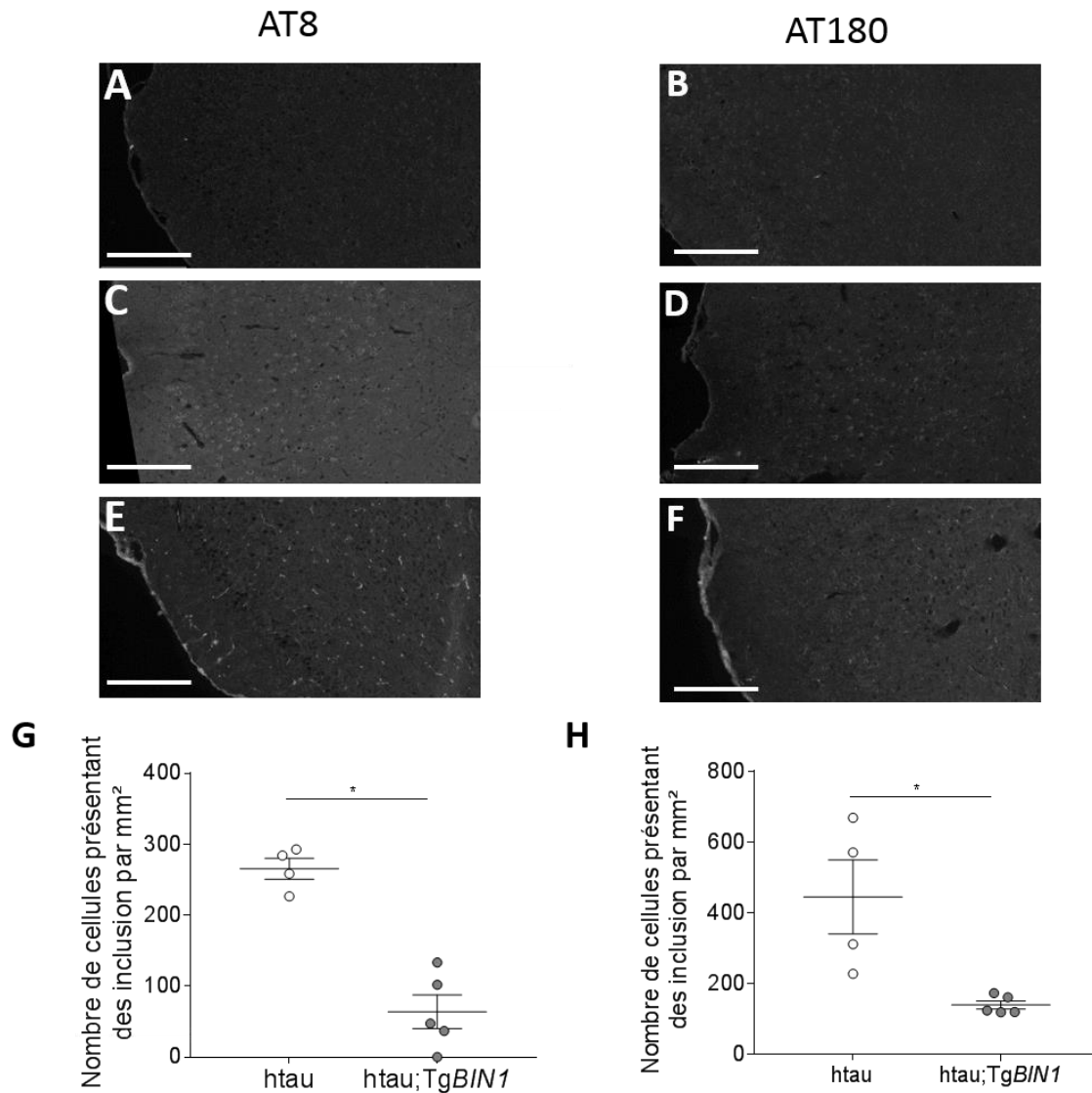
De la même manière que précédemment, la surexpression du gène *BIN1* dans le modèle htau;TgBIN1 est en mesure de diminuer le nombre de cellules présentant des inclusions (**Figure 52G et K**). Ainsi nous avons constaté une diminution du nombre de cellules présentant des inclusions identifiées avec les anticorps AT8 et AT180 de 83% et 77% respectivement (**Figure 52H et L**).



**Figure 52 : localisation de Tau dans l'hippocampe chez les souris htau;TgBIN1 âgées de 18 mois.** Photographies représentatives des animaux contrôles (A, E et I), des animaux htau (B, F et J) et des animaux htau; TgBIN1 (C, G, et K) avec un agrandissement du hile dans l'encart en haut à droite. Nombre de cellules présentant des inclusions somatiques de Tau, normalisé par rapport à la surface en mm<sup>2</sup> de l'hippocampe chez les animaux htau et htau;TgBIN1 avec l'anticorps Tau C-ter (D) AT8 (H), AT180 (L). Les données, moyenne ± SEM, ont été analysées avec le test non paramétrique de Mann-Whitney. \* p < 0,05. Echelle = 500 µm, échelle agrandissement = 100µm

*a. iii. Au niveau du cortex périrhinal*

L'immunomarquage des formes phosphorylées de Tau (AT8 et AT180) du cortex périrhinal révèle des données similaires à celles préalablement observées dans l'hippocampe. Ainsi, alors qu'aucune inclusion intracellulaire n'a été observée dans le groupe contrôle pour ces deux marqueurs (**Figure 53A-B**), ces inclusions sont retrouvées dans le groupe htau (**Figure 53C-D**). Le groupe htau;TgBIN1 présente quant à lui une diminution de 76% du nombre de cellules avec inclusions révélées avec l'anticorps AT8 (**Figure 53E-G**) et de 69% avec l'anticorps AT180 par rapport au groupe TgMAPT (**Figure 53G-H**).



**Figure 53 : localisation de Tau dans le cortex périrhinal chez les souris htau;TgBIN1 âgées de 18 mois.** Photographies représentatives des animaux contrôles (A, E et I), des animaux htau (B, F et J) et des animaux htau; TgBIN1 (C, G, et K). Nombre de cellules présentant des inclusions somatiques de Tau, normalisé par rapport à la surface en mm<sup>2</sup> du cortex périrhinal chez les animaux htau et htau;TgBIN1 avec l'anticorps Tau C-ter (D) AT8 (H), AT180 (L). Les données, moyenne  $\pm$  SEM, ont été analysées avec le test non paramétrique de Mann-Whitney. Seuil  $\alpha < 0,05$ . Echelle = 250  $\mu$ m

*a. iv. Contrôles négatifs*

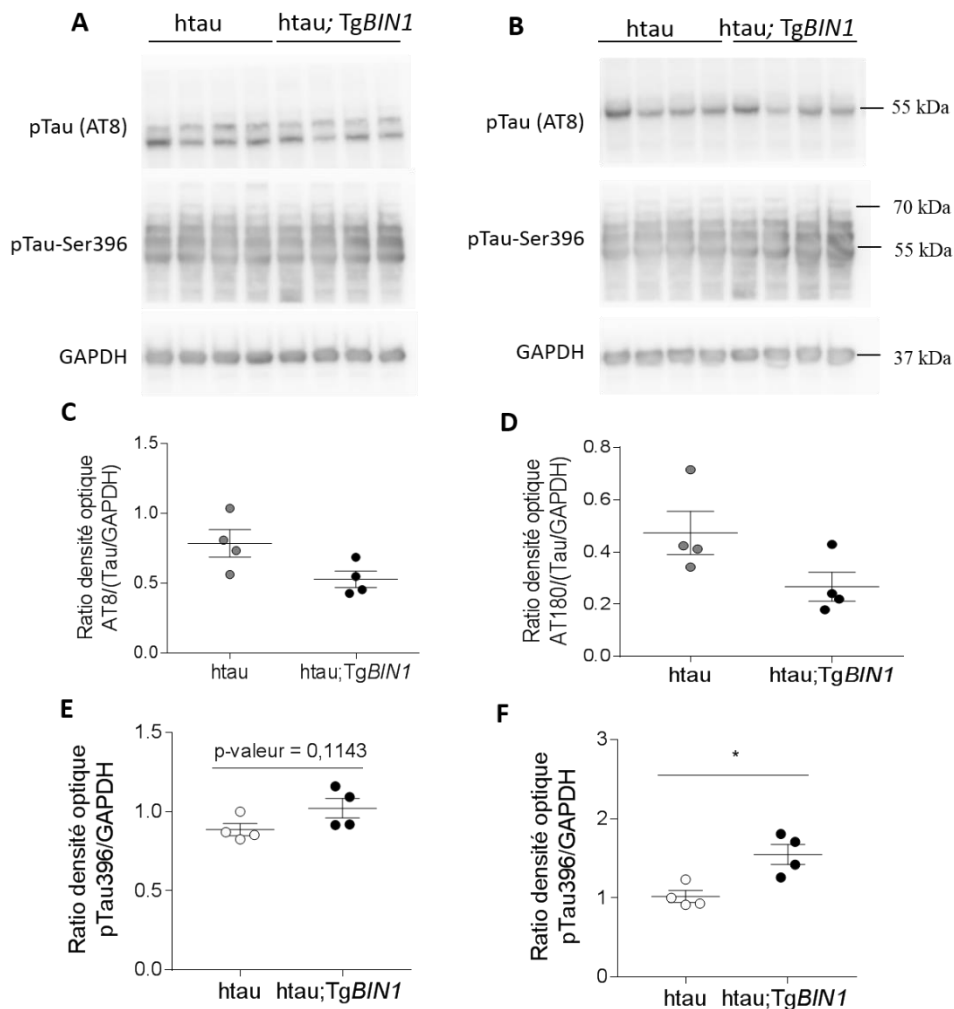
Les anticorps ciblant les formes phosphorylées de Tau (AT8 et AT180) proviennent de l'espèce *Mus musculus*. Nous avons donc réalisé des immunofluorescences en utilisant uniquement l'anticorps secondaire (anti-souris) qui a servi de contrôle négatif. Ces contrôles ont été réalisés pour chaque animal et à chaque expérience. Nous avons observé l'absence de cellules présentant les inclusions intracellulaires préalablement décrites (**Figure S 6A-C**). Nous avons



tout de même constaté un bruit de fond qui se différencie parfaitement des inclusions et qui pourrait correspondre aux marquages de vaisseaux sanguins.

### 2. b. Niveau d'expression de certaines formes solubles de Tau

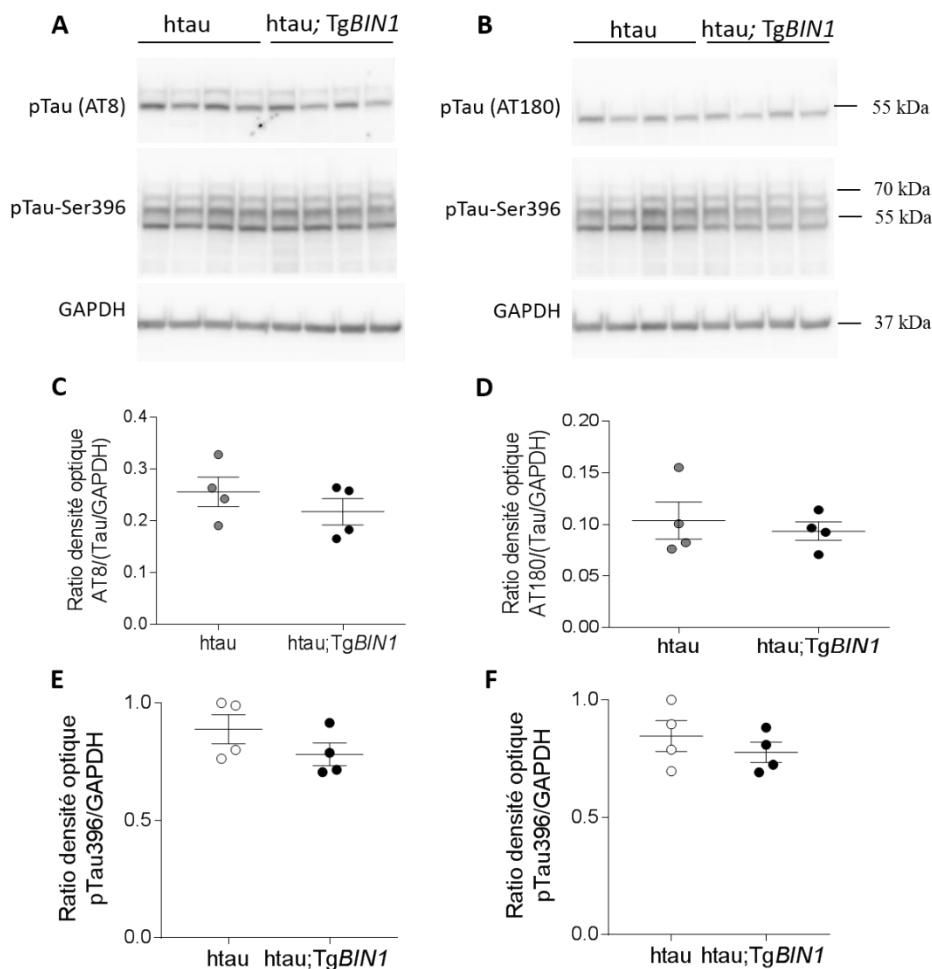
Afin de déterminer si le niveau d'expression de BIN1 peut influencer le niveau de phosphorylation de la protéine Tau humaine, nous avons conduit des WB à partir d'extraits d'hippocampe et de cortex temporal.



**Figure 54 : Quantification de phospho-tau soluble au niveau de l'hippocampe chez les souris htaiu;TgBIN1 âgées de 18 mois.** Membranes des WB révélant le marqueur phospho-tau à l'aide de l'anticorps AT8 (A) ou AT180 (B). Les marqueurs de phospho-tau, de tau et de la GAPDH ont été révélés sur la même membrane. La quantification du niveau de phosphorylation des sites AT8 (C) et AT180 (D) a été rapportée au niveau de pTau-296 et préalablement normalisée au niveau de la GAPDH. La quantification du niveau de Tau soluble des deux membranes respectives (E et F) a été normalisée à la GAPDH. Les données, moyenne  $\pm$  SEM, ont été analysées avec un test de Mann-Whitney. Seuil  $\alpha < 0,05$

Le niveau de phosphorylation de Tau soluble dans l'hippocampe, déterminé avec les anticorps AT8 et AT180, ainsi que le niveau de pTau-396 ne sont pas différents entre les animaux htau et htau;TgBIN1 (**Figure 54A-F**).

De la même manière, le niveau de phosphorylation de Tau soluble dans le cortex temporal, déterminé avec les anticorps AT8 et AT180, n'est pas différent entre les animaux htau et htau;TgBIN1 (**Figure 55A-D**). Cependant dans l'une des deux membranes, nous avons constaté une augmentation significative de l'expression de pTau-396 au niveau du cortex temporal chez les animaux htau;TgBIN1 par rapport aux animaux htau (**Figure 55F**). Dans la deuxième, aucune variation n'a été observée (p-valeur associée de 0,1143 ; **Figure 55E**).

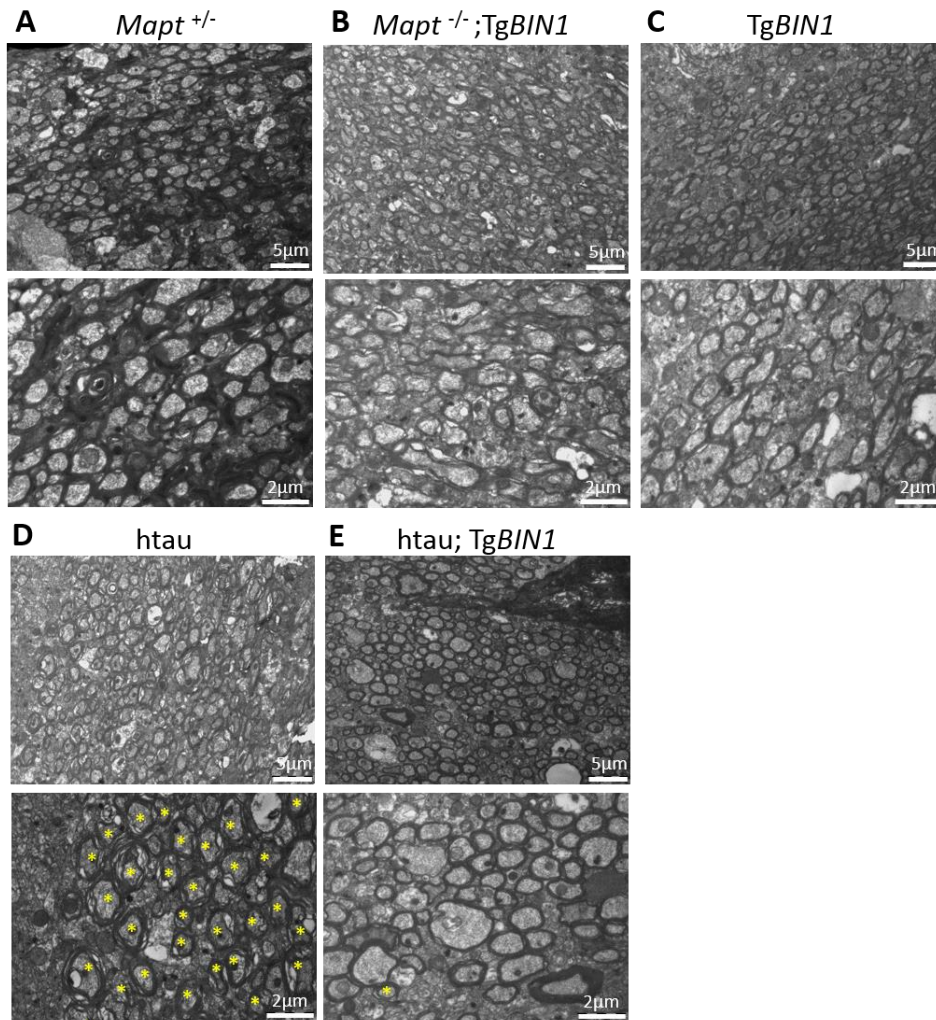


**Figure 55 : Quantification de phospho-tau soluble au niveau du cortex temporal chez les souris htau;TgBIN1 âgées de 18 mois.** Membranes des WB révélant le marqueur phospho-tau à l'aide de l'anticorps AT8 (A) ou AT180 (B). Les marqueurs de phospho-tau, de tau et de la GAPDH ont été révélés sur la même membrane. La quantification du niveau de phosphorylation des sites AT8 (C) et AT180 (D) a été rapportée au niveau de pTau-296 et préalablement normalisée au niveau de la GAPDH. La quantification du niveau de Tau soluble des deux membranes respectives (E et F) a été normalisée à la GAPDH. Les données, moyenne  $\pm$  SEM, ont été analysées avec un test de Mann-Whitney. \*  $p < 0,05$

## 2. c. Microscopie électronique

Nous avons étudié des anomalies structurelles par microscopie électronique au niveau du fornix et de l'hippocampe. Des animaux naïfs de 18 mois ont été utilisés avec les génotypes suivants :

- Un groupe contrôle (n=2 ; *Mapt*<sup>+/-</sup>)
- Un groupe contrôle homozygote *Mapt*;Tg*BIN1* (n=1; *Mapt*<sup>-/-</sup>;Tg*BIN1*)
- Un groupe contrôle Tg*BIN1* (n=1 ; *Mapt*<sup>+/+</sup>;Tg*BIN1*)
- Un groupe htau (n=2 ; *Mapt*<sup>-/-</sup>;TgMAPT)
- Un groupe htau;Tg*BIN1*(n=2 ; *Mapt*<sup>-/-</sup>;TgMAPT;Tg*BIN1*).



**Figure 56 : Anomalies structurelles par microscopie électronique au niveau du fornix chez les groupes contrôles *Mapt*<sup>+/-</sup> (A), *Mapt*<sup>-/-</sup>;Tg*BIN1* (B) et Tg*BIN1* (C) et les groupes htau (D) et htau;Tg*BIN1* (E) à 18 mois. Le panel du bas représente des agrandissements de celui du haut. Les étoiles jaunes représentent des anomalies dans la gaine de myéline. Echelle=5µm. Echelle zoom=2µm**

*c. i. Fornix*

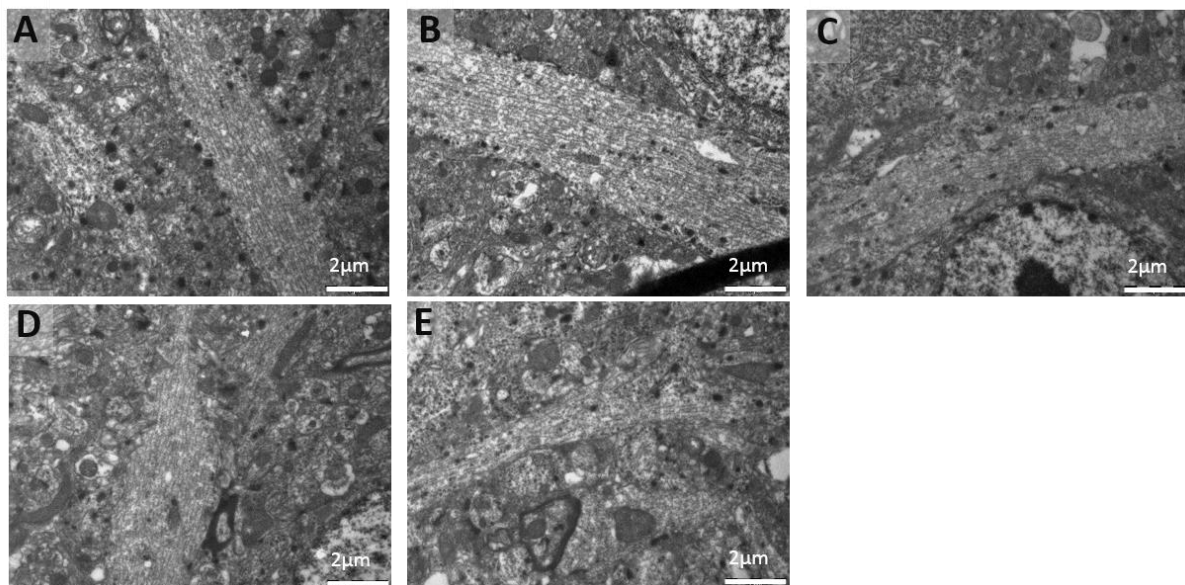
La région du fornix ne montre pas d'anomalies chez les différents groupes contrôles (*Mapt*<sup>+/-</sup>, *Mapt*<sup>-/-</sup>;Tg*BIN1* et Tg*BIN1* ; **Figure 56A, B et C**). Cependant nous avons observé une nette détérioration de l'organisation des feuillets de myéline des deux animaux htau (**Figure 56D**). En effet, la quasi-totalité des axones de cette région présentent des gaines de myéline déroulées en anneaux non compacte.

De manière surprenante, il apparaît que la surexpression de *BIN1* dans le modèle de tauopathie (htau;Tg*BIN1*) entraîne un retour à la normale de ce phénotype (**Figure 56E**). En effet, une quasi absence d'axones présentant une gaine de myéline détériorée chez les deux animaux htau;Tg*BIN1* étudiés a été constatée.

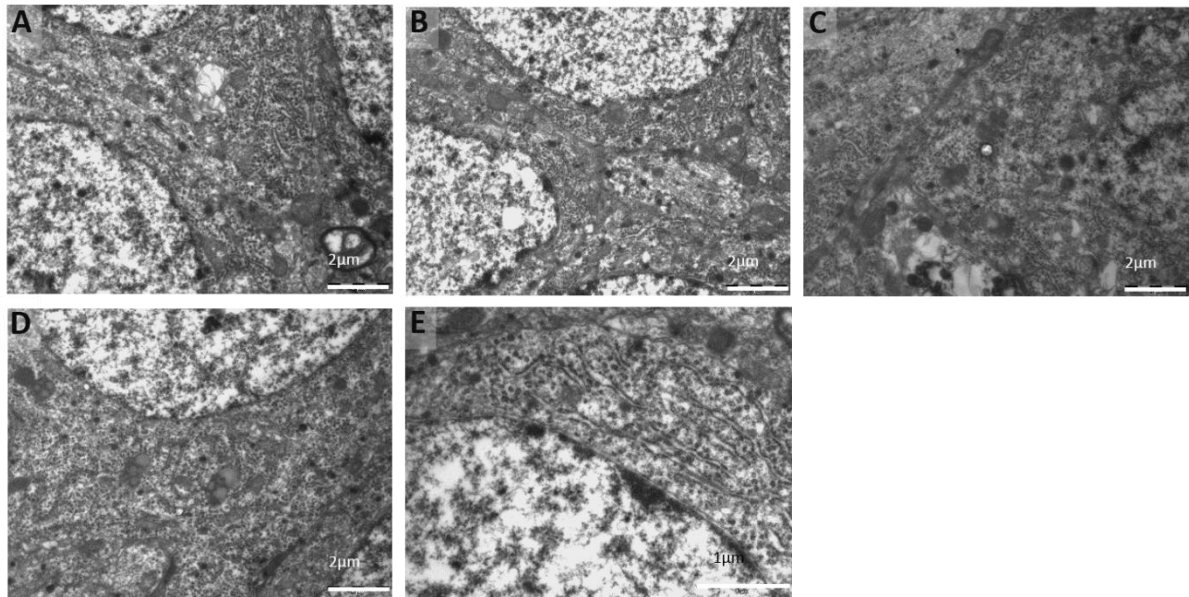
*c. ii. Hippocampe*

Les images des segments proximaux des axones de la CA1 dorsale ne révèlent pas de phénotype particulier quel que soit le génotype considéré. Ainsi, l'ensemble des animaux présentent une ultrastructure normale des RMT (**Figure57**).

Au niveau des corps cellulaires des neurones de la CA1 dorsale, nous n'avons pas constaté de phénotype particulier quel que soit le génotype considéré. Par ailleurs, aucune anomalie du réticulum endoplasmique n'a été observée chez l'ensemble des animaux (**Figure58**).



**Figure 57** : Ultra-structures des axones proximaux par microscopie électronique au niveau de la CA1 chez les groupes contrôles *Mapt*<sup>+/-</sup> (A), *Mapt*<sup>-/-</sup>;Tg*BIN1* (B) et Tg*BIN1* (C) et les groupes htau (D) et htau;Tg*BIN1* (E) à 18 mois. Echelle=2µm

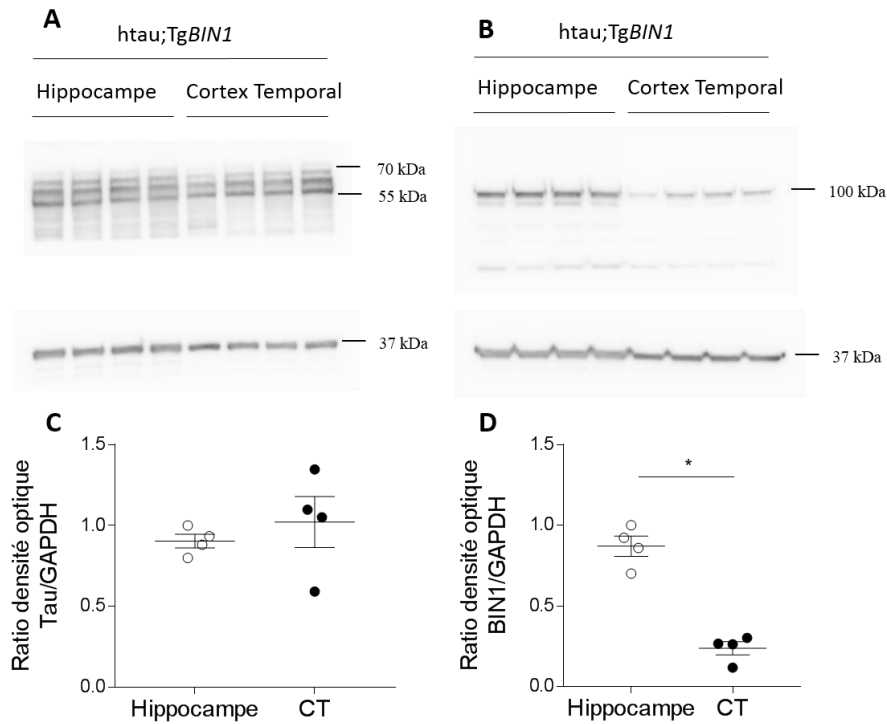


**Figure 58 : Ultra-structures des corps cellulaires par microscopie électronique au niveau de la CA1 chez les groupes contrôles *Mapt*<sup>+/-</sup> (A), *Mapt*<sup>-/-</sup>;*TgBIN1* (B) et *TgBIN1* (C) et les groupes htau (D) et htau;*TgBIN1*(E) à 18 mois. Echelle=2µm**

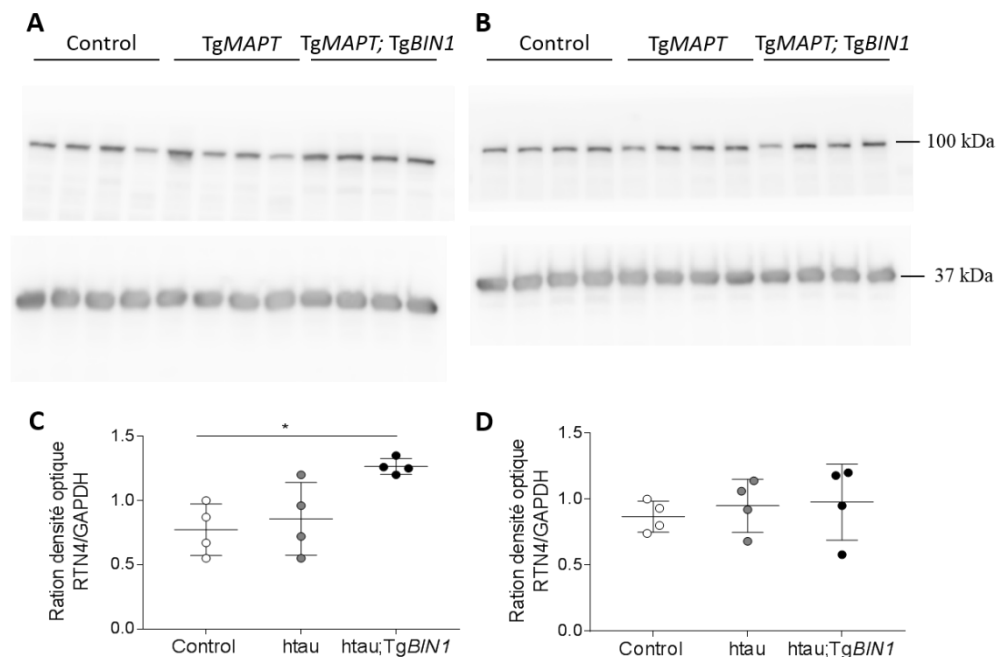
#### 2. d. Variation d'expression protéique entre l'hippocampe et le cortex périrhinal

Le niveau d'expression de pTau-396 humain dans le modèle htau;*TgBIN1* ne montre pas de variation entre les extraits d'hippocampe et de cortex temporal provenant des mêmes animaux (**Figure 59A et C**). Ce résultat est en opposition avec la quantification de BIN1, pour laquelle nous observons une plus forte expression des isoformes cérébrales dans l'hippocampe que dans le cortex temporal (**Figure 59B et D**).

Un niveau d'expression de RTN4-A significativement plus élevé a été détecté dans l'hippocampe des animaux htau;*TgBIN1* par rapport aux animaux contrôles et htau (**Figure 60A et C**). Néanmoins cette hausse n'a pas été retrouvée dans le cortex temporal (**Figure 60B et D**).



**Figure 59 : Variation de l'expression des protéines Tau (A) et BIN1 (B) dans l'hippocampe et le cortex temporal chez les mêmes souris htau;TgBIN1 âgées de 18 mois.** Quantification des protéines Tau (C) et BIN1 (D) par rapport au niveau respectif de la GAPDH de chaque échantillon. Les données, moyenne  $\pm$  SEM, ont été analysées avec un test de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$



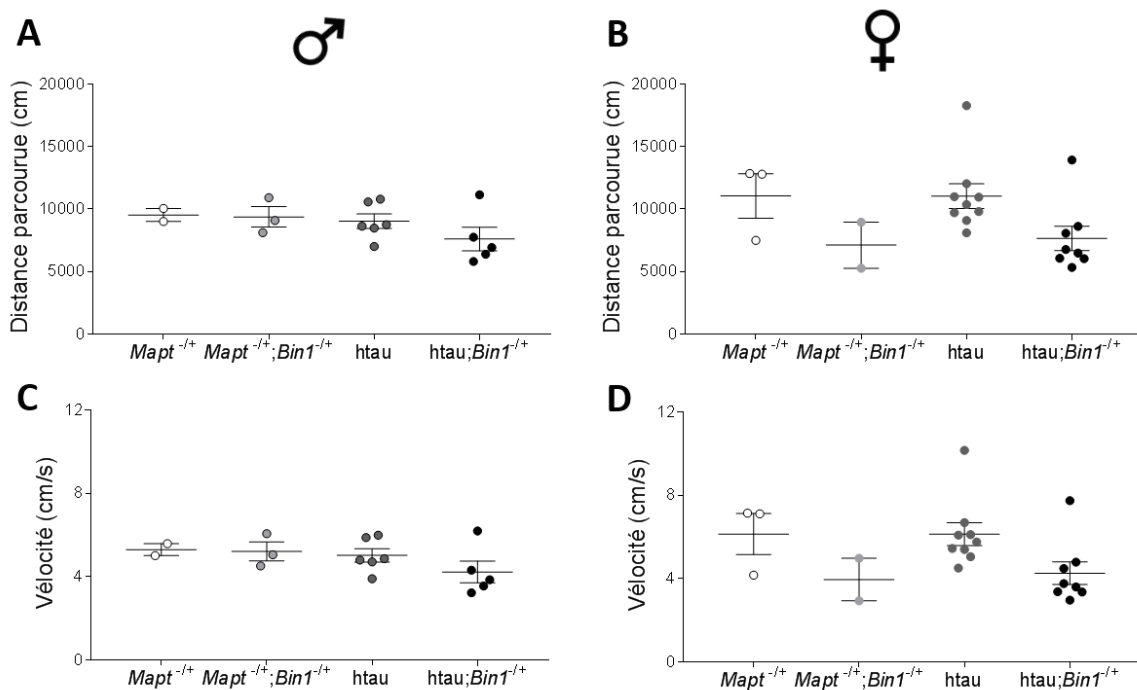
**Figure 60 : Variation de l'expression de la protéine RTN4-A dans l'hippocampe (A) et le cortex temporal (B) chez les mêmes souris htau;TgBIN1 âgées de 18 mois.** Quantification de la protéine RTN4-A dans l'hippocampe (C) et le cortex temporal (D) par rapport au niveau respectif de la GAPDH de chaque échantillon. Les données, moyenne  $\pm$  SEM, ont été analysées avec un test de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$

### III. Résultats préliminaires

#### III. 1. Impact d'une diminution de l'expression de *Bin1* dans un modèle de tauopathie

Un troisième projet étudie la baisse de l'expression de *Bin1* murin dans l'établissement des phénotypes liés au modèle de tauopathie. Des expériences préliminaires ont été conduites sur deux premières cohortes d'animaux composées de deux groupes<sup>1</sup> « contrôles » (n=5, *Mapt*<sup>+/-</sup> et n=5, *Mapt*<sup>+/-</sup>;*Bin1*<sup>+/-</sup>), d'un groupe modélisant la tauopathie (n=15, htau) et d'un groupe modélisant la tauopathie avec la diminution d'expression du gène *Bin1* murin (n=13, htau;*Bin1*<sup>+/-</sup>). Le faible échantillonnage de chacun de ces groupes et le nombre important de comparaison à effectuer ne nous permettent pas à l'heure actuelle de réaliser des analyses statistiques. La description et l'interprétation de ces données sont donc pour le moment préliminaires et hypothétiques.

##### 1. a. Activité locomotrice en champ ouvert



**Figure 61 : Activité locomotrice chez les souris htau;*Bin1*<sup>+/-</sup> âgées de 3 mois durant trente minutes.** Distance parcourue (A et B) et vélocité (C et D) des mâles (à gauche) et des femelles (à droite). Moyenne ± SEM.

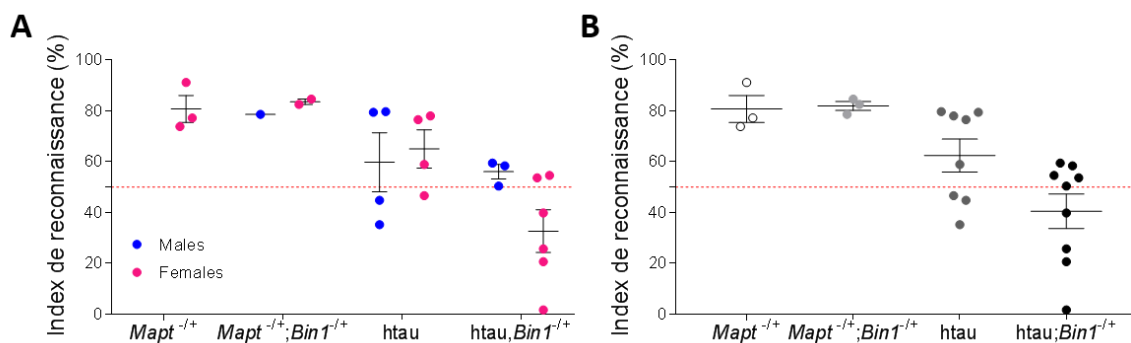
<sup>1</sup> Mâles et femelles

La mesure de l'activité locomotrice réalisée à 3 mois en champ ouvert semble indiquer une hypolocomotion chez les femelles *htau;Bin1<sup>+/-</sup>*. Ce phénotype se retrouve à la fois en terme de distance parcourue (**Figure 61B**) et en terme de vélocité (**Figure 61D**). Cet effet ne semble pas exister chez les animaux contrôles *Mapt<sup>+/-</sup>;Bin1<sup>+/-</sup>*.

Cette possible hypolocomotion n'est pas retrouvée chez les mâles que ce soit en terme de distance parcourue (**Figure 61A**) ou de vélocité (**Figure 61C**).

### 1. b. Reconnaissance d'objet

Le test de reconnaissance d'objet effectué à 3 mois en discriminant les sexes ou non semble indiquer une incapacité des animaux *htau;Bin1<sup>+/-</sup>* à effectuer un rappel sur le court terme (**Figure 62 A-B**).



**Figure 62 : Index de reconnaissance après une heure de rétention chez les souris *htau;Bin1<sup>+/-</sup>* âgées de 3 mois avec discrimination (A) ou non (B) des sexes.** La ligne rouge discontinue représente un index de 50% pour lequel aucune préférence ne peut être visualisée. Moyenne  $\pm$  SEM

## III. 2. Impact de la variation des niveaux de BIN1 et de Tau sur l'expression protéique

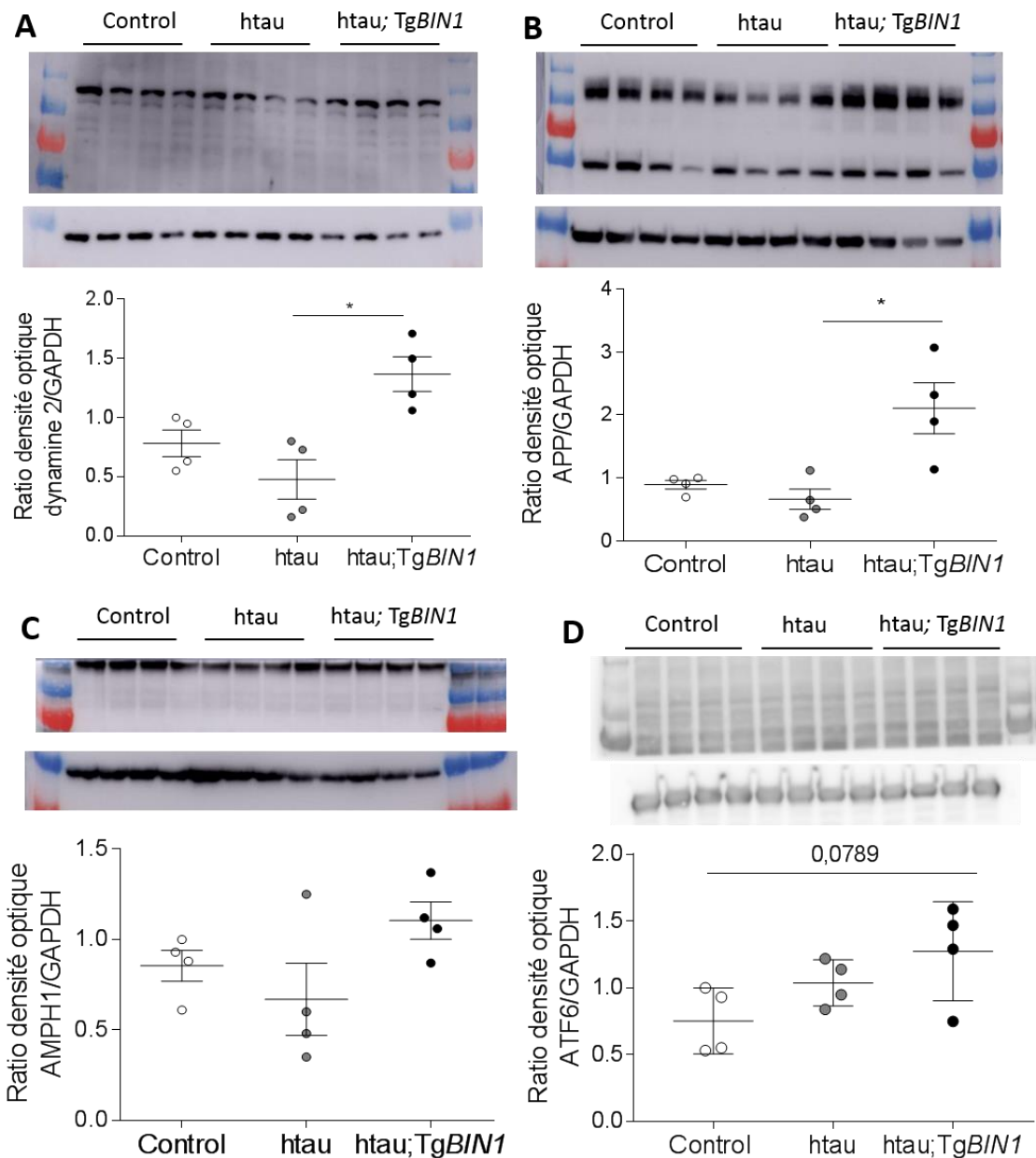
### 2. a. Chez l'animal âgé

Nous nous sommes intéressés à savoir si les variations d'expression des protéines dynamine 2, APP, AMPH1 et ATF6<sup>1</sup>, un acteur de la réponse au stress cellulaire dépendant du RE, pouvaient être due à la surexpression de *BIN1* dans le modèle de tauopathie. Nous avons observé que la surexpression de *BIN1* dans le modèle *htau* entraîne une hausse significative du niveau d'expression de la protéine dynamine 2 de 186% et APP de 216% par rapport au modèle de

<sup>1</sup> De l'anglais, *Activating Transcription Factor 6*



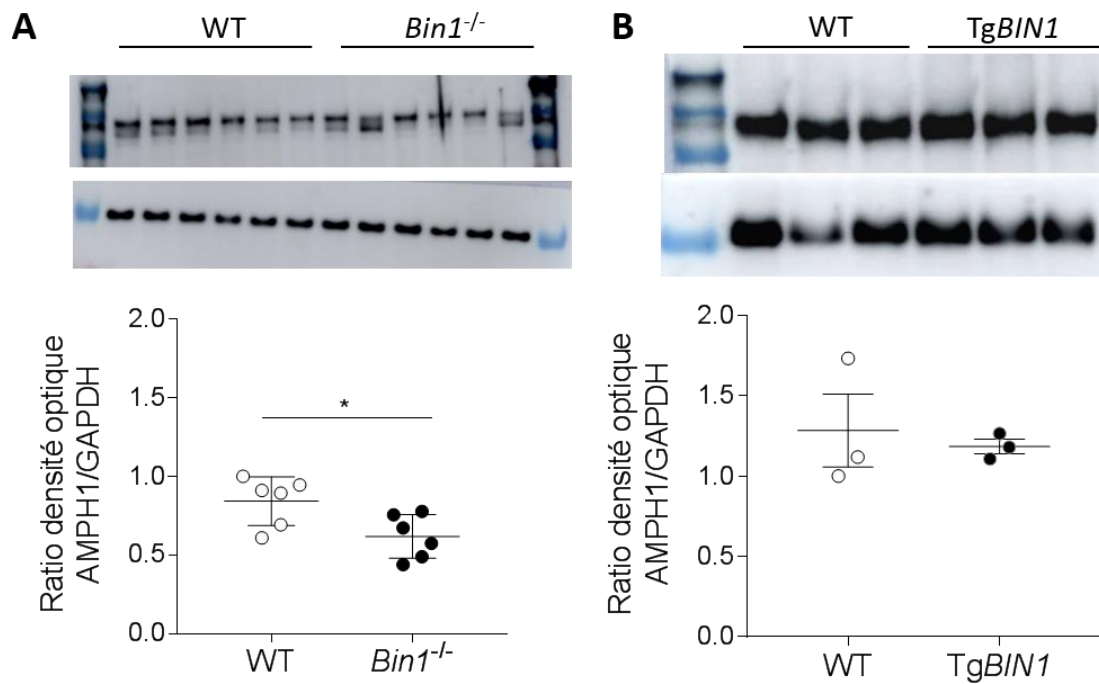
taupathie (**Figure 63 A-B**). Une tendance à la hausse a également été retrouvée pour la protéine ATF6 ( $p=0,0789$  ; **Figure 63D**) mais pas pour l'AMPH1 (**Figure 63C**).



**Figure 63 : Variation de l'expression des protéines dynamine 2 (A), APP (B), AMPH1 (C) et AFT6 (D) dans l'hippocampe de souris htau;TgBIN1 âgées de 18 mois.** Quantification, sous leur membrane respective, des protéines dynamine 2, APP, AMPH1 et ATF6 par rapport au niveau respectif de la GAPDH de chaque échantillon. Les données, moyenne  $\pm$  SEM, ont été analysées avec une ANOVA non paramétrique suivie d'un test de comparaisons multiples de Dunn. \* $p < 0,05$

2. b. Chez l'animal jeune

À partir d'extrait de cerveau totaux (E18,5), nous avons mis en évidence une diminution significative de 27% du niveau d'expression de l'AMPH1 chez les animaux *Bin1*<sup>-/-</sup> par rapport aux animaux WT. Toutefois ces variations ne sont plus retrouvées dans l'hippocampe de souris *TgBIN1* âgées de 3 mois (**Figure 64A-B**).



**Figure 64 : Variation de l'expression de la protéine AMPH1 dans le cerveau entier d'embryon E18.5 de souris *Bin1*<sup>-/-</sup> (A) et l'hippocampe de souris *TgBIN1* âgés de 3 mois(B).**Quantification, sous leur membrane respective, de l'AMPH1 par rapport au niveau respectif de la GAPDH de chaque échantillon. Les données, moyenne ± SEM, suivent une loi normale d'après le test de Shapiro-Wilk et ont été analysées avec un test t de Student. \*p < 0,05

# Discussion

---

Les travaux de thèse ont eu pour objectif de déterminer l'impact d'une surexpression du gène *BIN1* humain, qui présente une activité physiologique, chez la souris. Le modèle Tg*BIN1*, est pour l'heure la seule base d'étude de cette surexpression de BIN1-H chez les mammifères. Ces souris développent des anomalies comportementales, cellulaires et moléculaires. Ainsi, nos données révèlent que BIN1 est impliqué dans des voies moléculaires liées à RTN4-A. La modification d'expression de *BIN1/Bin1* entraîne des phénotypes qui peuvent être régulés par cet interacteur comme l'organisation de la myéline, l'architecture dendritique et du RE.

Dans un deuxième temps, nous avons pu constater que cette hausse du ratio BIN-H/BIN1-L était en mesure de préserver les atteintes induites par le modèle htau au niveau de la mémoire spatiale à long terme, de la formation d'inclusions de Tau et de l'organisation ultra-structurale des feuillettes de myéline. Il apparaît également qu'une modulation de BIN1 par surexpression de BIN1-H ou par délétion hétérozygote de *Bin1* dans le modèle htau entraîne la même synergie d'apparition précoce du déficit de mémoire à court terme.

Nos données permettent pour la première fois d'établir *in vivo* un impact fonctionnel du niveau de *BIN1* sur le développement de tauopathie apparentée à la maladie d'Alzheimer. Cet impact peut être ajusté en fonction de l'âge, du sexe et du connectome neuronal sollicité.

## I. Impact de la surexpression du gène *BIN1* humain

### I. 1. Caractéristiques génétiques

Afin d'étudier les conséquences d'une surexpression du gène humain *BIN1*, un modèle murin surexprimant ce gène a été développé grâce à la technologie BAC. Malgré l'absence d'information sur la localisation chromosomique de ce transfert génétique, nous avons pu nous assurer que la séquence humaine est dépourvue de mutations exoniques.

Le premier lien entre le gène *BIN1* et la LOAD a été effectuée par GWAS. En 2013, douze polymorphismes de ce gène étaient référencés ([Tan, Yu, and Tan 2013](#)). Nous avons sélectionné parmi eux trois polymorphismes selon leur probabilité d'interaction avec le développement de la LOAD mais également au regard de leurs implications fonctionnelles. Dans le clone utilisé pour notre modèle animal, le séquençage des régions nucléotidiques au

niveau du promoteur de *BIN1* n'a pas révélé la présence du polymorphisme rs59335482 qui est corrélé à la surexpression de *BIN1* (*Chapuis, Hansmannel, Gistelinck, Mounier, Van Cauwenberghe, Kolen, Geller, Sottejeau, Harold, Dourlen, Grenier-Boley, Kamatani, Delepine, Demiautte, Zelenika, Zommer, Hamdane, Bellenguez, Dartigues, Hauw, Letronne, Ayrat, Slegers, Schellens, Broeck, Engelborghs, De Deyn, Vandenberghe, O'Donovan, Owen, Epelbaum, Mercken, Karran, Bantscheff, Drewes, Joberty, Champion, Octave, Berr, Lathrop, Callaerts, Mann, Williams, Buee, Dewachter, Van Broeckhoven, Amouyel, Moechars, Dermaut, Lambert, et al. 2013*). De plus, le polymorphisme rs744373 n'a pas non plus été retrouvé. Celui-ci est associé au déclin cognitif, à la progression de la LOAD (*Zhang et al. 2015*), à la concentration de Tau et phospho-Tau dans le liquide céphalorachidien, à un déséquilibre dans le métabolisme du glucose et également à une atrophie cérébrale (*Wang et al. 2016*). Enfin le polymorphisme rs7561528 corrélé à une atrophie de l'hippocampe (*Wang et al. 2016*) n'est pas non plus présent dans le clone utilisé.

## I. 2. Expression de *BIN1* au niveau cérébral

Le deuxième lien est apparenté à une surexpression du gène *BIN1* dans le cerveau des patients Alzheimer. En effet, le gène *BIN1* est surexprimé au niveau du CPF (*Chapuis, Hansmannel, Gistelinck, Mounier, Van Cauwenberghe, Kolen, Geller, Sottejeau, Harold, Dourlen, Grenier-Boley, Kamatani, Delepine, Demiautte, Zelenika, Zommer, Hamdane, Bellenguez, Dartigues, Hauw, Letronne, Ayrat, Slegers, Schellens, Broeck, Engelborghs, De Deyn, Vandenberghe, O'Donovan, Owen, Epelbaum, Mercken, Karran, Bantscheff, Drewes, Joberty, Champion, Octave, Berr, Lathrop, Callaerts, Mann, Williams, Buee, Dewachter, Van Broeckhoven, Amouyel, Moechars, Dermaut, Lambert, et al. 2013*) et du CP (*Daudin et al. en soumission*) chez les patients atteints de LOAD au niveau des ARNm mais également au niveau protéique (*Holler et al. 2014*). Dans cette dernière étude, les auteurs présentent une surexpression de *BIN1*-iso9 au niveau de l'hippocampe, du CPF et du cortex pariétal inférieur qui contient le gyrus supramarginal et le gyrus angulaire. Cette isoforme, qui est exprimée de manière ubiquitaire, est positivement corrélée au nombre de DNF ( $R^2 = 0,1$  avec une p-valeur de 0,0002) chez les patients atteints de LOAD (*Holler et al. 2014*). Les mêmes auteurs présentent également une diminution d'expression des isoformes cérébrales (*BIN1*-H) dans l'hippocampe et le cortex pariétal inférieur. La même diminution du niveau protéique de *BIN1*-H a été observée dans le CPF de patients Alzheimer (*Glennon et al. 2013*).

Il apparaît en premier lieu que notre modèle TgBIN1 est un modèle miroir de ce qui est retrouvé chez les patients atteints de LOAD. En effet, alors qu'une diminution d'expression de BIN1-H avec surexpression de BIN1-L sont mesurées *post-mortem*, nos données révèlent que le déséquilibre modélisé chez la souris est en faveur d'une augmentation de ce ratio BIN1-H/BIN1-L. Ainsi, si notre modèle TgBIN1 présente un niveau d'ARNm total 2,5 fois plus important que le niveau endogène, comparable aux données recueillies chez l'humain *post-mortem*, une surexpression protéique de BIN1-H a été retrouvée dans l'hippocampe d'environ 4 fois. Le niveau de BIN1-L ne présente, quant à lui, pas de variation. Les données relatives à l'expression de ce gène humain chez la souris montrent une bonne expression des isoformes spécifiques du tissu musculaire et nerveux. Un clonage des ARNm exprimés dans l'hippocampe des souris *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1 a permis d'identifier la production de BIN1-iso1 et BIN1-iso9. Mais d'autres isoformes non répertoriées dans la littérature ont également été identifiées. Nous avons ainsi pu identifier sur treize clones, trois épissages alternatifs de l'exon 17 avec une délétion plus ou moins importante de l'extrémité C-ter du domaine BAR. Nous avons également noté l'inclusion de l'exon 13 uniquement dans deux clones dont un qui est dépourvu de l'exon 10 du domaine BAR. Comme nous l'avons vu (**voir partie IV. 1. Isoformes de BIN1, p. 36**), les sept isoformes cérébrales de BIN1 présentent un épissage alternatif des exons du domaine CLAP et de l'exon 7 du domaine BAR ([Butler et al. 1997](#); [Tsutsui et al. 1997](#); [Ellis et al. 2012](#)). De plus, une récente étude met en avant la possibilité pour BIN1 de présenter des altérations dans son épissage alternatif dans les cerveaux des patients atteints de LOAD ([Johnson et al. 2018](#)).

Afin de déterminer une possible correspondance protéique à ces isoformes atypiques, des anticorps spécifiques du domaine CLAP<sup>1</sup> neuronal (3497-BIN1-BAR) ont été utilisés. Cette expérience a révélé la présence d'un profil complexe à faible poids moléculaire (de 15 à 55 kDa) dans le tissu cérébral des souris WT, TgBIN1 et *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1, comme cela a été retrouvé dans le poumon et le muscle de rat adultes ([Butler et al. 1997](#)) et dans le cerveau de souris par Co-IP de BIN1 ([Ramjaun et al. 1997](#)). À ce jour, nous ne pouvons pas déterminer si ces profils correspondent à un produit de dégradation de BIN1 ou s'ils sont inhérents à la transcription d'autres isoformes du gène *Bin1* chez la souris. Il ne semble pas que les profils retrouvés chez les animaux WT soient surexprimés chez les animaux transgéniques, ce qui implique que des

---

<sup>1</sup> Contenant l'exon 16

épissages alternatifs non décrits de BIN1 au niveau du SNC de souris C57BL/6J pourraient être possibles. L'utilisation d'un second anticorps spécifique du domaine CLAP<sup>1</sup> ( $\alpha$ -CLAP-BIN1) a révélé l'expression d'isoformes cérébrales uniquement à l'âge adulte en accord avec une précédente observation issue du clonage des ARNm de BIN1 au niveau cérébral d'embryons de souris (*Butler et al. 1997*). En effet aucun profil protéique à haut poids moléculaire caractéristique de ces isoformes contenant l'exon 16 n'a été identifié au stade embryonnaire E18,5 (WT).

Il apparaît donc que la régulation de la transcription du gène *BIN1/Bin1* présente différents degrés de complexité en terme structurel, temporel et anatomique. Nous considérerons pour la suite que la variable principale de cette étude est la hausse de l'expression des isoformes cérébrales de BIN1 et de l'augmentation du ratio BIN1-H/BIN1-L.

### I. 3. Activité physiologique de *BIN1* chez la souris

Dans notre étude, nous avons déterminé le potentiel physiologique de l'expression du gène *BIN1* humain chez la souris. La lignée de souris présentant une surexpression de *BIN1* avec une délétion homozygote du gène murin a permis de valider ce potentiel. En effet, *BIN1* est en mesure de restaurer la viabilité sur le long terme des animaux *Bin1*<sup>-/-</sup> qui présentent une létalité périnatale. Cette létalité, qui est dépendante de l'expression de *Bin1* au niveau musculaire, a été identifiée à la fois dans notre étude et dans d'autres travaux de notre laboratoire (*Cowling et al. 2017*). Des organes exprimant *BIN1* de manière physiologique comme le cœur, les testicules, les poumons, le foie et la trachée n'ont pas montré de phénotypes histopathologiques. A l'âge de 3 mois, ces animaux mâles et femelles (*Bin1*<sup>-/-</sup>;Tg*BIN1*) ne présentaient pas de faiblesse musculaire dans la force absolue et dans le temps de fatigue. D'un point de vue comportemental, ils ne présentaient pas de défauts locomoteurs ou de la mémoire à court terme en reconnaissance d'objet, ni même de défauts de la mémoire conditionnée. Ainsi, la surexpression du gène *BIN1* est en mesure d'induire une activité physiologique chez la souris sans atteintes évidente au niveau comportemental et musculaire.

En conclusion, la surexpression du gène *BIN1* chez la souris présente un caractère physiologique qui peut mimer certains aspects fonctionnels et essentiels du gène murin. Pour autant, il apparaît que ce modèle de sauvetage (*Bin1*<sup>-/-</sup>;Tg*BIN1*) présente également des anomalies cellulaires au niveau du RE, de la membrane plasmique et dans l'ultrastructure des

feuillet de myéline dans le SNP. Les génotypes sélectionnés pour cette étude (WT et *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1) ne nous permettent pas d'établir qui de la surexpression du gène *BIN1* humain et/ou de la perte du gène *Bin1* murin est responsable des phénotypes observés.

#### I. 4. BIN1, RTN4-A et modelage du réticulum

La protéine BIN1 interagit avec d'autres protéines par ses domaines BAR, CLAP et SH3 qui sont tous les trois présents dans BIN1-H. Afin de déterminer de nouvelles voies moléculaires dans lesquelles la protéine BIN1 pourrait être engagée, nous avons réalisé la Co-IP de BIN1-H et BIN1-L au niveau cérébral avec un anticorps ciblant le domaine de liaison à l'élément myc (ciblant l'exon 18, présent dans toutes les isoformes) permettant de laisser « libres » les domaines BAR, CLAP et SH3.

Parmi la liste des interacteurs obtenus, nous avons identifié par MS/MS et WB la protéine AMPH1 partenaire de BIN1, la Synaptojanine 1 qui est déjà décrite comme interagissant avec les protéines AMPH1 et BIN1 (*Micheva, Kay, and McPherson 1997*) ainsi que la Dynamine 3 (*Gout et al. 1993; Shpetner, Herskovits, and Vallee 1996*). Cependant, l'absence de détection d'autres interacteurs connus comme la protéine Tau ou les Dynamines 1 et 2, montre que ces données sont à considérer avec prudence. C'est pourquoi la constitution de l'interactome proposé à partir de nos données expérimentales ne constitue pas un interactome exhaustif de BIN1 mais sert de base de travail à l'identification de nouvelles cibles. Le présent manuscrit s'efforcera de comprendre les voies moléculaires qui peuvent être engagées par l'interaction entre BIN1 et RTN4-A au niveau du SNC. Cette interaction a été validée<sup>1</sup> en condition physiologique (WT) et de surexpression (TgBIN1).

Nous avons donc choisi de nous focaliser sur la protéine RTN4-A<sup>2</sup> qui fait partie de la famille des protéines réticulons (RTN1-4 ou RTN). Cette famille doit son nom à sa fonction dans la structuration membranaire du RE (*Shibata et al. 2008*). Elle est impliquée dans de multiples maladies neurodégénératives comme la sclérose latérale amyotrophique, les scléroses en plaques et la paraplégie spastique héréditaire (*Chiurchiu, Maccarrone, and Orlacchio 2014*).

---

<sup>1</sup> Le processus de validation comprend la spectrométrie de masse MS<sup>2</sup>, les WB avec les produits de la Co-IP BIN1, les WB avec les produits de la Co-IP RTN4-A et les PLA sur cultures neuronales.

<sup>2</sup> La protéine RTN4 ainsi que son gène nommé *RTN4* selon Ensembl ou *Nogo/RTN4* (*Oertle and Schwab 2003*) a connu des modifications de nomenclature depuis les années 90. Dans ce manuscrit, nous ferons référence au gène par la dénomination *Rtn4*

Le gène *RTN4* permet la production après épissage alternatif de trois isoformes protéiques A, B et C dans les neurones, les oligodendrocytes et les cellules de Schwann (*Pot et al. 2002; Huber et al. 2002*). L'isoforme la plus longue nommée RTN4-A<sup>1</sup> présente, comme toutes les protéines réticulons, un domaine d'homologie qui possède deux domaines hydrophobes séparés par une boucle hydrophile de 66 acides aminés (boucle Nogo66) dans la partie C-ter (*Oertle and Schwab 2003*). Ce domaine d'homologie permet la localisation subcellulaire au niveau du RE ou de la membrane plasmique ainsi que l'interaction avec son récepteur NogoR BIN1 et le réticulum *in vivo*

L'analyse par microscopie électronique du nerf sciatique des souris *Bin1*<sup>-/-</sup>;*TgBIN1* a révélé des anomalies cellulaires. Ainsi, ces souris présentaient une dilatation du RE granulaire (REG) dans les cellules de Schwann. Ces cellules sont responsables de la myélinisation des fibres axonales périphériques. Ce phénotype peut être apparenté à une mort cellulaire de type 3B selon la classification répertoriée par Peter G.H. Clarke (*Clarke 1990*). Dans la description faite à partir de clichés obtenus en microscopie électronique, cette mort cellulaire se caractérise initialement par l'émergence d'une dilatation du REG auquel les ribosomes restent attachés. Durant ce processus il n'y a pas de condensation précoce du noyau ni de fragmentation détectable des organelles qui pourraient alors être phagocytées. Enfin durant la mort cellulaire de type 3B, le REG n'est pas intégré dans des vacuoles autophagiques.

La mort cellulaire est un mécanisme nécessaire au développement des organismes. Cependant l'augmentation du nombre de ces événements liés au REG chez les souris *Bin1*<sup>-/-</sup>;*TgBIN1* par rapport aux animaux contrôles pourrait être le signe d'un processus pathologique induit par la perte de fonction endogène et/ou la surexpression du gène *BIN1*. Quel que soit l'élément génétique causal, il met en avant une corrélation entre la protéine BIN1 et l'architecture membranaire du RE.

#### 4. a. BIN1 et le réticulum *ex vivo*

Le domaine BAR\*<sup>2</sup> de la protéine BIN1, qui permet la dimérisation avec BIN1 ou AMPH1 pour détecter et/ou générer des courbures membranaires, est en mesure d'induire des tubulations

---

<sup>1</sup> Nommée également Nogo-A ou RTN4-A/Nogo-A

<sup>2</sup> Acides aminés 1-282, le domaine BAR\* contient le domaine de liaison aux phospho-inositides qui est codé par l'exon 11 spécifique du tissu musculaire.

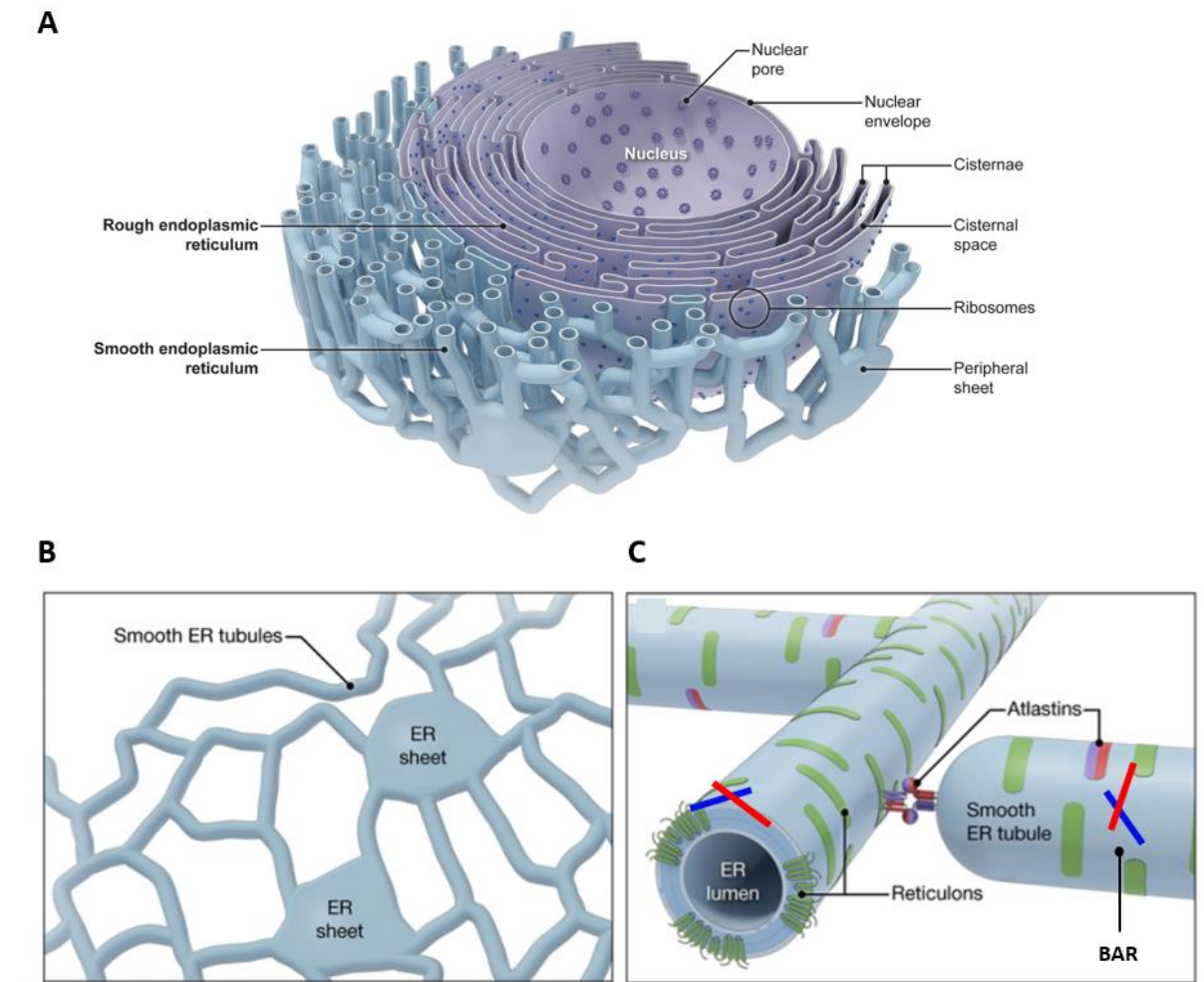


membranaires qui ne présentent pas les mêmes caractéristiques que les T-tubules des cellules musculaires (Nicot *et al.* 2007). Il est établi que la protéine RTN4-A est également impliqué dans le modelage membranaire, et plus particulièrement dans la tubulation du RE (Shibata, Voeltz, and Rapoport 2006; Voeltz *et al.* 2006; Zurek, Sparks, and Voeltz 2011; Jozsef *et al.* 2014), et la formation de l'enveloppe nucléaire (Kiseleva *et al.* 2007). Il apparait également que cette tubulation du RE nécessite le recrutement de protéine présentant des hélices amphiphatiques comme BIN1 (Figure 65 ; (Brady *et al.* 2015).

Nos données révèlent qu'une faible co-localisation existe entre les tubules générés par BIN1-BAR\* et le RE<sup>1</sup>, mais ces tubules présentent une plus grande probabilité de co-localisation avec RTN4-A. La co-localisation est relative à l'échelle d'un microscope confocal, c'est-à-dire avec une résolution spatiale d'un maximum de 200 nm. Ainsi, nos données suggèrent qu'une expression anormale de BIN1-BAR\* pourrait entraîner, grâce au recrutement partiel de RTN4-A, une tubulation membranaire anormale.

---

<sup>1</sup> Mis en évidence avec la sonde Sec-61β



**Figure 65 : Implications fonctionnelles de RTN4 dans l'architecture du réticulum endoplasmique.** Le RE est un système complexe qui se retrouve notamment au niveau péri-nucléaire **(A)**. Le RE peut être dissocié en deux catégories, le RE en feuillets ou *ER sheet* et le RE tubulaire ou *smooth ER tubules* qui est dépourvu de ribosomes **(B)**. La formation des tubules du RE recourt notamment au concours des protéines Réticulons et de la dimérisation du domaine BAR (le rouge et le bleu symbolise un domaine BAR) avec interaction directe. Ces tubes peuvent être interconnectés grâce notamment à des éléments adaptateurs comme les altlastines. Figure adaptée d'après [\(Goyal and Blackstone 2013\)](#)

Par ailleurs, des expériences préliminaires réalisées sur des MEF mettent en évidence la présence d'anomalies du RE chez les animaux *TgBIN1*. En effet, nous avons identifié des cellules qui présentaient un RE compact. Il serait nécessaire de quantifier le nombre de cellules présentant ces anomalies pour étayer la caractérisation de ce phénotype et de déterminer si ces anomalies sont co-localisées avec RTN4-A (travail en cours).

#### 4. b. BIN1, un modulateur de la réponse au stress cellulaire ?

Le RE a pour fonction cellulaire de stocker le calcium et de permettre des modifications post-traductionnelles ainsi qu'une structuration fonctionnelle des protéines avant un adressage à l'appareil de Golgi (*Schwarz and Blower 2016*). La perte d'expression endogène du gène *Bin1* et/ou sa surexpression pourrait être en mesure d'induire un phénomène de stress cellulaire. Un stress du RE peut être induit par une cause pathologique comme l'ischémie, l'hypoxie ou l'absorption de poisons (*Malhotra and Kaufman 2007*). L'une des conséquences majeures du stress du RE est la surexpression de protéines chaperonnes liées au RE et l'activation de la réponse aux protéines anormalement repliées (UPR<sup>1</sup>). Cette voie UPR, caractérisée notamment par le clivage de l'ATF6 et la phosphorylation de ERK,<sup>2</sup> est en charge de promouvoir le repliement normal des protéines et la dégradation des protéines anormalement repliées (*Malhotra and Kaufman 2007*). Lorsque cette voie UPR est activée de manière trop intense ou sur une trop longue période, la réponse cellulaire finale est l'apoptose. Des perturbations dans les fonctions du RE sont aujourd'hui considérées comme un facteur pertinent dans l'étude de la maladie d'Alzheimer (*Li et al. 2015*). Des éléments histopathologiques et moléculaires ont récemment permis de mettre en évidence un dysfonctionnement du RE lié à l'amyloïdogénèse et à Tau (*Li et al. 2015*). En effet des études *post-mortem* ont identifié l'activation de la voie UPR dans le cortex temporal et l'hippocampe à un stade précoce de la dégénérescence axonale qui précède la formation d'agrégats protéiques de Tau marqués avec l'anticorps AT8 (*Hoozemans et al. 2005*). Une augmentation du signal cellulaire de phospho-PERK est également retrouvée dans l'hippocampe de patients à un stade tardif. Ce signal coïncide avec une délocalisation de Tau du compartiment axonal vers le soma marqué notamment avec l'anticorps AT8 (*Hoozemans et al. 2009*).

Il apparaît donc pertinent de déterminer si BIN1 est en mesure de moduler la réponse au stress cellulaire au niveau du SNC. En effet, une modulation positive ou négative de BIN1 sur la réponse au stress cellulaire induit par le repliement anormal et excessif de Tau pourrait être un élément déterminant dans la cinétique de la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. A l'heure actuelle, nos données moléculaires concernant les cellules de Schwann dans ces modèles *Bin1*<sup>-/-</sup>;TgBIN1 et TgBIN1 ne sont pas suffisantes pour étayer le rôle de BIN1 sur une

---

<sup>1</sup> De l'anglais, *unfolded protein response*

<sup>2</sup> De l'anglais, *extracellular signal-regulated kinases*

possible régulation de cette voie cellulaire du stress du RE. Il serait donc nécessaire de quantifier le niveau d'activation des éléments constituant la voie UPR chez les animaux *TgBIN1* soumis à un stress environnemental comme une hypoxie au niveau du SNC afin de déterminer si BIN1 peut moduler à la fois l'architecture du RE et sa réponse au stress cellulaire.

## I. 5. BIN1, RTN4-A et modelage membranaire

### 5. a. BIN1 et la myéline

En complément des anomalies structurales observées au niveau du REG dans les cellules de Schwann, nous avons pu aisément observer une perte de l'intégrité des feuillettes de myéline et de la membrane plasmique axonale. Ainsi, certains axones des souris *Bin1<sup>-/-</sup>;TgBIN1* présentaient une invagination de la membrane plasmique avec des inclusions de matériel non identifié. La protéine BIN1 est notamment connue pour sa capacité à détecter des courbures dans la membrane plasmique, de les maintenir et même de les former (*D'Alessandro et al. 2015*). Nous avons constaté qu'une détérioration, même importante, des feuillettes de myéline conjointement à un potentiel stress cellulaire des cellules de Schwann n'a pas d'incidence sur la locomotion ni sur l'activité musculaire à cet âge.

Comme nos résultats le montre, la protéine BIN1 a un effet prépondérant dans l'organisation structural des feuillettes de myéline et une partie de la discussion traite de concert ce phénomène et la modélisation de la tauopathie (**voir partie II. 2. c. BIN1 est un acteur essentiel dans les processus de myélinisation, p. 163**).

### 5. b. BIN1 et l'architecture neuritique du gyrus denté

La mémoire contextuelle, classée comme épisodique, permet à l'organisme de discriminer des environnements similaires et est en grande partie soutenue par le gyrus denté (*McHugh et al. 2007*). De ce fait, lorsqu'un défaut de mémoire contextuelle a été décelé à l'âge de 15 mois chez les souris *TgBIN1* lors du test de *pattern separation*, des enregistrements d'électrophysiologie sur tranches ont été effectués dans le GD. Chez les souris *TgBIN1* âgées de 3 mois, la potentialisation à long terme des neurones du GD était diminuée par rapport aux souris WT. De plus, ces animaux présentaient également à cet âge une diminution du nombre d'épines dendritiques des neurones du GD (*Daudin et al., en préparation*).

Nous avons alors étudié l'arborisation dendritique, après reconstruction 3D, des neurones du GD chez ces animaux âgés de 3 mois. La surexpression de *BIN1* a induit une diminution drastique de la complexité architecturale du réseau dendritique des cellules granulaires. De façon intéressante, cette diminution de l'arborisation dendritique a également été observée au niveau des cellules granulaires du GD dans les cerveaux des patients Alzheimer (*Einstein, Buranosky, and Crain 1994*). Toutefois, si cette réduction est également corrélée avec la présence de DNF, elle ne l'a pas été avec la présence de plaques amyloïdes. Les causes moléculaires sous-jacentes de ce déficit d'arborisation dendritique restent encore inconnues (*Falke et al. 2003*).

De plus, il a été établi chez la souris qu'une délétion de la protéine AMPH1, partenaire de BIN1, entraîne une diminution drastique de BIN1 ainsi qu'un défaut dans la croissance neuritique en culture de neurones hippocampiques (*Mundigl et al. 1998; Di Paolo et al. 2002*). Nous avons montré que le modèle de *Bin1*<sup>-/-</sup> à E18,5 présentait une diminution de 27% de l'expression protéique de l'AMPH1. Cependant le modèle Tg*BIN1* ne présentait pas de variation du niveau de la protéine AMPH1 au niveau de l'hippocampe à 3 mois. Ainsi une régulation d'expression réciproque semble exister entre les gènes *Amph1* et *Bin1 a minima* durant le développement embryonnaire. Le phénotype architectural observé pourrait donc être issu de l'expression et de l'interaction de ces deux protéines durant le développement cérébral.

Nous pouvons également, en complément du complexe moléculaire BIN1-AMPH1, ajouter l'effecteur RTN4-A. En effet, au niveau du SNC, l'isoforme RTN4-A a été décrite ces dix dernières années pour son implication dans la plasticité cérébrale (*Delekate et al. 2011; Raiker et al. 2010*) et dans l'inhibition de la pousse neuritique (*GrandPre et al. 2000; Prinjha et al. 2000*). Chez la souris, l'inhibition fonctionnelle de RTN4-A avec un anticorps (11C7) ou par délétion homozygote de ce gène (*Rtn4*<sup>-/-</sup>) est en mesure de moduler significativement la complexité architecturale des neurones hippocampiques. Ainsi, cette inhibition fonctionnelle de RTN4-A peut à la fois, au niveau des dendrites basales, augmenter la complexité dendritique de la CA1 et diminuer celle de la CA3 (*Zagrebelsky et al. 2010*). Les auteurs de cette étude n'ont cependant pas étudié l'impact du niveau d'expression de ce gène sur l'architecture neuritique des cellules granulaires du GD. De plus, il a été démontré *in vitro* que RTN4-A présente une localisation préférentielle (près de 99%) au niveau intracellulaire dans

les oligodendrocytes matures (*Oertle et al. 2003*). La fraction membranaire (1%) interagit avec son récepteur NgR présent notamment au niveau neuronal et permettrait d'empêcher le développement anarchique de neurites collatérales (*Wang et al. 2002*). Il apparaît donc que la régulation du niveau d'expression de RTN4-A doit être pleinement maîtrisée dans le SNC.

Or, nos données mettent en exergue d'une part une interaction entre RTN4-A et les isoformes cérébrales de BIN1, et d'autre part une corrélation positive entre le niveau d'expression de *BIN1* et le niveau de RTN4-A dans l'hippocampe. Ainsi le modèle de surexpression de *BIN1* (*TgBIN1*) présente une surexpression de RTN4-A similaire à celle retrouvée *post-mortem* chez les patients atteints de LOAD (*Gil et al. 2006*). Cependant, et tout comme les auteurs le soulignent, l'absence de quantification du niveau d'ARNm ne nous permet pas de déterminer si la hausse protéique de RTN4-A visualisée est imputable à une hausse du niveau de transcription ou à une stabilisation du complexe protéique (*Gil et al. 2006*).

Il se pourrait que l'interaction entre BIN1 et RTN4-A se produise au niveau du domaine reconnu par l'anticorps 11C7. En effet, l'utilisation de cet anticorps mime les effets délétères de l'inhibition de RTN4 (*Rtn4<sup>-/-</sup>*) sur la formation dendritique. Ces données permettent d'étayer l'observation faite par *Einstein et al. en 1994*, sur la diminution de la complexité des arbres dendritiques des cellules granulaires du GD dans les cerveaux humains atteints de LOAD (*Einstein, Buranosky, and Crain 1994*). Nous pouvons en effet supposer qu'un niveau maîtrisé et équilibré de l'expression de BIN1, AMPH1 et RTN4-A est requis pour une formation « normale » des arbres dendritiques du GD. Une augmentation de leur expression dans l'hippocampe comme dans notre modèle *TgBIN1* pourrait alors concourir à l'établissement des défauts observés sur l'architecture dendritique, ce qui suggère qu'un complexe composé *a minima* de BIN1, AMPH1 et RTN4-A est impliqué dans la régulation du développement neuritique.

## I. 6. Mémoire à court terme et nécrose neuronale

Des données recueillies chez les souris *TgBIN1* au sein du laboratoire ont permis de mettre en exergue un défaut de reconnaissance d'objet chez ces souris dès l'âge de 6 mois. Ce test, effectué avec une heure de rétention entre la phase d'acquisition et la phase de test, met en jeu une forme de mémoire à court terme, impliquant en grande partie le CP<sup>1</sup>, lorsque les deux

---

<sup>1</sup> Cortex périrhinal

objets (nouveau et familier) sont présentés simultanément à des rongeurs et des chimpanzés ([Olarte-Sanchez et al. 2015](#)). D'autres études avec le même paradigme expérimental mettent cependant en évidence l'implication de l'hippocampe à court terme (1 heure), à long terme (1 jours) mais pas à très court terme (10 secondes ou 10 min ;([Clark, Zola, and Squire 2000](#)). Les études sur les circuits neuro-anatomiques impliqués dans la sollicitation de cette forme de mémoire chez le rongeur sont donc encore sujettes à débat. En termes histopathologiques, le CP est l'une des premières régions à présenter des DNF chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer ([Braak and Braak 1991](#)). De plus, ces marques neurodégénératives sont corrélées au déclin cognitif chez les patients ([Bejanin et al. 2017](#)). Si l'on considère que le circuit temporo-hippocampique est crucial pour une sollicitation de la mémoire à court terme en reconnaissance d'objet chez le rongeur ([Clark, Zola, and Squire 2000](#)), alors le modèle TgBIN1 présente un déclin cognitif apparenté en terme structural CP et temporel (1<sup>ère</sup> structure atteinte) aux signes cliniques de la maladie d'Alzheimer.

Nos données relatives à la nécrose neuronale du CP chez les souris WT et TgBIN1 âgées de 18 mois ne révèlent pas de différence entre les deux génotypes. Pour autant, nous avons noté chez les animaux WT un taux non négligeable de cellules en voie de nécrose et nécrosées de respectivement 20% et 35%. Les causes sous-jacentes au déficit de reconnaissance d'objet chez les animaux TgBIN1 pourraient donc trouver leur source en dehors de la matière grise du CP. En effet comme nous l'avons précédemment vu, ce modèle TgBIN1 présente des désordres électrophysiologiques dans la voie perforante ou voie de sortie du CE-CP vers le GD. Ces anomalies pourraient être la résultante de défauts structuraux au niveau de la synapse, comme la réduction du nombre d'épines dendritiques observées ([Daudin et al., en soumission](#)) ou dans l'ultrastructure des fibres axonales myélinisées, et ne semblent donc pas être supportées par un processus de nécrose.

### I. 7. BIN1, des isoformes soumises à un ratio équilibré ?

La surexpression de BIN1 dans notre modèle murin TgBIN1 présente une activité physiologique et induit des processus pathologiques avec une évolution temporelle des atteintes cognitives similaire à la maladie d'Alzheimer malgré l'absence de tauopathie et d'amyloïdopathie dans notre modèle. Contrairement à la diminution du ratio des isoformes BIN1-H/BIN-L retrouvée dans les cerveaux atteints par la LOAD, notre modèle présente une augmentation de ce même ratio.

Les perturbations cognitives que nous avons observées sont imputables à la boucle impliquant le CP et l'hippocampe, l'une des premières boucles perturbées dans la maladie d'Alzheimer. En effet, la mémoire de reconnaissance des objets qui sollicite le CP et l'hippocampe est défaillante avant la mémoire de conditionnement qui sollicite majoritairement le GD. De plus, des défauts dans la structuration des cellules granulaires du GD, qui sont également retrouvés dans le cerveau de patients et corrélés avec les DNF, ont été observés chez nos souris TgBIN1 (*Einstein, Buranosky, and Crain 1994; Falke et al. 2003*). Des défauts électrophysiologiques et comportementaux associés au GD ont également été mis en évidence (*Daudinet al., en préparation*). Pour autant, même à l'âge relativement avancé de 15 mois, ces souris ne présentaient pas de déficit de la mémoire spatiale à long terme hippocampo-dépendante qui est largement affectée chez les patients Alzheimer. En effet, il est important de mentionner que les informations corticales peuvent être transférées vers l'hippocampe de manière directe via le subiculum et donc sans implication de la voie CE-GD (*Knierim 2015*).

Au niveau subcellulaire, des processus de stress, qui sont retrouvés chez les patients Alzheimer, sont ici renforcés par une dilatation du RE, une déformation de la membrane axonale et une désorganisation des feuillettes de myéline. Ces phénotypes sont imputables au niveau d'expression de BIN1-H. RTN4-A, est notamment impliqué dans l'organisation architecturale de la myéline, du RE et de la pousse neuritique, étayant notre hypothèse d'une forte interaction entre BIN1 et RTN4-A dans notre étude. De plus, l'augmentation de l'expression protéique de RTN4-A au niveau de l'hippocampe dans notre modèle est concordante avec les résultats obtenus à partir de biopsies de patients dans lesquelles une surexpression de RTN4-A est retrouvée dans cette même structure.

En conclusion, si notre modèle TgBIN1 ne présente pas l'histopathologie clinique de la maladie d'Alzheimer caractérisée par des dépôts amyloïdes et des DNFs, il nous a permis de mieux identifier les circuits neuronaux et les réseaux moléculaires perturbés par la surexpression de BIN1. Il apparaît qu'à l'instar de certaines tauopathies comme la démence fronto-temporale, un ratio équilibré de BIN1-H/BIN1-L est nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme. Une perturbation de ce ratio, comme une diminution chez les patients atteints de LOAD ou une augmentation dans notre modèle TgBIN1, pourrait alors présenter un caractère pathologique. Ces résultats entraînent la nécessité de déterminer si cette modification du ratio BIN1-H/BIN1-L présente un caractère modulateur de la tauopathie *in vivo*.



## II. Effets croisés de la surexpression de *BIN1* et de *MAPT*

Dans la deuxième partie de cette discussion nous aborderons les effets physiopathologiques d'une surexpression conjointe de *BIN1* et de *MAPT* dans un modèle murin. Pour rappel, le groupe « contrôle » est composé d'animaux présentant une délétion hétérozygote du gène *Mapt* murin (*Mapt*<sup>+/-</sup>). Le groupe modélisant une tauopathie induite par surexpression du gène *MAPT* humain et une délétion homozygote du gène *Mapt* murin est nommé « htau » (*Mapt*<sup>-/-</sup>;Tg*MAPT*). Enfin, le groupe appelé « htau;Tg*BIN1* » (*Mapt*<sup>-/-</sup>;Tg*MAPT*; Tg*BIN1*) modélise la tauopathie en présence de la surexpression du gène *BIN1*.

### II. 1. Etudes comportementales

#### 1. a. *BIN1* ne module pas l'activité locomotrice perturbée par Tau

L'activité locomotrice enregistrée de manière longitudinale met en évidence plusieurs phénotypes qui peuvent être modulés à la fois par l'âge, le sexe et le génotype. Une diminution de l'activité locomotrice entre 3 et 6 mois apparaît clairement sur l'ensemble des animaux, indépendamment du sexe ou du génotype considéré. Les souris sont toujours placées dans le même environnement et dans la même pièce d'expérimentation, suggérant qu'une mémoire contextuelle est mise en jeu. Une manière de répondre clairement à cette question aurait été de placer à 6 mois les animaux dans un nouvel environnement juste après la présentation à l'environnement déjà appréhendé à 3 mois. La mesure d'une activité locomotrice importante et décroissante en fonction du temps dans le nouvel environnement aurait permis de s'assurer que les animaux ne présentaient pas de déficits locomoteurs avec l'âge et qu'un processus d'exploration est toujours présent. Il est généralement établi dans la littérature que les animaux WT exposés une deuxième fois au champ ouvert présentent une diminution de la distance parcourue par rapport à la première exposition, puis une stabilisation de ce paramètre après la deuxième exposition, ce qui reflèterait un rappel sur le long terme de l'environnement ([Wang et al. 2018](#); [Ratray et al. 2013](#); [Ratray et al. 2017](#)). De plus, à l'âge de 3 mois et uniquement à cet âge, l'ensemble des animaux présentait une activité locomotrice décroissante interprétée comme une intégration contextuelle de l'environnement. Nous considérons donc que ce phénotype de rappel contextuel, observé chez tous les animaux entre 3 et 6 mois n'est pas assez étayé pour pouvoir être clairement

défini comme la cause de la diminution de l'activité locomotrice chez tous les animaux, mais reste un effet hautement probable à ne pas négliger.

Cette décroissance de l'activité locomotrice se poursuit avec l'âge chez les femelles indépendamment du génotype considéré. Cependant cette observation ne se retrouve pas chez les mâles. En effet, nous avons observé un regain de l'activité locomotrice des mâles htau et htau;TgBIN1 entre 9 et 12 mois. Puis les animaux de ces deux groupes ont présenté une activité locomotrice stable et significativement supérieure aux animaux contrôles jusqu'à 15 mois. Nos observations d'une hyperactivité locomotrice avec l'âge n'ont pas été corrélées à un processus d'apprentissage du champ ouvert au moment du regain d'activité. Cet élément permet de rejeter l'hypothèse d'une perte mnésique à 9, 12 et 15 mois, liée au rappel de l'environnement.

L'activité locomotrice est une composante essentielle à de nombreuses fonctions comportementales comme l'exploration d'un nouvel environnement (ex. champs ouvert, labyrinthe, reconnaissance d'objet) ou la fuite de situations aversives (ex. conditionnement à la peur, piscine de Morris ; [\(Mogenson, Jones, and Yim 1980\)](#)). Cependant, il n'existe à ce jour aucune donnée de la littérature relative à l'étude longitudinale de l'activité locomotrice en fonction de l'âge dans le modèle htau. Les données obtenues chez ces souris htau indiquent cependant qu'une délétion de *Mapt* est en mesure d'induire une hyperactivité locomotrice en champ ouvert qui peut être normalisée par l'expression du gène *MAPT* humain ou *Mapt* murin à 9 ou 12 mois [\(Geiszler, Barron, and Pardon 2016; Yetman, Fowler, and Jankowsky 2016\)](#). Contrairement aux nôtres, ces données n'ont pas été obtenues dans le contexte d'une étude longitudinale dès l'âge de 3 mois, ce qui pourrait expliquer les observations différentes. Une hyperactivité locomotrice en fonction de l'âge a également été constatée chez le modèle de tauopathie surexprimant uniquement le gène humain *MAPT* contenant la mutation P310L [\(Brownlow et al. 2013; Brownlow et al. 2014; Jul et al. 2016; Wang et al. 2018\)](#). Ces données, bien que produites avec un modèle plus proche des démences fronto-temporales que de la maladie d'Alzheimer, permettent tout de même de mettre en exergue l'effet d'expression neuronal de la protéine Tau, muté ou non dans notre cas, sur l'activité motrice.

La hausse de l'activité locomotrice induite par Tau observée dans notre étude, pourrait être une liée à une neurodégénérescence. En effet chez l'humain, le comportement d'errance est un phénotype observé dans environ un quart à un tiers des patients Alzheimer [\(Lai and Arthur](#)

2003). Néanmoins, cette caractérisation clinique reste difficile à évaluer notamment par le fait qu'environ une personne sur deux âgées de 80 ans présente des difficultés motrices (Buchman and Bennett 2011; Cipriani et al. 2014). Ce phénotype, quand il est détecté, est toutefois corrélé au degré de sévérité de la maladie d'Alzheimer mesurée par l'examen MMSE<sup>1</sup> (Holtzer et al. 2003).

L'enjeu serait maintenant de déterminer quel connectome neuronal, à l'origine de ce phénotype, est perturbé et pourquoi ce phénotype est dépendant du sexe. Une revue recense chez le rat l'importance de l'hippocampe dans la modulation de l'activité locomotrice (Bast and Feldon 2003). Ainsi, une lésion bilatérale de l'hippocampe dorsal et/ou ventral est en mesure d'entraîner une hyperactivité locomotrice. En effet l'hippocampe présente à sa sortie un réseau d'efférences connectées en particulier avec le système des ganglions de la base. Ces projections inhibitrices hippocampo-striatales permettraient de moduler l'activité tonique dopaminergique dans les ganglions de la base, afin de diminuer l'activité exploratrice et économiser l'énergie de l'organisme lorsqu'assez d'informations contextuelles ont été acquises pour encoder un nouvel environnement. Une déstabilisation de ces connexions, par atrophie hippocampique ou par perte d'une partie des fibres axonales efférentes vers les noyaux de la base par exemple, entraînerait de surcroît une diminution du rétrocontrôle inhibiteur et ne permettrait plus à l'animal de gérer au mieux son activité locomotrice (Bast and Feldon 2003).

Pour autant, même si ce phénotype d'activité locomotrice a été corrélé chez les souris rTg4510<sup>2</sup> avec des DNF présentes dans l'hippocampe, ces souris présentaient une atrophie de l'ensemble du cerveau (déterminée par la masse de l'encéphale (Wang et al. 2018)). Nous ne pouvons donc pas exclure l'hypothèse que l'activité locomotrice puisse être corrélée à une détérioration d'une ou de plusieurs autres structures cérébrales. Cette détérioration dans notre cas serait alors indépendante de BIN1 et uniquement induite par le niveau d'expression de Tau.

---

<sup>1</sup> Mini Mental State Examination

<sup>2</sup> Modèle murin rTg4510 présentant la mutation P301L retrouvée dans les démences fronto-temporales

### 1. b. *BIN1* et *MAPT* ont un effet synergique négatif sur la mémoire à court terme

Le déficit de reconnaissance chez les souris htau apparaît à partir de 9 mois indépendamment du sexe considéré. Des études précédentes chez ce même modèle soutiennent nos données en décrivant l'apparition de ce phénotype entre 8 et 12 mois (*Polydoro et al. 2009; Asuni et al. 2007*). Nous pouvons également attester que la délétion hétérozygote du gène *Mapt* murin n'entraîne pas de déficit cognitif dans cette tâche. Chez des souris Tg*BIN1* en revanche, une étude préalablement réalisée dans notre laboratoire a mis en évidence l'apparition du déficit à l'âge de 6 mois (*Daudin et al., en préparation*). La surexpression de *BIN1* et de *MAPT* a entraîné une apparition précoce de ce phénotype, et ce dès l'âge de 3 mois. Ainsi, la surexpression simultanée de *BIN1* et *MAPT* est en mesure de potentialiser leurs effets délétères sur la mémoire à court terme.

Pour autant, comme l'âge auquel le défaut a été observé correspond à l'âge du premier test, nous ne pouvons pas affirmer avec certitude que ce déficit est d'ordre neurodégénératif ou développemental. Si le déficit observé est dû à un défaut du SNC après son développement, ces résultats soutiendraient la validité d'aspect du modèle étudié. En effet, chez les patients Alzheimer, la première zone cérébrale atteinte par l'accumulation de Tau est le cortex temporal (*Braak and Braak 1991*). Or, comme nous l'avons précédemment explicité (**voir partie I. 6. Mémoire à court terme et nécrose neuronale, p. 146**), le test de reconnaissance d'objet fait principalement appel au CP, une subdivision du cortex temporal chez le rongeur (*Clark, Zola, and Squire 2000; Olarte-Sanchez et al. 2015*). De ce fait, ce test met en évidence chez les souris htau;Tg*BIN1* soit un défaut d'intégration neuronale du CP, soit une atteinte des afférences ou efférences de cette structure. Le modèle htau;Tg*BIN1* présente donc un déclin cognitif apparenté en terme structural et temporel aux signes cliniques de la maladie d'Alzheimer. Cette hypothèse pourra être confirmée par une étude fonctionnelle (ex. électrophysiologie *in vivo*) et architecturale (ex. microscopie électronique) sur les fibres afférentes et efférentes du cortex périrhinal (*Bercury and Macklin 2015*).

### 1. c. *BIN1* préserve la mémoire spatiale à long terme

Chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer, la mémoire épisodique est l'une des premières formes de mémoire atteinte. Comme l'explique la revue de *Vorhees et Williams de 2014*, l'intégrité de cette mémoire qui permet de se rappeler le « quoi », le « où » et le

« quand » peut-être sondée par l'étude de la mémoire spatiale allocentrique sollicitée dans le test de la piscine de Morris (*Vorhees and Williams 2014*). Cette mémoire allocentrique est basée sur l'orientation par rapport à des indices distaux et elle est notamment supportée par l'hippocampe dorsal et le CE. Dans notre cas, les souris ont été déposées à une position aléatoire à chaque essai. Cette procédure permet de s'affranchir de la mémoire égocentrique, basée sur une succession de séquences motrices et d'indices proximaux, qui est principalement supportée par le striatum dorsal. Par ailleurs, le test de rappel effectué 24 heures après la dernière session d'apprentissage, est représentatif d'une mémoire à long terme (*Vorhees and Williams 2014*).

Dans la modélisation de la tauopathie avec surexpression de *BIN1*, nous avons observé, quel que soit l'âge, le sexe ou le génotype considéré, que l'ensemble des animaux était en mesure de localiser la plateforme visible et la plateforme cachée. Ces premiers résultats permettent, respectivement, de valider que les animaux ne présentaient pas de déficit visuels et locomoteur et qu'ils sont en mesure d'apprendre la tâche avec des scores similaires. Le test de rappel effectué à 9 mois montre que les réseaux neuronaux soutenant la mémoire spatiale à long terme sont suffisamment intègres à cet âge pour que tous les animaux se rappellent l'emplacement de la plateforme. Ces résultats indiquent un effet plafond, c'est-à-dire que les performances sont positives (et différentes du hasard) et ne peuvent que varier dans un sens négatif, à savoir une perte de la faculté de rappel.

Concernant les animaux contrôles, nous avons observé de bonnes performances quel que soit l'âge ou le sexe considéré. De précédentes études démontraient que la délétion homozygote du gène *Mapt* murin dans ce test n'entraînait pas d'effet (*van Hummel et al. 2016*) ou était en mesure d'accroître les performances de ces souris (*Ahmed et al. 2014*). Les mâles htau présentaient, quant à eux, un déficit de rappel dans cette tâche dès l'âge de 12 mois. Ce résultat déjà constaté par un autre laboratoire valide de surcroit le déficit cognitif de ces animaux (*Polydoro et al. 2009*). Seulement, contrairement à cette dernière étude, nos données ont été obtenues sur des animaux non naïfs ayant déjà pratiqué ce test à l'âge de 6 et 9 mois avec une localisation identique de la plateforme. Il apparaît donc que la sollicitation mnésique récurrente ne permette pas à ces animaux de se prémunir de troubles cognitifs, alors qu'on considère en clinique humaine que la sollicitation cognitive récurrente permet

justement d'accroître la « réserve cognitive » et donc de retarder les signes de démence (*Stern 2012*).

Comme lors de la première caractérisation de ces souris htau (*Andorfer et al. 2003; Polydoro et al. 2009*), ces résultats suggèrent que le développement des troubles cognitifs apparentés la pathologie Tau s'effectue de manière progressive. En effet, il a été noté dans ces mêmes études une augmentation du niveau d'inclusion intracellulaire de Tau avec l'âge de ces souris. Pourtant, la caractérisation moléculaire et histologique de ces animaux a mis en évidence la présence précoce, entre 3 et 4 mois, d'inclusions intracellulaires de Tau sans corrélation avec des défauts cognitifs en reconnaissance d'objet et en piscine de Morris (*Polydoro et al. 2009*). Ainsi, tout comme la maladie d'Alzheimer décrite chez l'humain, ce modèle est en mesure de développer des anomalies histologiques avant l'apparition de troubles cognitifs (*Ringman et al. 2007; Bidzan and Bidzan 2014*). En clinique humaine, l'accumulation de DNF, qui fait suite à une phosphorylation anormale et toxique de Tau, est corrélée au degré de sévérité de démence (*Wilcock and Esiri 1982; Arriagada et al. 1992; Buee et al. 2010; Bejanin et al. 2017*). Ces DNF apparaissent dans un premier temps au niveau trans-entorhinal<sup>1</sup> pour se propager ensuite au niveau de l'hippocampe et du CPF (*Braak and Braak 1991*). Les souris htau développent donc une atteinte cortico-hippocampique progressive avec une atteinte séquentielle similaire aux patients.

La seule surexpression de *BIN1* n'impacte pas la mémoire à long terme. En effet, la piscine de Morris effectuée à l'âge de 15 mois entre les animaux mâles WT et Tg*BIN1* ne révèle pas de défaut en terme à la fois d'apprentissage et de rappel. Concernant les animaux htau;Tg*BIN1*, nous avons observé chez les mâles et les femelles une capacité cognitive préservée à 12 mois. Ce résultat surprenant a été de nouveau observé à 15 mois, mais uniquement chez les mâles. La surexpression de *BIN1* chez les femelles permet donc de seulement retarder l'apparition des phénotypes tandis que chez les mâles elle est en mesure d'abolir ce phénotype du moins dans notre procédure expérimentale. Nous développerons l'interaction du sexe dans ces phénotypes dans la suite de cette discussion (**voir partie IV. Implication du sexe dans la modélisation de la maladie d'Alzheimer, p. 170**). Il serait intéressant de déterminer si cette abolition chez les mâles est totale quel que soit l'âge considéré ou si, comme les femelles, il

---

<sup>1</sup> Stage Braak 1 et 2

s'agirait d'un retard d'apparition. Les performances dans cette tâche sont notamment dépendantes de l'hippocampe. Plus particulièrement, cette tâche nécessite l'intégrité fonctionnelle des synapses entre les collatérales de Schaeffer et les cellules pyramidales de la CA1 (*O'Keefe and Dostrovsky 1971; Morris et al. 1986; Tsien, Huerta, and Tonegawa 1996*). Le sauvetage du phénotype htau par surexpression de *BIN1* sous-entend dès lors une capacité du gène *BIN1* à préserver l'hippocampe d'une toxicité induite par Tau.

## II. 2. *BIN1* prévient les effets toxiques de Tau au niveau cellulaire

A l'âge de 18 mois les animaux ont été sacrifiés. Ce sacrifice intervient donc trois mois après le dernier test comportemental effectué. Comme nos données comportementales ont révélé un effet de compensation du phénotype htau par la surexpression de *BIN1* jusqu'à 15 mois chez les mâles, nous limiterons l'étude histologique, moléculaire et cellulaire aux mâles. En effet, la similarité des phénotypes entre les femelles htau et htau;Tg*BIN1* à 15 mois, pourrait se traduire par une absence de différence histologique, cellulaire ou moléculaire entre ces animaux.

### 2. a. La surexpression de *BIN1* prévient les inclusions intracellulaires de Tau

L'immunomarquage de pTau-Ser396, un résidu retrouvé phosphorylé en situation physiologique et pathologique (*Sergeant et al. 2008; Simic et al. 2016*), a révélé chez les animaux contrôles une localisation axonale nettement visible dans les fibres moussues partant du GD vers la CA3. Les animaux htau ont présenté une délocalisation de ce marquage axonal vers le corps cellulaire du GD, de la CA1, CA2 et CA3, ce qui a déjà été caractérisée dans des études antérieures (*Duff et al. 2000; Andorfer et al. 2003; Polydoro et al. 2009*). En revanche, chez les souris htau;Tg*BIN1*, le profil observé était très similaire à celui des animaux contrôles. Ainsi, au niveau des fibres moussues, le marquage pTau-Ser396 des animaux htau;Tg*BIN1* était majoritairement axonal et seule une faible proportion de cellules présentait des inclusions intracellulaires de Tau. Le marquage a ensuite été effectué avec des anticorps spécifiques de deux formes phosphorylé de Tau. Nous avons utilisé l'anticorps AT8 qui cible la Ser202 et la Thr205 (*Braak et al. 2006*) et l'anticorps AT180 qui cible quant à lui la Thr231 (*Amniai, Lippens, and Landrieu 2011*). La phosphorylation de ce résidu Thr231 qui est situé en amont du PRD est impliquée dans la perte de liaison moléculaire entre Tau et *BIN1* (*Sottejeau et al. 2015*). La quantification du nombre de cellules présentant des inclusions intracellulaires, identifiées

avec les anticorps AT8 et AT180, a révélé une diminution drastique chez les animaux htau;TgBIN1 par rapport aux htau. Ces observations ont également été retrouvées au sein du CP.

Ces données nous indiquent que BIN1 est en mesure de prévenir la formation d'agrégats de Tau, notamment ceux révélés par AT180. Cela sous-entend que le niveau de phosphorylation de ces éléments insolubles à ce site Th231 est réduit avec BIN1 et donc que les interactions BIN1-Tau pourraient être renforcées. En accord avec cette hypothèse, nous avons noté une augmentation considérable du niveau d'interaction BIN1-Tau quantifié après PLA dans l'hippocampe de ces animaux htau;TgBIN1 (**voir figure 3D et E**, [Sartori, Mendes, Desai et al.](#)). De la même manière, une augmentation de BIN1-iso1 en culture neuronale<sup>1</sup> entraîne une augmentation du nombre d'interaction BIN1-Tau visualisées en PLA. Cette interaction en culture neuronale peut être diminuée par sous-expression de *Bin1* avec ARN interférant ou par modification du niveau de phosphorylation de BIN1 (**voir figure 4G, H et I**, [Sartori, Mendes, Desai et al.](#)). En effet, l'utilisation de la PLA sur culture neuronale de rat comme méthode de lecture du niveau d'interaction BIN1-Tau a permis d'identifier la phosphorylation comme une variable importante qui peut moduler l'interaction BIN1-Tau (**voir figure 5A, B, C et D**, [Sartori, Mendes, Desai et al.](#)). La RMN a permis d'identifier que la phosphorylation du résidu Thr348 présent dans le domaine CLAP de BIN1 permet de stabiliser la conformation ouverte de BIN1 (**voir figure 5F et G**, [Sartori, Mendes, Desai et al.](#)). La transfection dans les mêmes cultures hippocampiques du construit BIN1-iso1-T348E, qui présente donc une conformation ouverte permanente, entraîne une augmentation considérable de l'interaction BIN1-Tau visualisée en PLA (**voir figure 6H et I**, [Sartori, Mendes, Desai et al.](#)). De la même manière, l'inhibition de la phosphatase calcineurine, par la cyclosporine A, entraîne une augmentation du niveau de phosphorylation de BIN1-Thr348, sans impact sur le Thr231 de Tau (**voir figure 6D**, [Sartori, Mendes, Desai et al.](#)), et par la même occasion, induit une augmentation de 42,6% du niveau d'interaction BIN1-Tau (**voir figure 5E**, [Sartori, Mendes, Desai et al.](#)).

Des WB effectués à partir d'extraits de lobes temporaux de 14 patients atteints de LOAD, distingués selon leur niveau de Braak, a permis de rendre compte d'une tendance ( $p=0,069$ ) à la diminution de BIN1-H en fonction du niveau d'atteinte (**voir figure 7A et B**, [Sartori, Mendes,](#)

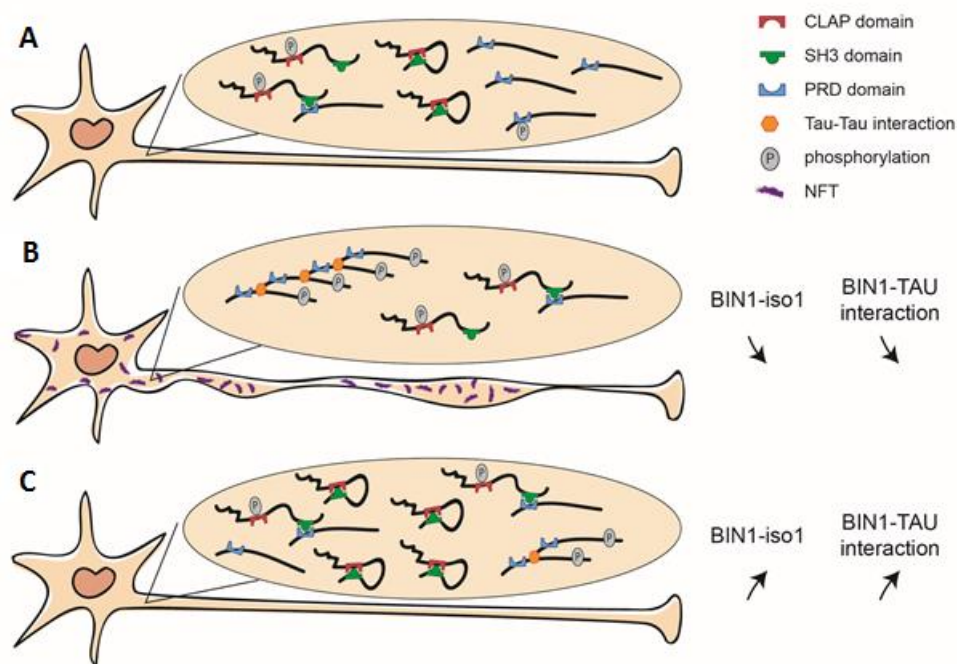
---

<sup>1</sup> Neurones hippocampique primaires de rat



*Desai et al.*). De manière surprenante il apparaît qu'une hausse du niveau de phosphorylation de BIN1-Thr348 se produit chez les patients atteints de LOAD (**voir figure 7G**, *Sartori, Mendes, Desai et al.*). La stratification du niveau de BIN1-Thr348 en fonction du stage de Braak indique une tendance à la corrélation positive (**voir figure 7D**, *Sartori, Mendes, Desai et al.*). Ainsi, il se pourrait que la cinétique d'expression de BIN1 soit négativement influencée par le niveau de progression de la tauopathie. D'une manière compensatoire, le SNC pourrait augmenter le niveau de phosphorylation de BIN1-H-Thr348 afin de promouvoir l'interaction BIN1-Tau et réduire les effets toxiques de Tau (**Figure 66**). Nous pouvons supposer qu'à un certain stade du décours temporel de la tauopathie, le trop faible niveau d'expression de BIN1-H, même phosphorylé, ne puisse plus permettre de contrer la pathologie. Ces données suggèrent que l'augmentation protectrice du ratio BIN1-H/BIN1-L au niveau de l'hippocampe doit être initiée au niveau temporel au début de la tauopathie afin d'éviter l'atteinte temporo-hippocampique observée avec le Tg*BIN1*.

La quantification par WB du niveau de protéines Tau solubles hyperphosphorylées au niveau des sites des anticorps AT8 et AT180 n'a pas permis d'identifier de variation entre les animaux htau et htau;Tg*BIN1* à la fois dans l'hippocampe et dans le CP. Si ces données se retrouvaient être identiques en normalisant la phosphorylation des sites AT8 et AT180 par rapport au niveau de Tau soluble total (et non pas par rapport au niveau de pTau-Ser396), cela pourrait signifier que l'interaction BIN1-Tau est augmentée lorsque la protéine Tau est suffisamment rentrée dans une voie de polymérisation la rendant insoluble. En effet, comme la protéine Tau présente le même niveau de phosphorylation avec les anticorps AT8 et AT180, cela indique que BIN1 ne prévient pas la phosphorylation de ces sites lorsque Tau est soluble. Si la protéine BIN1 était lié physiquement à ces sites non phosphorylé, l'augmentation de BIN1 et de l'interaction physique visualisé en PLA devrait entraîner une diminution de phosphorylation de ces sites. Or la migration sur gel après dénaturation n'indique aucune variation du niveau de phosphorylation des protéines Tau solubles, suggérant que l'interaction de BIN1 et de Tau *in vivo* est pourrait être majoritairement supportée par les polymères insolubles de Tau. Ces données confortent l'idée d'un rôle neuroprotecteur de la protéine BIN1.



**Figure 66 : La surexpression de BIN1-H et notamment de BIN1-iso1 prévient la polymérisation toxique de Tau au niveau de l'hippocampe.** En condition physiologique, BIN1-iso1 est à l'équilibre avec BIN1-iso9 et Tau ne présente pas de toxicité (A). En fonction de l'expression de BIN1-iso1 ainsi que de son niveau de phosphorylation et celui de Tau, les interactions moléculaires entre ces deux protéines peuvent être modifiées. L'équilibre physiologique du niveau d'interaction et de phosphorylation de Tau est perturbé dans le modèle htau entrainant une agrégation de Tau dans tous les compartiments neuronaux (B). La surexpression de BIN1-H et notamment BIN1-iso1 ainsi que sa déphosphorylation sont des mécanismes proposés pour expliquer la diminution d'agrégation de Tau (C). L'interaction favorisée de BIN1-Tau entraîne une diminution de polymérisation de Tau.

La quantification par WB du niveau de protéines Tau solubles hyperphosphorylées au niveau des sites des anticorps AT8 et AT180 n'a pas permis d'identifier de variation entre les animaux htau et htau;TgBIN1 à la fois dans l'hippocampe et dans le CP. Si ces données se retrouvaient être identiques en normalisant la phosphorylation des sites AT8 et AT180 par rapport au niveau de Tau soluble total (et non pas par rapport au niveau de pTau-Ser396), cela pourrait signifier que l'interaction BIN1-Tau est augmentée lorsque la protéine Tau est suffisamment rentrée dans une voie de polymérisation la rendant insoluble. En effet, comme la protéine Tau présente le même niveau de phosphorylation avec les anticorps AT8 et AT180, cela indique que BIN1 ne prévient pas la phosphorylation de ces sites lorsque Tau est soluble. Si la protéine BIN1 était lié physiquement à ces sites non phosphorylé, l'augmentation de BIN1 et de l'interaction physique visualisé en PLA devrait entrainer une diminution de phosphorylation de ces sites. Or la migration sur gel après dénaturation n'indique aucune variation du niveau de phosphorylation des protéines Tau solubles, suggérant que l'interaction de BIN1 et de Tau

*in vivo* est pourrait être majoritairement supportée par les polymères insolubles de Tau. Ces données confortent l'idée d'un rôle neuroprotecteur de la protéine BIN1.

Afin de comprendre par quels autres mécanismes moléculaires la surexpression de BIN1-H est en mesure de préserver la mémoire spatiale à long terme, nous avons cherché des éléments moléculaires discriminants entre l'hippocampe qui apparaît préservé en piscine de Morris et le cortex temporal, comprenant le CP qui est retrouvé atteint en reconnaissance d'objet.

*a. i. Variations d'expression de Tau induite par BIN1*

Une augmentation pTau-Ser396 soluble est retrouvée au niveau du cortex temporal des animaux htau;*TgBIN1* par rapport aux animaux htau. Il serait intéressant de déterminer si cette hausse d'expression concerne l'ensemble des isoformes produites. En effet, nous avons vu qu'un déséquilibre dans la balance des niveaux de production des isoforme 3R et 4R de Tau pouvait entraîner l'émergence des tauopathies même si cela est encore sujet à controverse dans la maladie d'Alzheimer ([Glatz et al. 2006](#); [Ingelsson et al. 2006](#); [Espinoza et al. 2008](#)) ; voir partie II. 2. b. **Tauopathies et variations du ratio 3R/4R, p. 16**). Nous savons que le modèle htau utilisé présente une expression préférentielle de l'isoforme 3R ([Andorfer et al. 2003](#)). Une étude récente indique qu'une diminution de l'expression de l'isoforme 3R dans le CPF médian des souris htau est en mesure de restaurer la capacité de reconnaissance d'objets à 10 mois ([Espindola et al. 2018](#)). Notons que ce test présente un paradigme expérimental différent du nôtre, avec un délai de cinq heures de rétention entre la phase de présentation et la phase de test, et sollicite majoritairement le CPF médian ([Morici, Bekinschtein, and Weisstaub 2015](#)). Cette restauration cognitive est corrélée à une diminution de plus de 50% du nombre de cellules présentant des inclusions intracellulaires de Tau (AT180 ; [Espindola et al. 2018](#)). Ces données mettent en avant l'effet positif au niveau moléculaire et comportemental d'un basculement de la production d'isoforme de 3R vers 4R. D'une manière relativement contradictoire, une étude menée deux ans auparavant expose l'effet délétère du transfert de production d'isoformes 3R vers 4R chez la même souris htau ([Schoch et al. 2016](#)). Une diminution du ratio 3R/4R était induite cette fois-ci par une diminution de l'expression de l'isoforme 3R avec des oligonucléotides anti-sens. Dans cette étude, il a été rapporté que le nombre de cellules présentant des inclusions intracellulaires de Tau (AT8) a été augmenté d'un facteur 10 au niveau du CE et du CP ([Schoch et al. 2016](#)). Malgré ces conclusions contradictoires, il apparaît que le basculement de production entre les isoformes 3R et 4R,

dans un sens ou un autre, présente un impact sur le développement de la tauopathie dans ce modèle htau. Il est donc nécessaire d'établir si le ratio formé par les isoformes 3R et 4R dans le modèle htau;TgBIN1 est rééquilibré au niveau soluble et insoluble. Une hypothèse que nous pouvons formuler et que l'interaction *in vivo* de BIN1 avec Tau peut être favorisée avec certaines isoformes dépendamment de leur niveau de polymérisation. Cela impliquerait que la protéine BIN1 pourrait agir sur le ratio 3R/4R de ces animaux htau et donc prévenir l'effet toxique découlant de son déséquilibre.

### *a. ii. Variation d'expression de BIN1 entre l'hippocampe et le cortex temporal*

Il apparaît que le niveau de pTau-Ser396 soluble n'est pas impacté par la surexpression de BIN1 entre l'hippocampe et le cortex temporal provenant des mêmes animaux htau;TgBIN1. Cependant, nous avons pu mettre en évidence une surexpression de BIN1-H de plus de 3,5 fois supérieure au niveau enregistré dans le cortex temporal des mêmes animaux htau;TgBIN1. Or, comme nous l'avons vu précédemment, BIN1-H est retrouvée sous-exprimée chez les patients atteints de LOAD au niveau du CPF (Glennon *et al.* 2013) et de l'hippocampe (Holler *et al.* 2014) indiquant que notre modèle mime l'effet inverse de ce qui est retrouvé chez les patients, et ce, de manière beaucoup plus importante au niveau de l'hippocampe. Ainsi, il se pourrait que l'un des effets délétère de BIN1 chez les patients soit médié par une baisse de l'expression de ses isoformes BIN1-H. Par conséquent, que notre modèle pourrait être en mesure de combler le déséquilibre BIN1-H/BIN1-L.

Nous savons que le site de l'anticorps AT180 (Thr231) est l'un des sites préférentiel de liaison entre le domaine SH3 de BIN1 et Tau (Sottejeau *et al.* 2015; Malki *et al.* 2017). Dès lors, nous pouvons envisager qu'une augmentation du niveau de l'isoforme BIN1-H pourrait entraîner une augmentation de la liaison entre BIN1 et Tau (4R et/ou 3R). Cela induirait, par encombrement stérique par exemple, une impossibilité d'accès à certains sites de phosphorylation de Tau, empêchant Tau de se muer en polymères toxiques (Buee *et al.* 2010). Chez les animaux htau;TgBIN1, le niveau de BIN1 est plus important au niveau de l'hippocampe que dans le cortex temporal pour un niveau d'expression identique de la protéine Tau dans ces deux structures. En conséquence, la fréquence d'apparition de ces interactions visualisée en PLA serait nettement augmentée dans l'hippocampe, expliquant pourquoi cette structure est préservée. Une étude du niveau de polymères de Tau par

extraction de la fraction insoluble au Sarkosyl, nous permettrait d'étayer plus en profondeur le niveau d'agrégation de Tau dans ces structures.

Un autre élément, pouvant intervenir en parallèle des interactions BIN1-Tau et pouvant expliquer le retard d'apparition du phénotype de tauopathie chez les animaux htau;Tg*BIN1*, est la diminution de transfert cortico-hippocampique de la pathologie Tau. En effet, nous avons vu que comme les maladies à prions, la tauopathie est en mesure de progresser dans le SNC par transfert synaptique (*Dujardin et al. 2014*). Une étude récente a mise en évidence qu'une diminution de l'expression de *Bin1* est en mesure d'induire une augmentation du transfert trans-synaptique de Tau (*Calafate et al. 2016*). Nous pouvons donc imaginer que la hausse d'expression de BIN1-H dans l'hippocampe entraîne dès lors un retard ou une diminution de ce transfert cortico-hippocampique. Le rôle fonctionnel de BIN1-H dans l'endocytose médié par son domaine CLAP pourrait expliquer la diminution du transfert comme proposé par Calafate et al. Nous pouvons également imaginé que BIN1, à travers ses interactions avec les microtubules et l'actine, puisse intervenir négativement dans l'échafaudage des nanotubes qui sont l'une des voies de propagation de Tau. Pour répondre à cette question, il serait intéressant d'effectuer des cultures neuronales en chambre micro fluidique. Il serait alors possible, en transfectant les cellules hôtes avec la protéine Tau, de déterminer si la surexpression de *BIN1* dans les cellules hôtes et/ou dans les cellules réceptrices entrainerait une modification dans le niveau de Tau retrouvé au niveau post-synaptique. Le tout pourrait être combiné à une quantification des événements d'endocytose et de formation des nanotubes.

De la même manière, l'interaction de BIN1 avec les microtubules et l'actine pourrait être présente au niveau de la TBD-AIS, où BIN1 est enrichi (*Butler et al. 1997*), permettant de préserver l'intégrité structurelle de cette barrière empêchant une délocalisation de Tau. Des expériences de microscopie à super résolution comme la technique STORM<sup>1</sup> permettrait de confirmer par co-marquage de BIN1 et de protéines d'échafaudage de l'AIS-TBD (ankyrine, spectrine) la présence de BIN1 dans cette barrière.

---

<sup>1</sup> De l'anglais, *STochastic Optical Reconstruction Microscopy* est basée sur la technique du « pointillisme » et permet d'atteindre une résolution spatiale de l'ordre de 10 à 20 nm

*a. iii. Autres variations moléculaires induites par BIN1 au niveau de l'hippocampe*

Nos données préliminaires semblent également indiquer que le niveau d'ATF6 est augmenté dans l'hippocampe de ces souris htau;TgBIN1. Si cette observation venait à se confirmer, cela pourrait sous-entendre que la surexpression de BIN1 dans cette structure est en mesure de promouvoir la dégradation des protéines qui présentent des anomalies de conformation comme c'est le cas pour la protéine Tau hyperphosphorylée. Le mécanisme de sauvetage de la tauopathie pourrait alors être en partie véhiculé par le RE avec une augmentation de la dégradation de la protéine Tau anormalement conformée. Or, la surexpression de l'isoforme 2N4R non mutée de Tau dans des cellules CHO<sup>1</sup> entraîne une altération cyto-architecturale du RE qui se manifeste par une diminution de la localisation du RE tubulaire au niveau neuritique. Cette même surexpression dans des cellules neuronales N2a<sup>2</sup> entraîne un arrêt du transport du réticulum dans les prolongements neuritiques (Ebner *et al.* 1998). Cela signifierait que la cinétique de la toxicité de la protéine Tau est accélérée par une déstabilisation du RE et de la réponse au stress cellulaire. L'observation majeure étayant l'hypothèse d'une restauration du RE chez les animaux htau;TgBIN1 est la surexpression de RTN4-A induite par la surexpression de BIN1-H. En effet, la protéine RTN4-A intervient justement dans la formation du RE tubulaire perturbé par Tau (Shibata, Voeltz, and Rapoport 2006; Voeltz *et al.* 2006; Zurek, Sparks, and Voeltz 2011; Jozsef *et al.* 2014). La surexpression de RTN4-A induite par BIN1 pourrait compenser l'effet délétère de Tau au niveau de la cyto-architecture du RE et rendre intègre ses capacités à répondre au stress cellulaire induit également par Tau.

De manière intéressante, il apparaît que la surexpression de BIN1 est en mesure d'augmenter le niveau protéique de l'APP. BIN1 pourrait alors être un acteur dans la stabilisation protéique de l'APP ce qui pourrait avoir des conséquences sur son clivage permettant la synthèse des peptides amyloïdes toxiques. L'analyse en cours par la Dr Monica Rataj Baniowska du modèle TgBIN1 combiné à un modèle d'amyloïdopathie devrait nous donner des informations sur l'impact fonctionnel *in vivo* de la surexpression de BIN1 sur ce versant de la maladie d'Alzheimer.

---

<sup>1</sup> Lignée cellulaire épithéliales dérivée d'ovaire de hamster de Chine

<sup>2</sup> Lignée cellulaire issue de neuroblastome de souris

## 2. b. Tau et le réseau microtubulaire

L'ensemble de ces éléments histologiques et moléculaires nous indiquent que l'expression de BIN1-H est un élément à prendre en considération dans la tauopathie au niveau des inclusions neuronales de Tau. Pour autant, nous avons cherché à savoir si d'autres signes pathologiques induits par Tau pouvaient être empêchés par la surexpression de BIN1-H.

Contrairement à la précédente caractérisation des souris htau (*Andorfer et al. 2003*), l'observation en microscopie électronique au niveau proximal des fibres axonales de la CA3 n'a pas révélé de défaut dans l'ultrastructure du RMT. La forme P301S de Tau entraîne des anomalies dans les fibres axonales au niveau de la moelle épinière (*Ossola et al. 2016*). Les souris modélisant cette forme de tauopathie présentaient une atrophie neuronale avec une diminution du diamètre axonal sans pour autant présenter de signe de dégénérescence à 2 mois. Il apparaît donc que l'implication de la protéine Tau dans les défauts structuraux du RMT chez les animaux htau mérite d'être approfondie.

## 2. c. BIN1 est un acteur essentiel dans les processus de myélinisation

### *c. i. La surexpression de BIN1 préserve les fibres du fornix des effets de Tau*

La phosphorylation anormale de Tau entraîne une atteinte neurodégénérative progressive qui suit le schéma cortico-hippocampique et qui affecte à la fois les corps cellulaires neuronaux et les fibres de projection (*Anderson et al. 2008*). Ainsi, il est courant de visualiser des signes de lésions de ces deux composantes cérébrales à la fois *in vivo* en IRM structurale et *post-mortem*. Il est d'ailleurs supposé que la dégénérescence de la matière blanche soit l'un des premiers signes histologiques et précliniques de la maladie d'Alzheimer (*Ringman et al. 2007*). En effet, parmi les fibres axonales de projections, le gyrus para-hippocampique, le cingulum postérieur et la région temporo-pariétale, incluant le splénium et la fimbria-fornix, sont particulièrement décrits pour leur altération (*Acosta-Cabronero et al. 2010*). Nous avons alors concentré notre étude structurale par microscopie électronique au niveau de région de la fimbria-fornix, élément central du circuit limbique particulièrement vulnérable dans la maladie d'Alzheimer (*Ringman et al. 2007; Teipel et al. 2007; Mielke et al. 2009*). Cette

structure qui fait partie du circuit de Papez<sup>1</sup>, permet entre autre la communication entre l'hippocampe et le CPF mais aussi avec des structures sous-corticales (Catani, Dell'acqua, and Thiebaut de Schotten 2013). Le fornix est également l'une des premières structures atteintes chez les patients présentant un stade intermédiaire d'atteintes cognitives ou MCI<sup>2</sup> et peut constituer un marqueur du niveau d'évolution de la maladie d'Alzheimer (Mielke et al. 2009; Nowrangji and Rosenberg 2015). Une dégénérescence de ces fibres peut être indépendante de celle de la matière grise déterminée à partir du volume de l'hippocampe (Salat et al. 2010). Cependant, les causes de la déstructuration des feuillettes de myéline liées à la maladie d'Alzheimer, sont encore énigmatiques (**voir partie II. 4. b. Tau et les oligodendrocytes, p. 25**).

Une atteinte au niveau de la gaine de myéline du fornix induite uniquement par la surexpression de la protéine Tau, a été constatée chez des souris naïves âgées de 18 mois. Des altérations de la myéline chez ce modèle htau avaient déjà été reportées dans une structure non précisée par les auteurs (Andorfer et al. 2005). En ce qui concerne les autres modèles étudiés, nous n'avons pas retrouvé ces défauts chez les animaux contrôles (*Mapt*<sup>+/-</sup>), les animaux surexprimant *BIN1* (*Mapt*<sup>+/+</sup>; *TgBIN1*), les animaux surexprimant *BIN1* dans un contexte de délétion homozygote du gène *Mapt* murin (*Mapt*<sup>-/-</sup>; *TgBIN1*) et surtout chez les animaux htau;*TgBIN1* (*Mapt*<sup>-/-</sup>; *TgMAPT*; *TgBIN1*). Il apparaît donc, que la surexpression du gène *BIN1* est en mesure de préserver l'ultrastructure des feuillettes de myéline de la dégénérescence induite par la surexpression de Tau avec délétion du gène *Mapt* murin. Nous ne pouvons pas exclure ici que le phénotype observé soit dû au concours de la perte de l'expression endogène de *Mapt* et de la surexpression de *MAPT*. Cependant, même si aucune étude n'a été effectuée sur l'organisation des fibres axonales chez le modèle de délétion homozygote du gène *Mapt* murin (*Mapt*<sup>-/-</sup>), il apparaît que la délétion homozygote de ce gène n'entraîne pas de défauts structuraux de la matière blanche analysée en IRM chez ces animaux (*Mapt*<sup>-/-</sup>) âgés de 19 à 22 mois (van Hummel et al. 2016). Par ailleurs, une étude a noté l'absence de phénotype évident au niveau de la myéline chez des souris *Mapt*<sup>-/-</sup> en dehors d'un

---

<sup>1</sup> Le circuit de Papez comprend : les noyaux antérieurs, le corps calleux, le noyau caudé, le gyrus cingulaire postérieur, le gyrus denté, le fornix, le gyrus hippocampique, le gyrus sub-calleux, l'hippocampe, les corps mamillaires, le tractus mamillo-thalamique, l'hypothalamus, le cortex pyriforme, le tuber cinereum, le tractus mamillo-tégmental et le tractus hypophysaire.

<sup>2</sup> *Mild Cognitive Impairment*



contexte d'EAE ce qui peut être expliqué par un mécanisme de compensation par les autres MAP, notamment par la surexpression observée de MAP1 (*Weinger et al. 2012*).

Le gène *BIN1* est exprimé au niveau du SNC dans les cellules neuronales mais aussi au niveau des oligodendrocytes matures (*De Rossi et al. 2016*). De précédentes études ont positivement corrélé la perte de l'immunoréactivité de BIN1 au niveau du neuropile à la perte des fibres myélinisées dans les cerveaux de patients Alzheimer (*Adams et al. 2016; De Rossi et al. 2016*). Ainsi, dans les maladies neurodégénératives telles que la LOAD et la sclérose en plaque, il est proposé que les processus de démyélinisation soient dus, en partie, à une perte substantielle de l'expression de *BIN1* au niveau de ce neuropile. De plus, la forme caractéristique de la myéline déroulée en anneaux non compacts est très similaire à celle observée dans un modèle de double délétion pour les gènes *Rtn4* et *Mag*<sup>1</sup> (*Pernet et al. 2008*). Il est donc probable que le complexe BIN1-H et RTN4-A puisse être impliqué dans la préservation des feuilletts de myéline. En effet, nous avons montré que BIN1-H est en mesure d'interagir avec RTN4-A et que l'expression de ce dernier peut être modulée par l'expression de *BIN1* dans l'hippocampe. Et, à l'instar de *BIN1*, le gène *RTN4* a été retrouvé surexprimé dans l'hippocampe de patients Alzheimer (*Gil et al. 2006*).

*c. ii. Le complexe BIN1-RTN4 pourrait réguler l'ultrastructure de la myéline*

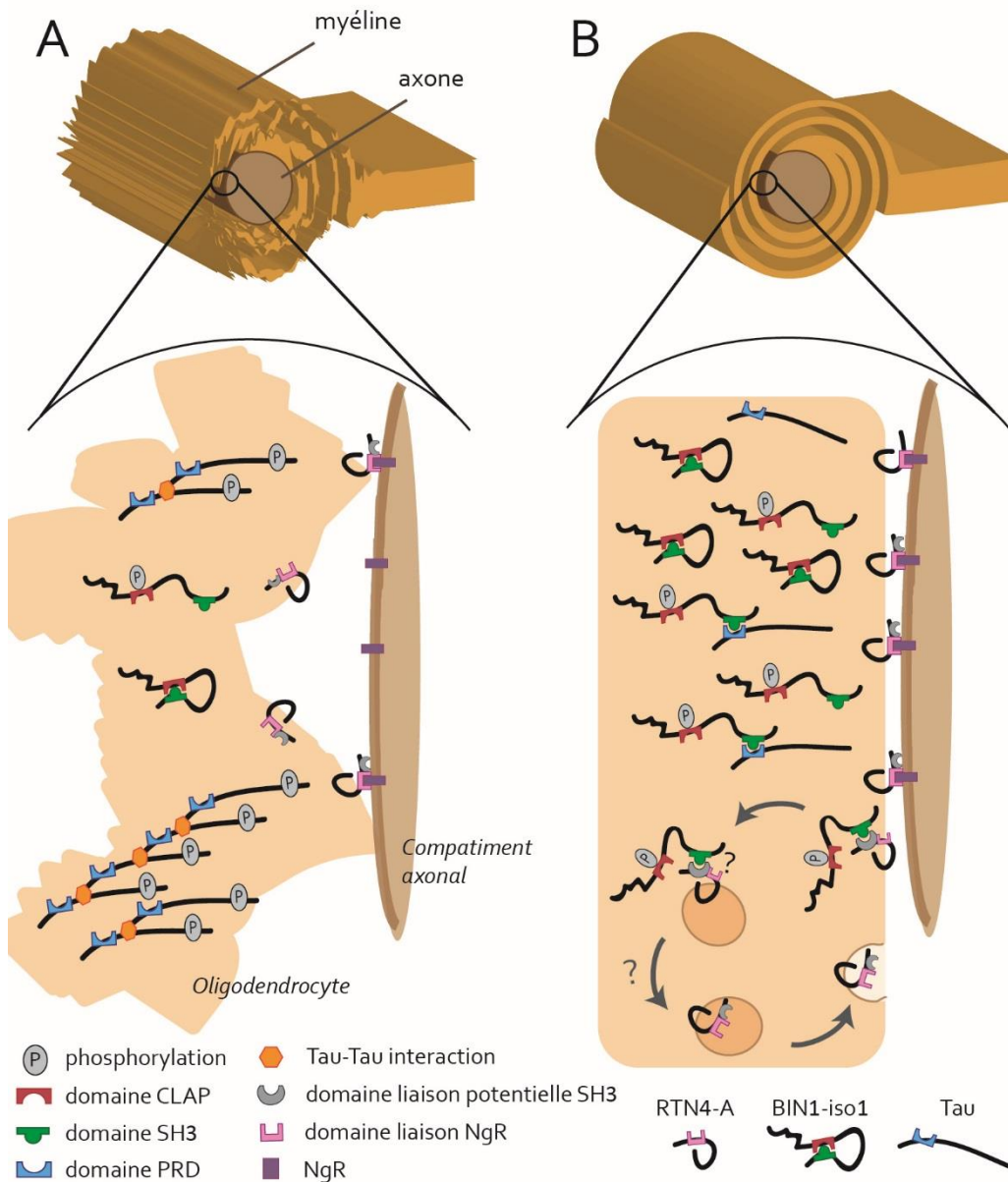
Il a été démontré *in vitro* que dans les oligodendrocytes matures la protéine RTN4-A présente une localisation préférentielle (près de 99%) au niveau intracellulaire (*Oertle et al. 2003*). La fraction membranaire (1%) peut alors interagir en fonction de sa topologie<sup>2</sup> avec son récepteur NgR présent au niveau axonal pour former un complexe au niveau des sites de contact axone-myéline après la myélinisation (*Oertle et al. 2003*). La liaison ligand-récepteur permettrait ainsi de maintenir la structure de cette gaine conductrice (*Wang et al. 2002*). Nous pouvons imaginer que la toxicité de Tau induise une modification de topologie membranaire de RTN4-A entraînant une exposition de son domaine de reconnaissance à NgR au niveau intra- et non pas extra-cellulaire le rendant non fonctionnel. La surexpression de BIN1-H et notamment de BIN1-iso1 pourrait permettre d'accroître la reconnaissance des portions membranaires où le domaine de liaison à NgR est présenté au niveau intracellulaire pour

---

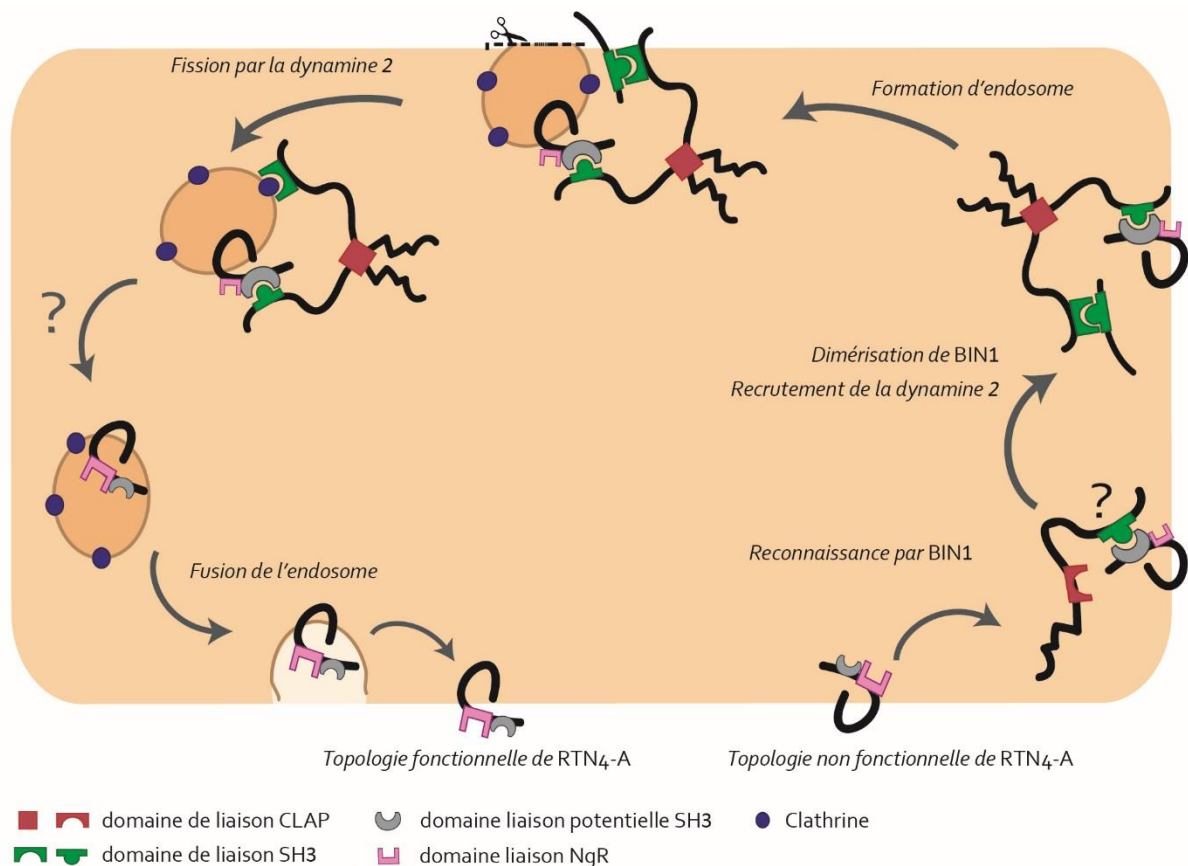
<sup>1</sup> De l'anglais, *myelin associated glycoprotein*

<sup>2</sup> Faculté des protéines transmembranaires à présenter leurs différents domaines au niveau intra- ou extracellulaire

induire l'endocytose et rééquilibrer le ratio membranaire du niveau de RTN4-A pouvant lier NgR et maintenir la gaine de myéline (**Figure 67**).



**Figure 67 : La perturbation des feuillets de myélines au niveau du fornix dans le modèle htau est préservée par la surexpression de BIN1-H et pourrait faire appel au concours de RTN4-A.** La myéline originare des oligodendrocytes est perturbée par l'action toxique des polymères de Tau dans le modèle htau. Cette toxicité pourrait passer par une modification de topologie membranaire de RTN4-A qui présenterait son domaine de reconnaissance au récepteur NgR au niveau intracellulaire le rendant non fonctionnel (**A**). L'action de sauvetage médiée par la surexpression de *BIN1* pourrait s'expliquer par deux mécanismes (**B**). Le premier fait référence à une action préventive de BIN1-iso1 sur l'agrégation de Tau comme explicité précédemment au niveau de l'hippocampe. Le deuxième implique une endocytose accrue des portions membranaires où RTN4-A expose son domaine de liaison à NgR au niveau intracellulaire pour restaurer sa présentation au niveau extracellulaire.

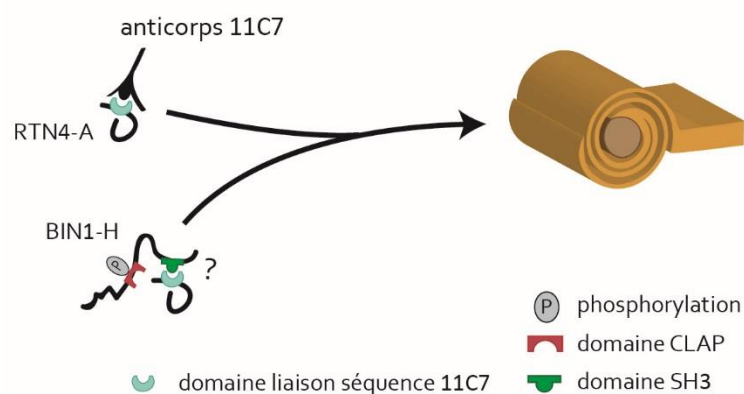


**Figure 68 : Selon notre hypothèse, sBIN1 modifierait la topologie membranaire de RTN4-A via un mécanisme d'endocytose notamment médiée par la dynamine 2**

Cette hypothèse de modification de la topologie de RTN4-A par une endocytose véhiculée par BIN1 en partie soutenue par une surexpression de la dynamine 2 au niveau de l'hippocampe dans le modèle *htau;TgBIN1* (**Figure 68**). En effet, la diminution de l'endocytose dépendante de la clathrine, par délétion du gène codant pour la dynamine 2 entraîne une perte totale de la formation de la myéline par les cellules de Schwann au niveau du SNP ([Sidiropoulos et al. 2012](#)). Si ces données venaient à être confirmées dans le SNC cela démontrerait l'importance de la dynamine 2, interacteur de BIN1, dans les processus de myélinisation. Or nos données mettent en évidence que le niveau d'expression de la dynamine 2 au niveau de l'hippocampe des souris *htau;TgBIN1* est augmenté ce qui pourrait potentiellement favoriser l'endocytose au niveau des oligodendrocytes et pourrait présenter une cascade moléculaire différente que celle neuronale. En effet, nous avons vu que la perte de BIN1 n'a pas d'impact sur l'endocytose des neurones en condition basale mais uniquement après stimulation électrique spécifiques. Par ailleurs, chez les patients atteints de LOAD, l'expression de dynamine 2 est retrouvée diminuée au niveau du CPF ([Kamagata et al. 2009](#)). Il serait donc intéressant de déterminer

quel est son niveau d'expression au niveau de l'hippocampe et du fornix chez les patients. Si celui-ci était également diminué, alors notre modèle htau;Tg*BIN1* présenterait une variation moléculaire supplémentaire, en opposition de la LOAD, et pouvant concourir au sauvetage de la tauopathie.

L'immunisation contre la protéine RTN4-A présente un rôle neuroprotecteur (*Reindl et al. 2003*). En effet, dans la sclérose en plaque, un niveau élevé d'anticorps ciblant RTN4-A a été mesuré chez les patients présentant des phases de rémissions contrairement aux patients présentant une atteinte progressive. De plus, des modèles murins d'encéphalomyélite induite par auto-immunisation (EAE<sup>1</sup>) de MOG<sup>2</sup> présentent un retard d'apparition des phénotypes lorsque ces mêmes souris présentent aussi une inhibition de RTN4-A par délétion homozygote du gène *Rtn4* ou par injection de l'anticorps α-RTN4-A (11C7 ; (*Karnezis et al. 2004*)). L'hypothèse que nous formulons est que l'interaction BIN1-RTN4 pourrait mimer les effets neuroprotecteurs de l'interaction RTN4-NgR et/ou RTN4-11C7 (**Figure 69**).



**Figure 69 : Le sauvetage de l'organisation structurale de la myéline pourrait passer par une inhibition de RTN4-A par l'interaction de BIN1 au niveau du domaine reconnu par l'anticorps 11C7 qui présente des effets neuroprotecteur.**

Enfin, une autre l'hypothèse complémentaire impliquerait que la hausse d'expression de RTN4-A ou la stabilisation de RTN4-A médié par BIN1 au niveau du fornix présente un effet positif sur les processus de myélinisation et pourrait retarder la dégénérescence induite par Tau. Cette hypothèse repose sur la notion d'effet de dose. En effet, si la délétion du gène *Rtn4* entraîne des retards dans la maturation des oligodendrocytes et dans les processus de

<sup>1</sup> De l'anglais, *experimental autoimmune encephalomyelitis*

<sup>2</sup> De l'anglais, *myelin oligodendrocyte glycoprotein*

myélinisation (*Pernet et al. 2008*), nous pouvons supposer que sa surexpression présente un caractère positif dans ces mêmes processus. Une manière de répondre à cette question serait, en co-culture de neurones et d'oligodendrocytes, d'induire une surexpression de BIN1, de RTN4-A ou des deux et de déterminer la vitesse et la qualité d'exécution des processus de myélinisation.

### III. Impact *in vivo* de la diminution d'expression de *Bin1* sur les phénotypes Tau

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons commencé à étudier l'impact d'une diminution de *Bin1* sur l'émergence des phénotypes liés au modèle htau. En effet, nous avons vu que les études portant sur l'humain mettent en évidence soit une surexpression soit une sous-expression de *BIN1* dépendamment de la structure cérébrale et des isoformes considérés. De plus, une étude récente a montré qu'une diminution d'expression de BIN1-iso1 à la fois en culture de cellules humaines (HEK293) et en culture de neurones de rat, entraînait un transfert de la protéine Tau sous sa forme mutée P301L (*Calafate et al. 2016*) ; voir partie IV. 5. f. BIN1 et la toxicité de Tau *in vivo*, p. 53).

Les cohortes d'animaux générées ont pour le moment été étudiées en reconnaissance d'objet seulement (travail en cours). Les conclusions sont établies sans distinction de sexe, puisque cette variable ne présentait aucun effet préalable dans ce test. Les résultats préliminaires indiquent à ce jour qu'une délétion hétérozygote du gène *Bin1* combinée au modèle htau induirait une perte de la mémoire à court terme en reconnaissance d'objet dès 3 mois. Ainsi, il semble que l'altération de cette forme de mémoire puisse être due à un effet synergique de la surexpression Tau combiné à la variation d'expression de *Bin1/BIN1*. Avec une homologie de 95% des séquences protéiques humaine et murine de BIN1, et en considérant que leurs activités biologiques sont similaires chez la souris, nous pouvons conclure que ce gène présente un effet de dose. Un juste niveau d'expression de ce gène, et un équilibre BIN1-H/BIN1-L, est nécessaire pour au moins préserver l'intégrité du cortex temporal, premier affecté dans le développement de la tauopathie chez les patients Alzheimer (*Braak and Braak 1991*). Afin de confirmer les effets protecteurs d'une surexpression de BIN1-H au niveau de l'hippocampe, il serait intéressant de savoir quels sont les effets d'une diminution de l'expression de *Bin1* sur l'émergence du phénotype d'altération de la mémoire spatiale due à la surexpression de Tau.

#### IV. Implication du sexe dans la modélisation de la maladie d'Alzheimer

Nous avons étudié l'impact d'une surexpression de *BIN1* dans le modèle htau à la fois chez les mâles et les femelles. Nos données révèlent que le sexe n'a pas d'incidence sur l'âge d'atteinte de la mémoire à court terme qui est cortico-dépendante. Cependant, il n'est pas exclu que les cinétiques moléculaires et pathologiques présentent des profils différents entre les mâles et les femelles. En effet, nous avons observé que la mémoire spatiale à long terme est préservée indépendamment du sexe jusqu'à 12 mois mais que seul les mâles continuent à présenter cette caractéristique à 15 mois. Ainsi, le potentiel thérapeutique de BIN1-H sur l'émergence des signes comportementaux, histologiques et cellulaires induits par Tau présenterait une cinétique plus courte chez les femelles. Nous avons préalablement noté que le sexe est le deuxième facteur de risque dans les cas de LOAD. De plus, les femmes sont plus susceptibles de développer des maladies co-morbides à la maladie d'Alzheimer comme l'obésité ou le diabète (*Vina and Lloret 2010*). Les hypothèses expliquant ce phénomène sont nombreuses. Citons tout d'abord le rôle neuroprotecteur des œstrogènes produits durant la période de fécondité, qui est perdu après la ménopause chez les femmes (*Vina and Lloret 2010*). En effet, il est proposé que les œstrogènes stimulent la production d'enzymes possédant des rôles antioxydants. Ainsi, les ROS produites par les mitochondries, sous l'effet de la toxicité intracellulaire des peptides A $\beta$ 40-42, sont limités chez les jeunes rates par rapport aux mâles et aux femelles âgées (*Lloret et al. 2008*). Chez les patients Alzheimer, le nombre de neurones exprimant le récepteur nucléaire aux œstrogènes  $\alpha$  s'amenuise dans l'hippocampe (*Hu et al. 2003*). Par ailleurs, ce récepteur est impliqué dans l'augmentation de la phosphorylation de Tau (*Xiong et al. 2015*).

Chez la « jeune » souris C57BL/6J âgée de 2 à 8 mois, les cycles œstriens ont une durée de 4 jours et se répètent donc 6 fois par mois. Seulement avec l'âge, la durée des cycles augmente et entraîne donc une diminution constante du nombre de cycles par mois, jusqu'à atteindre un arrêt des cycles chez les souris âgées de 12-15 mois (*Nelson et al. 1982*). Les valeurs hormonales plasmatiques sont positivement corrélées avec ces données, ce qui se traduit par une diminution des œstrogènes circulants avec l'âge (*Nelson and Felicio 1990*). Cependant, aucune donnée concernant les cycles des femelles n'a été collectée durant notre étude, mais nous pouvons tout de même penser que la perte de l'effet curatif de *BIN1* sur la mémoire spatiale chez les femelles pourrait être due en partie aux variations hormonales. En effet, la

fin de l'effet protecteur de *BIN1* chez les femelles coïncidait avec l'âge auquel les femelles présenteraient une forte diminution du taux d'œstrogènes circulants (12-15 mois).

Nous avons vu en introduction que la région promotrice de *Bin1* révèlent la présence d'une séquence de reconnaissance au messager secondaire NF-κB (*Mao et al. 1999*). Ce facteur de transcription est notamment impliqué dans la réponse cellulaire à un stress comme les ROS (*Kaltschmidt et al. 2000; Shalizi and Bonni 2005*). De manière intéressante, une sur-activation de la cascade protéique modulée par NF-κB révèlent que cet élément est un régulateur de la formation des éléments pré- et post-synaptique et qu'à l'âge adulte cette voie NF-κB peut être activé par les œstrogènes (*Boersma et al. 2011*). À l'inverse, une inhibition de cette cascade NF-κB entraîne une perte de dépression à long terme des neurones de la CA1 (*Albensi and Mattson 2000*) et une diminution drastique de la complexité architecturale (par analyse de Sholl) du réseau neuritiques<sup>1</sup> très similaire à celle que nous avons observée (*Gutierrez et al. 2005*). De plus, chez la souris, une perte de fonction de NF-κB, par délétion de son élément p65 qui lui est constitutif, entraîne une perturbation de la mémoire spatiale et de travail<sup>2</sup> (*Meffert et al. 2003*).

Nous pouvons donc supposer que la perte circulante d'œstrogène chez les femelles, entre 12-15 mois, induise une diminution d'activation de la voie NF-κB. Cela aurait pour possible conséquence l'émergence d'une susceptibilité accrue aux phénotypes liés à NF-κB précédemment décrits. Au contraire la production permanente de testostérone (*Nelson, Latham, and Finch 1975*) chez les souris mâles et sa métabolisation cérébrale en estrogènes (*Toran-Allerand 2005*) leur permettrait de prévenir la diminution d'activité de la voie NF-κB. Ainsi, l'apport d'œstrogènes chez la femme ménopausée est suggérée comme prophylactique uniquement lorsqu'elle intervient à un moment relativement proche de la ménopause ou suivant une hystérectomie. La fenêtre temporelle permettant d'initier l'activité neuro-protectrice des œstrogènes apparait donc restreinte mais peut prévenir le déclin cognitif sur une période de trente ans (*Sherwin 2012*).

---

<sup>1</sup> Neurones extraits de ganglions rachidiens de souris et transfectées avec un répresseur de NF-κB

<sup>2</sup> Mémoire testée en labyrinthe radial avec des indices spatiaux sollicitant de la mémoire allocentrique

## Conclusion générale

---

Ce travail de thèse apporte des éléments de réponse aux questions biologiques qui ont été posées. Contrairement à la diminution du ratio BIN1-H/BIN1-L retrouvée dans les cerveaux atteints de LOAD, notre modèle Tg*BIN1* présente une augmentation de ce ratio. Les défauts observés au niveau de la mémoire à court terme, de la potentialisation à long terme au niveau du GD avec atteintes architecturales des arbres et des épines dendritiques peuvent être la résultante d'un effet pathologique séquentiel associé à une augmentation du ratio BIN1-H/BIN1-L, non décrit chez l'humain et indépendant de Tau ou de l'amyloïde. Au regard des atteintes séquentielles et sélectives des mémoires et des connectomes, le modèle de surexpression de *BIN1* présente, dans un sens, une certaine validité phénoménologique. L'absence de traitement curatif chez l'humain nous empêche de déterminer la validité prédictive du modèle. La validité constructive ne peut pas être étayée en l'absence de marqueurs de la maladie d'Alzheimer, à savoir les dépôts amyloïdes et la toxicité de Tau. Nous avons tenté de franchir partiellement cette limite en combinant ce modèle Tg*BIN1* et un modèle humanisé pour le gène *MAPT* sans mutation et donc relativement proche de la tauopathie retrouvée dans la maladie d'Alzheimer. Si des effets synergiques ont été identifiés au niveau de la mémoire à court terme, nos données révèlent que le ratio BIN-H/BIN1-L dans ces souris, opposé à celui retrouvé dans la LOAD, présente un fort potentiel de traitement symptomatique de la pathologie Tau-dépendante au moins du système hippocampique. Ainsi l'expression de ce gène humain chez la souris permet de maintenir la mémoire spatiale, de prévenir les inclusions de Tau dans l'hippocampe et le CP, et de maintenir intègre la structure de la myéline du fornix. La prévention de la tauopathie passerait par un mécanisme d'interaction directe entre BIN1-H et Tau régulé par la phosphorylation de ces protéines. Ce potentiel neuroprotecteur de BIN1-H est également dépendante du sexe et de l'âge. Nos observations supportent donc l'idée selon laquelle le gène *BIN1* peut être considéré comme un acteur important dans la maladie d'Alzheimer et plus particulièrement dans la LOAD. En outre, un des effets préventif de BIN1 sur l'émergence des phénotypes altérés par Tau semble être médié par l'interaction BIN1-RTN4. Ce complexe moléculaire pourrait permettre de maintenir à la fois la réponse au stress cellulaire véhiculée par le RE et l'organisation ultra-structurale des feuillettes de myéline.



L'ensemble de ces données permettent donc de mieux comprendre les mécanismes physiologiques et pathologiques induit par BIN1 au niveau cérébral et de pouvoir replacer cette protéine dans un contexte moléculaire et cellulaire formé par BIN1, AMPH1, RTN4, dynamine 2 et Tau.

La poursuite du travail de recherche sur l'implication de BIN1 dans la maladie d'Alzheimer pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, qui pourraient être géniques et ciblés dans le temps et dans l'espace neuro-anatomique. Cependant, comme tout modèle, celui-ci présente des limites dont il faudra s'affranchir avant toute étude translationnelle. Premièrement, nous avons vu que les connaissances scientifiques sur l'expression de *BIN1* en terme de niveau protéique, d'isoformes ainsi que de localisation cellulaire et anatomique présentaient des lacunes en condition physiologique et pathologique à la fois chez l'être humain et chez la souris.

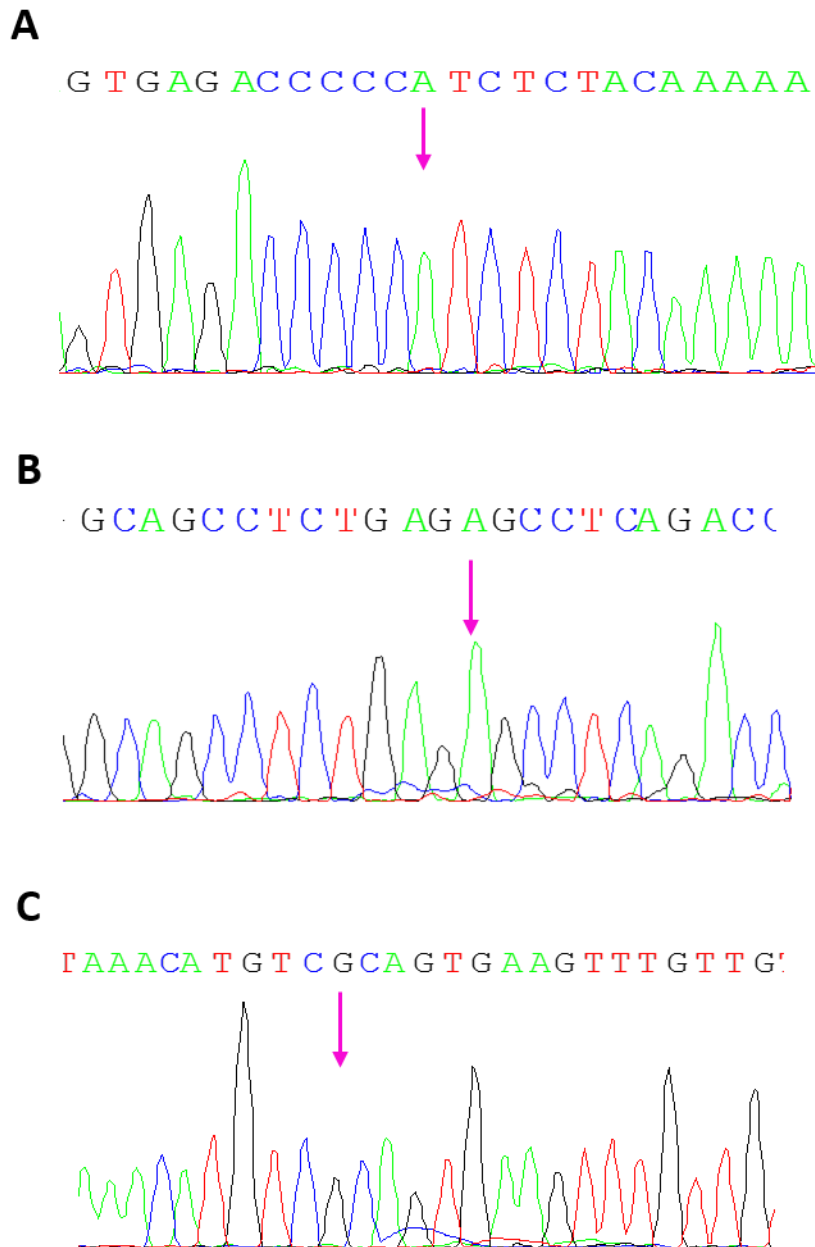


# Annexes

## I. Figures supplémentaires

**EXON 1** ATGGCAGAGATGGGCAGTAAAGGGGTGACGGCGGGAAAGATCGCCAGCAACGTGCAGAAGAAGCTCACCCGCGGCAGGAGAAG  
**EXON 2** GTTCTCCAGAAGCTGGGAAGGCAGATGAGACCAAGGATGAGCAGTTTGAGCAGTGCCTCCAGAATTTCAACAAGCAGCTG  
**EXON 3** ACGGAGGGCACCCGGTGCAGAAGGATCTCCGGACCTACCTGGCCTCCGTCAAAG  
**EXON 4** CCATGCACGAGGCTTCCAAGAAGCTGAATGAGTGTCTGCAGGAGGTGTATGAGCCCGATTGGCCCGCAGGGATGAGGCAAACAA  
GATCGCAGAG  
**EXON 5** AACACGACCTGCTGTGGATGGATTACCACCAGAAGCTGGTGGACCAGGCGTGCTGACCATGGACACGTACCTGGGCCAGTTCCC  
CGACATCAAG  
**EXON 6** TCACGCATTGCCAAGCGGGGGCGCAAGCTGGTGGACTACGACAGTGCCCGCACCCTACGAGTCCCTTCAAAGTCCAAAAAGAA  
GGATGAAGCCAAAATTGCCAAG  
**EXON 7** CCTGTCTCGCTGCTTGGAAAAGCCGCCCCCAGTGGTGCCAAGGCAAAGTGCAGGCTCATCTCGTAGCTCAAAGTAACTGCTCCGA  
AATCAG  
**EXON 8** GCCGAGGAGGAGCTCATCAAAGCCCAGAAGGTGTTTGGAGAGATGAATGTGGATCTGCAGGAGGAGCTGCCGTCCTGTGGAACAG  
**EXON 9** CCGCGTAGGTTTCTACGTCAACACGTTCCAGAGCATCGCGGGCCTGGAGGAAAATTCCACAAGGAGATGAGCAAAG  
**EXON 10** CTCAACCGAAGCTCAATGATGTGCTGGTCCGCTGGAGAAGCAACACGGAGCAACACCTTACCGTCAAGGCCAGCCAG  
**EXON 11** GAGCCAGAGCCGGCCGCGAAAGAAAAGTAAACTGTTTTCGCGGCTGCGCAGAAAGAAGAACAG  
**EXON 12** TGACAACGCGCTGCAAAGGGGAACAAGAGCCCTTCGCTCCAGATGGCTCCCTGCCGCCACCCCGAGATCAGAGTCAACCAC  
GGGCCACGCCCGGGCCACCCTCCCAAGTCCCATCTC  
**EXON 13** AGCTCCGAAAGGCCACCAGTCCCTCCGCTCCAAACACACCCCGTCCAAGGAAGTCAAGCAGGAGCAGATCCTCAGCTGTTT  
GAGGACACGTTTGTCCCTGAGATCAGCGTGACCACCCCTCCAG  
**EXON 14** TTTGAGGCCCCGGGCTTTTCTCGGAGCAGGCCAGTCTGCTGGACCTGGACTTTGACCCCTCCGCCCCGTGACGAGCCCTGTGA  
AGGCACCCACGCCCTCTGGTCAG  
**EXON 15** TCAATTCCATGGGACCTCTGGGAG  
**EXON 16** CCCACAGAGAGTCCAGCCGGCAGCCTGCCTTCGGGGAGCCAGCGCTGCCGAGGGCACCTTTGCTGTGCTCTGGCCAGCCA  
GACGGCCGAGCCGGGCTGCCAA  
**EXON 17** CCAGCAGAGGCTCGGAGGTGGCGGGTGGGACCCAACTGCGGCTGGAGCCAGGAGCCAGGGGAGACGGCGCAAGTGA  
AGCAGCTCC  
**EXON 18** AGCTCTTCTCTGCTGTGCTGGTGGAGACCTCCAGCAACTGTGAATGGCACCTGGAGGGCGGCAGTGGGGCCGGGCGCTT  
GGACCTGCCCCAGGTTTCATGTTCAAG  
**EXON 19** GTACAGGCCAGCAGACTACACGGCCACTGACACAGACGAGCTGCAGCTCAAGGCTGGTGTGCTGGTGTGATCCCTTC  
CAGAACCCTGAAGAGCAG  
**EXON 20** GATGAAGGCTGGCTCATGGGCGTGAAGGAGAGCGACTGGAACCAGCACAAGGAGCTGGAGAAGTGCCGTGGCGTCTTCCCCG  
AGAACTTCACTGAGAGGGTCCCATGA

**Figure S 1 : Séquences codantes du gène *BIN1* contenu dans le clone utilisé.** Séquences obtenues après séquençage des exons de *BIN1* du clone utilisé pour le modèle murin de surexpression.



**Figure S 2 : Chromatogrammes des séquences de la région promotrice du gène BIN1.** Les couleurs noire, bleue, rouge et verte représentent respectivement les bases G, C, T et A. Les régions sélectionnées contiennent les bases polymorphiques, indiquées par une flèche violette, corrélées à la surexpression de BIN1 (A, rs59335482, Chapuis C et al; 2013), au déclin cognitive et à la progression de la maladie d'Alzheimer (B, rs744373, Zhang et al. 2015) et à une atrophie de l'hippocampe (C, rs7561528, Wang et al. 2016).

## FIGURES SUPPLEMENTAIRES

**A** Clone #1: 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-12-13-14-15-16-17-18-19-20

**B** Clone #2: 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-17-18-19-20

**C** Clone #3: 1-18-19-20

Clone #8: 1-2-3-4-5-6-7-18-19-20

Clone #4: 1-2-3-4-19-20

Clone #9: 1-2-3-4-5-6-17-18-19-20

Clone #5: 1-2-3-4-5-19-20

Clone #10: 1-2-3-4-5-6-8-9-12-13-17-18-19-20

Clone #6: 1-2-3-4-5-6-19-20

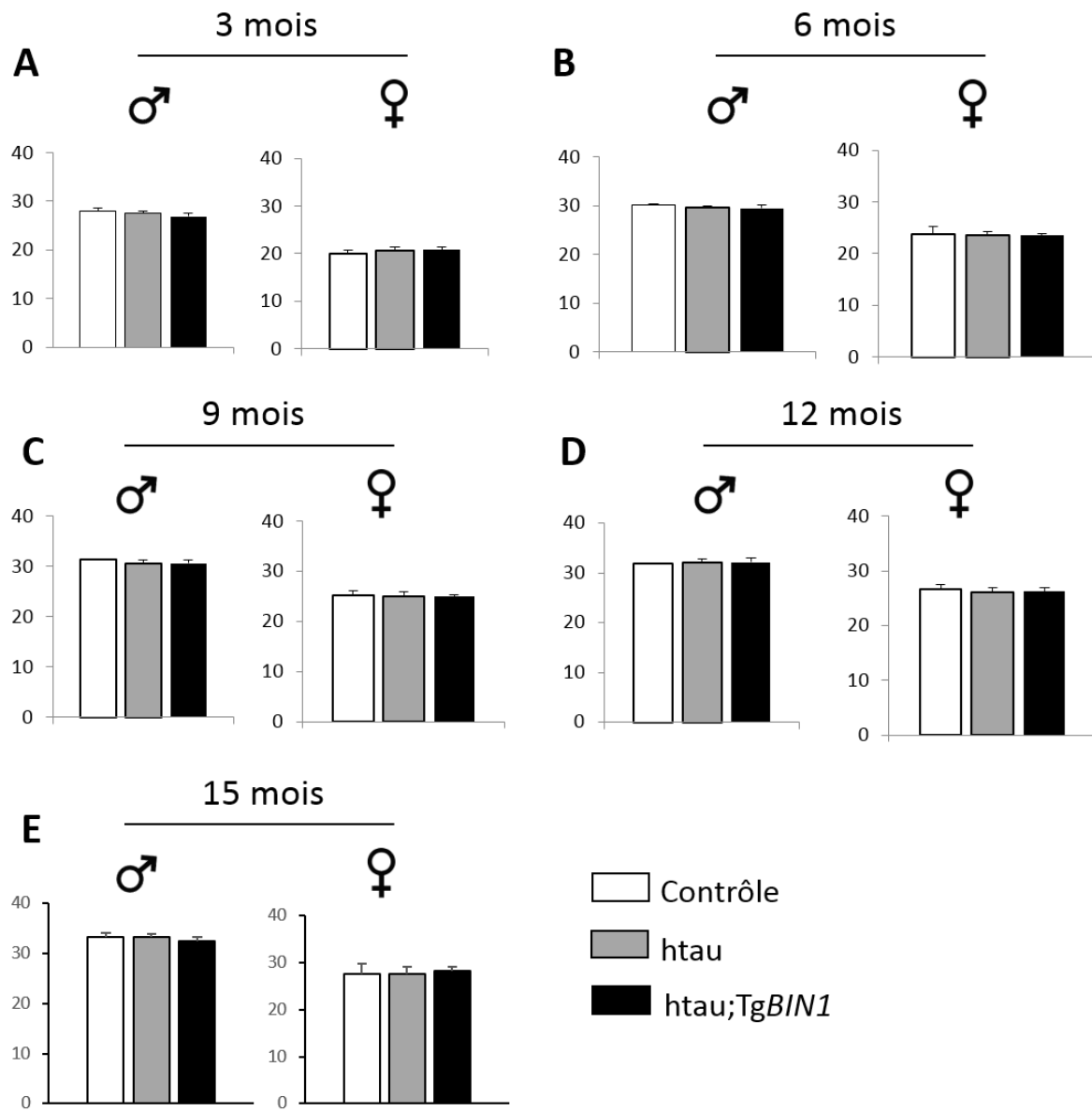
Clone #11: 1-2-3-4-5-6-8-9-10-12-13-17-18-19-20

Clone #7: 1-2-3-4-5-6-18-19-20

**Figure S 3 : Représentation des ARNm de BIN1, en termes d'exons inclus.** Ces clones ont été obtenus après clonage des ARNm issus d'un hippocampe de souris Bin1-/-;TgBIN1. Les résultats indiquent la présence de l'isoforme neuronale#1 (A), l'isoforme ubiquitaire (B) et d'autres isoformes (C)

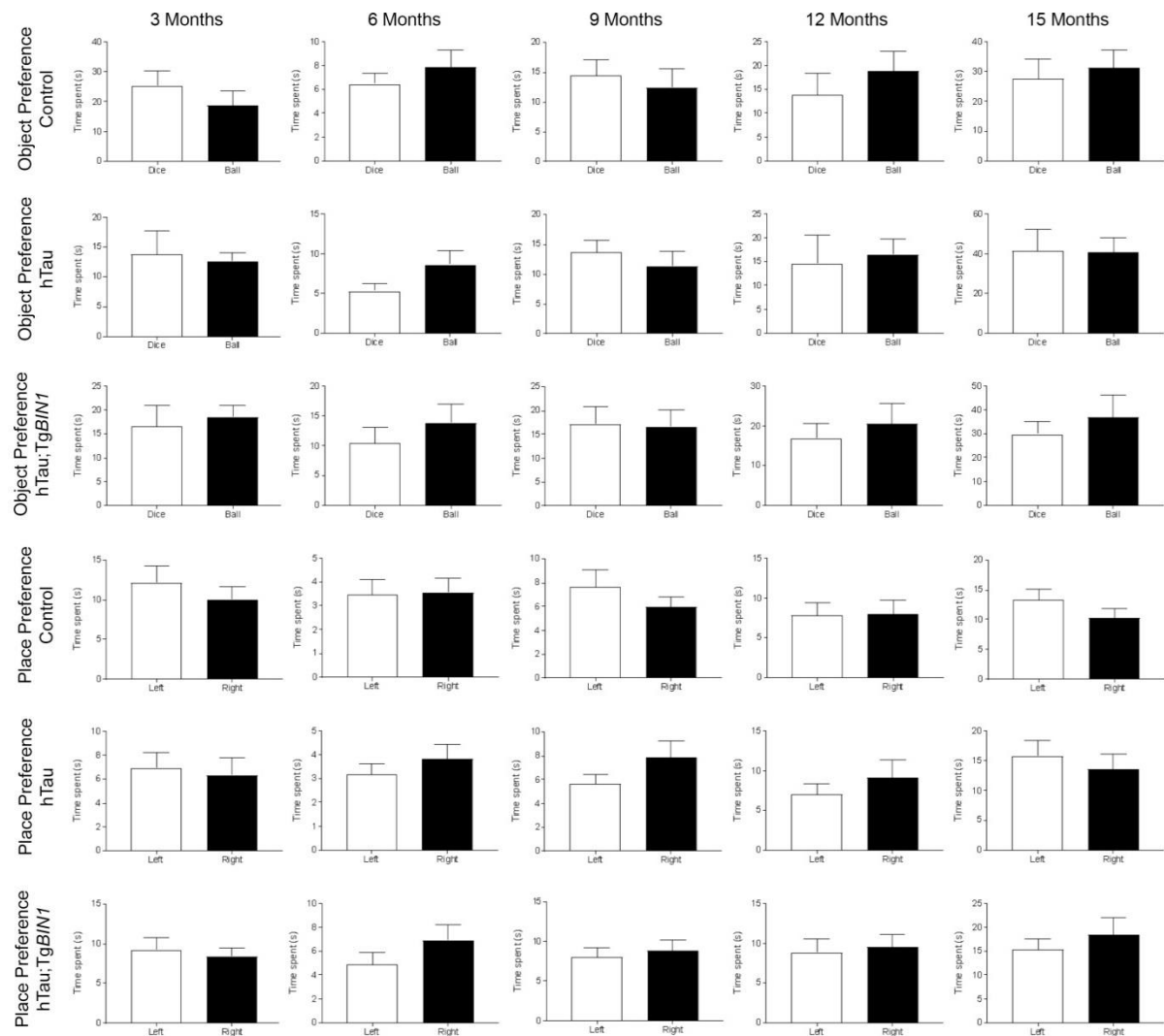
MEDLDQSPLVSSSDSPRPQPAFKYQFVREPEDEEEEEEEEEDEDEDLEELEVLERKPAAGLSAAPVPTAPAAG  
APLMDFGNDFVPPAPRGPLPAAPPVAPERQPSWDPSPVSSTVPAPSPLSAAAVSPSKLPEDDEPPARPPPPPPAS  
VSPQAEVWTPPAPAPAAPPSTPAAPKRRGSSGSVDETLFALPAASEPVIRSSAENMDLKEQPGNTISAGQEDFP  
SVLLETAASLPSLSPLSAASFKEHEYLGNLSTVLPTEGTLQENVSEASKEVSEKAKTLLIDRDLTEFSELEYSEM  
GSSFSVSPKAESAVIVANPREEIIIVKNKDEEEKLVSNNILHNQQELPTALTCLVKEDEVVSEKAKDSFNEKRVA  
VEAPMREEYADFKPFERVWEVKDSKEDSDMLAAGGKIESNLESKVDKCCFADSLEQTNHEKDSSESNDDTSFPST  
PEGIKDRSGAYITCAPFNPAATESIATNIFPLLDGPTSENKTDEKKIEEKKAQIVTEKNTSTKTSNPFVAAQDS  
ETDYVTTDNLTKVTEEVVANMPEGLTPDLVQEACESELNEVTGTKIAYETKMDLVQTSSEVMQESLYPAAQLCPSF  
EESEATPSPVLPDIVMEAPLNSAVPSAGASVIQPSSSPLEASSVNYESIKHEPENPPPYEEAMSVSLKKVSGIKE  
EIKEPENINAALQETEAPYISIACDLIKETKLSAEPAPDFSDYSEMAKVEQVDPDHSELVEDSSPDSEPVDFSD  
DSIPDVPQKQDETVMLVKESLTETSFESMIEYENKEKLSALPPEGGKPYLESFKLSLDNTKDTLLPDEVSTLSKK  
EKIPLQMEELSTAVYSNDDLFI SKEAQIRETETFS DSSPIEIIIDEFPTLISSKTDSFSKLAREYTDLEVSHKSEI  
ANAPDGAGSLPCTELPHDLSLNKIQPKVEEKISFSDDFS KNGSATS KVVLLPPDVSALATQAEIESIVKPKVLVK  
EAEKKLPSDTEKEDRSPSAIFSAELSKTSVVDLLYWRDIKKTGVVFGASLFLLSLTVFIVSVTAYIALALLSV  
TISFRIYKGVIAIQKSDEGHPPFRAYLESEVAISEELVQKYSNSALGHVNCTIKELRRLFLVDDLVDLSLKFAVLM  
WVFTYVGFALFNGLTLLILALISLFSVPVIYERHQAQIDHYLGLANKNVKDAMAKIQAKIPGLKRKAE

**Figure S 4 : Séquence protéique de RTN4-A avec en vert une séquence consensus de reconnaissance des domaines SH3.**

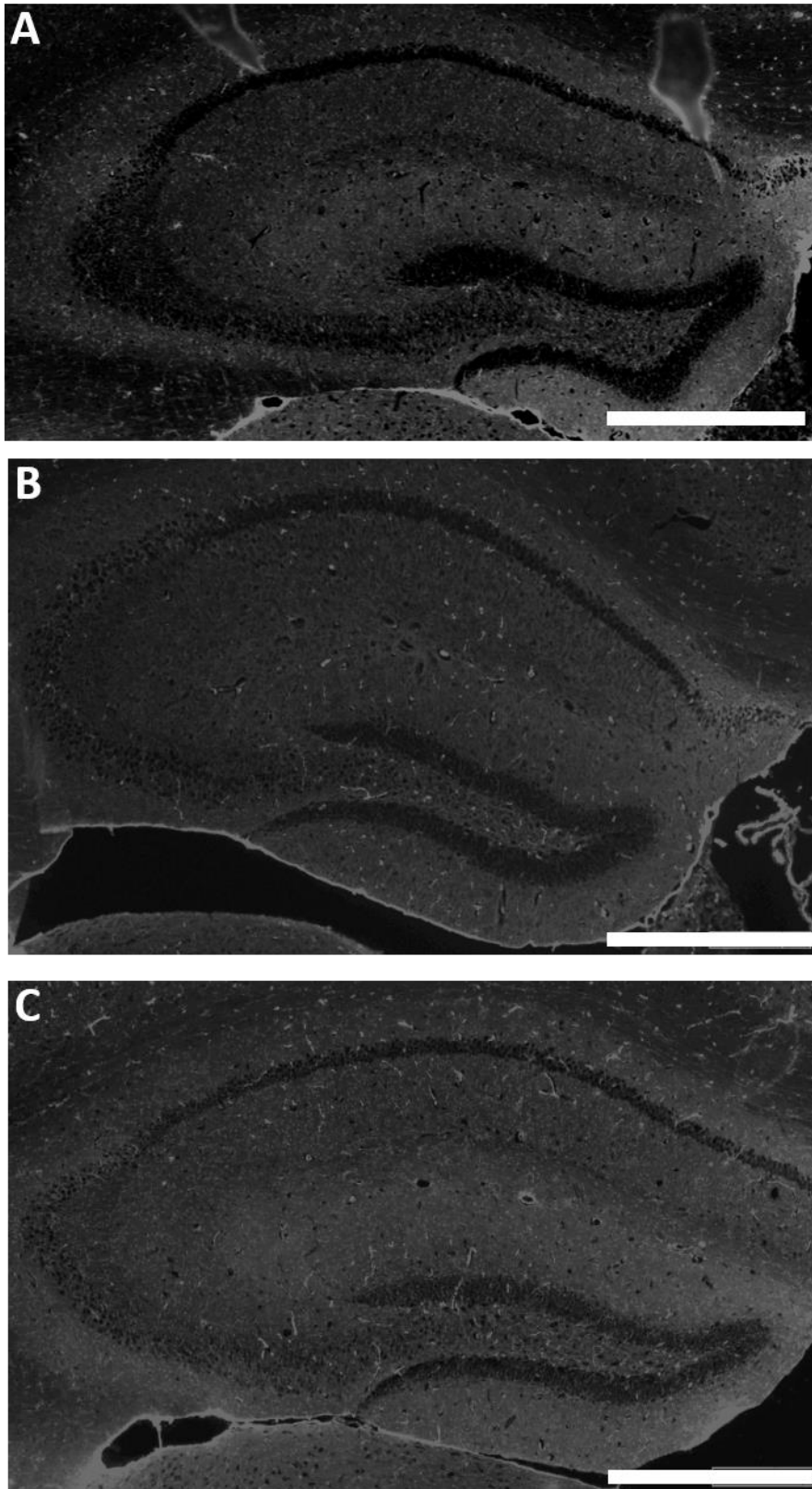


**Figure S 5 : Poids des animaux htau;TgBIN1 à 3 (A), 6 (B), 9 (C), 12 (D) et 15 (E) mois.** Les données, moyenne  $\pm$  SEM, suivent une loi normale selon le test de Shapiro-Wilk et ont été analysées avec un test t de Student. Seuil  $\alpha < 0,05$

FIGURES SUPPLEMENTAIRES



**Figure S 6 : Préférence de place et d'objet lors du test de reconnaissance d'objet chez les souris htau;TgBIN1 à 3, 6, 9, 12 et 15 mois.** Le temps passé sur chaque objet (dé ou bille) et le temps passé sur chaque position (droite et gauche) ont été mesurés sans distinction de sexe durant la phase de présentation des objets. Les données, représentées en moyenne  $\pm$  SEM, ont été analysés avec un t-test de Student



**Figure S 7 : contrôle des immunomarquages de Tau et phospho-Tau en présence uniquement de l'anticorps secondaire.** Images représentatives des coupes adjacentes à celles ayant servi pour le marquage de tau (A), de AT8 (B) et AT180 (C). Echelle=500µm



## II. Tableaux supplémentaires

Primers	5'→3'
Mapt KI WT UP	CTCAGCATCCCACCTGTAAC
Mapt KI WT DW	CCAGTTGTGTATGTCCACCC
Mapt KI Tg UP	AAGTTCATCTGCACCACCG
Mapt KI Tg DW	TGCTCAGGTAGTGTTGTGCG
TgMAPT (mut) UP	ACTTTGAACAGGATGGCTGAGCCC
TgMAPT (mut) DW	CTGTGCATGGCTGTCCACTAACCTT
TgMAPT (WT) UP	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
TgMAPT (WT) DW	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
TgBIN1 UP	CGAGGCCTGCGCCGCGATGGC
TgBIN1 DW	CGCAGCCTGGGGACCTCGAAG
rs59335482 UP	CCAGGCTCAAGCAATCCTCCTA
rs59335482 DW	ATTTGTGTTCAAGGCAGCAGGGAGG
rs744373 UP	CTGAGGGATCTCACCTTTGACCTGA
rs744373 DW	AGTCCATCTTCTTGCTCTCCAGCAC
rs7561528 UP	CACTTACCCCAAATGTGGAAGT
rs7561528 DW	GAGCTATCAGCATAAGAAGTGTATGC

Tableau S 1 : Séquences des amorces utilisées pour le génotypage et pour le séquençage des polymorphismes de *BIN1*

Anticorps	Référence
Tau [E178]	<a href="#">Abcam</a> , ab32057
KDEL [10C3]	<a href="#">Abcam</a> , ab12223
BIN1 [C99D]	Sigma, B9428
RTN4-A	Bio-Rad, AHP1799
<a href="#">Phospho Tau Thr231</a> [AT180]	Thermo Scientific, MN1040
Phospho Tau Ser202, Thr205 [AT8]	Thermo Scientific, MN1020
<a href="#">Verify Blot</a> (secondaire, HRP)	<a href="#">Abcam</a> , ab131366

Tableau S 2 : Récapitulatif des anticorps utilisés

Exon	oligonucléotide	Séquence
1	F BAD211	ATTAACCCTCACTAAAGGGAGTCAGTTGGCTCCGCTGT
	R BAD212	TAATACGACTCACTATAGGGAGGATAGGGGGACAGGTG
2	F BAD213	ATTAACCCTCACTAAAGGGATGGTGACTGAGCACTCTTGG
	R BAD214	TAATACGACTCACTATAGGGCTCCACAAATTCAGCTCGTG
3-4	F BAD215	ATTAACCCTCACTAAAGGGAGAGAGCAGCCTGGTTCATTC
	R BAD216	TAATACGACTCACTATAGGGCAGAGAGGCTTGTCCAGAG
5	F BAD217	ATTAACCCTCACTAAAGGGAACATTTGCCCCATCTTACA
	R BAD218	TAATACGACTCACTATAGGGGTCTAGGCCCTGTCTCTC
6	F BAD219	ATTAACCCTCACTAAAGGGAGATCCACTGGACCTGGAGTC
	R BAD220	TAATACGACTCACTATAGGGCACAAGGGCCTCTCACTCAC
7	F BAG303	ATTAACCCTCACTAAAGGGACCTAATTCCTCGGCCTCAA
	R BAG304	TAATACGACTCACTATAGGGAGCAGAGCTCTCCAGCA
8	F BAD221	ATTAACCCTCACTAAAGGGAATGGGTGTCCACATCCAGTT
	R BAD222	TAATACGACTCACTATAGGGCACTCAGGCTGGACACTGC
9	F BAD223	ATTAACCCTCACTAAAGGGACTGGTTTGTGCCTCTGATGA
	R BAD224	TAATACGACTCACTATAGGGCCTCCCAGACTCTGACTCT
10	F BAD225	ATTAACCCTCACTAAAGGGAATGGGGAAAGAGGAGCTTGT
	R BAD226	TAATACGACTCACTATAGGGACCAACAGGGTCACAGGAAG
11	F BAD171	ATTAACCCTCACTAAAGGGATCCTCTGAGCAGAAGGGTTG
	R BAD172	TAATACGACTCACTATAGGGCACTGCACACAGAGCCAGAT
12	F BAD227	ATTAACCCTCACTAAAGGGATGCACACACCTCTTCACACA
	R BAD228	TAATACGACTCACTATAGGGATGGAGGACAACAGCAAAGC
13	F BAG305	ATTAACCCTCACTAAAGGGATGTGACTAACCGTGGCTTTG
	R BAG306	TAATACGACTCACTATAGGGTGGCTCTTGAGACAGAAGCA
14	F BAG307	ATTAACCCTCACTAAAGGGAGTGTATGTGCGCTTGCTCTG
	R BAG308	TAATACGACTCACTATAGGGAGGTGATGAGGGCTGAAGG
15	F BAG309	ATTAACCCTCACTAAAGGGATGAAGCTCCCTGAGAGGTGT
	R BAG310	TAATACGACTCACTATAGGGCTGTGAACAGGCTAGGAGCA
16	F BAG311	ATTAACCCTCACTAAAGGGACCGCTGGTGACATTTCTCT
	R BAG312	TAATACGACTCACTATAGGGCTGTCTCACCTCACATCC
17	F BAD229	ATTAACCCTCACTAAAGGGAGTTTCCTGTGTCTGGCTGT
	R BAD230	TAATACGACTCACTATAGGGTCCAGCTTCCTCAACAGGAG
18	F BAD231	ATTAACCCTCACTAAAGGGACTCCTGTTGAGGAAGCTGGA
	R BAD232	TAATACGACTCACTATAGGGAGTAGCGCCTGCACAACTTT
19	F BAD173	ATTAACCCTCACTAAAGGGAGCATCTGAGCCCCATACTGT
	R BAD174	TAATACGACTCACTATAGGGGCCAGGATGCCTGTGGTC
20	F BAD175	ATTAACCCTCACTAAAGGGACCTGGAGGAGGTGTTCTCAA
	R BAD176	TAATACGACTCACTATAGGGGGGTCTCTCTTGATTTC

Tableau S 3 : Séquences des amorces utilisées pour le séquençage des exons de *BIN1*

Identification en MS/MS	WB Co-IP BIN1	WB Co-IP interacteur		PLA	Tubuline	Merge
Erlin2	?	?	+ $\alpha$ -C99D			
			$\emptyset$ $\alpha$ -C99D			
G3BP	?	?	+ $\alpha$ -C99D			
			$\emptyset$ $\alpha$ -C99D			
Synaptojanin 1	?	?	+ $\alpha$ -C99D			
			$\emptyset$ $\alpha$ -C99D			
COP1	?	?	+ $\alpha$ -C99D			
			$\emptyset$ $\alpha$ -C99D			
Dyn1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		?		
Dyn2	<input checked="" type="checkbox"/>	?		?		
Amph1	<input checked="" type="checkbox"/>	?		?		

Tableau S 4 : récapitulatif de des observations effectuées par nos méthodes de validation des interacteurs isolés en MS/MS.

### III. Glossaire des interacteurs potentiels de BIN1 isolées par MS/MS

**Actr1b** : ARP1 actin-related protein 1B, centractin beta; Component of a multi-subunit complex involved in microtubule based vesicle motility. It is associated with the centrosome (By similarity)

**Aldoa** : aldolase A, fructose-bisphosphate; Plays a key role in glycolysis and gluconeogenesis. In addition, may also function as scaffolding protein (By similarity)

**Ampd2** : adenosine monophosphate deaminase 2; AMP deaminase plays a critical role in energy metabolism (By similarity)

**Amph** : amphiphysin; May participate in mechanisms of regulated exocytosis in synapses and certain endocrine cell types. May control the properties of the membrane associated cytoskeleton (By similarity)

**Ankrd63** : ankyrin repeat domain 63

**Ap1b1** : adaptor protein complex AP-1, beta 1 subunit; Subunit of clathrin-associated adaptor protein complex 1 that plays a role in protein sorting in the late-Golgi/trans-Golgi network (TGN) and/or endosomes. The AP complexes mediate both the recruitment of clathrin to membranes and the recognition of sorting signals within the cytosolic tails of transmembrane cargo molecules

**Ap2a1** : adaptor protein complex AP-2, alpha 1 subunit; Component of the adaptor protein complex 2 (AP-2). Adaptor protein complexes function in protein transport via transport vesicles in different membrane traffic pathways. Adaptor protein complexes are vesicle coat components and appear to be involved in cargo selection and vesicle formation. AP-2 is involved in clathrin-dependent endocytosis in which cargo proteins are incorporated into vesicles surrounded by clathrin (clathrin-coated vesicles, CCVs) which are destined for fusion with the early endosome. The clathrin lattice serves as a me [...]

**Ap3b2** : adaptor-related protein complex 3, beta 2 subunit; Subunit of non-clathrin- and clathrin-associated adaptor protein complex 3 (AP-3) that plays a role in protein sorting in the late-Golgi/trans-Golgi network (TGN) and/or endosomes. The AP complexes mediate both the

recruitment of clathrin to membranes and the recognition of sorting signals within the cytosolic tails of transmembrane cargo molecules. AP-3 appears to be involved in the sorting of a subset of transmembrane proteins targeted to lysosomes and lysosome-related organelles. In concert with the BLOC-1 complex, AP-3 is required [...]

**Ap3d1** : adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit; Part of the AP-3 complex, an adaptor-related complex which is not clathrin-associated. The complex is associated with the Golgi region as well as more peripheral structures. It facilitates the budding of vesicles from the Golgi membrane and may be directly involved in trafficking to lysosomes (By similarity). In concert with the BLOC-1 complex, AP-3 is required to target cargos into vesicles assembled at cell bodies for delivery into neurites and nerve terminals

**Atp2b1** : ATPase, Ca<sup>++</sup> transporting, plasma membrane 1

**AW555464** : expressed sequence AW555464; Plays a role in microtubule organization (By similarity)

**C3** : complement component 3; C3 plays a central role in the activation of the complement system. Its processing by C3 convertase is the central reaction in both classical and alternative complement pathways. After activation C3b can bind covalently, via its reactive thioester, to cell surface carbohydrates or immune aggregates

**Calcnb4** : calcium channel, voltage-dependent, beta 4 subunit; The beta subunit of voltage-dependent calcium channels contributes to the function of the calcium channel by increasing peak calcium current, shifting the voltage dependencies of activation and inactivation, modulating G protein inhibition and controlling the alpha-1 subunit membrane targeting (By similarity)

**Calcoco1** : calcium binding and coiled coil domain 1; Functions as a coactivator for aryl hydrocarbon and nuclear receptors (NR). Recruited to promoters through its contact with the N-terminal basic helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim (PAS) domain of transcription factors or coactivators, such as NCOA2. During ER-activation acts synergistically in combination with other NCOA2-binding proteins, such as EP300, CREBBP and CARM1. Involved in the transcriptional activation of target genes in the Wnt/CTNNB1 pathway. Functions as a secondary coactivator in LEF1- mediated transcriptional activation via its inte [...]

**Cd5l** : CD5 antigen-like; May play a role in the regulation of the immune system. Seems to play a role as an inhibitor of apoptosis

**Cep170** : centrosomal protein 170; Plays a role in microtubule organization (By similarity)

**Cltc** : clathrin, heavy polypeptide (Hc); Clathrin is the major protein of the polyhedral coat of coated pits and vesicles. Two different adapter protein complexes link the clathrin lattice either to the plasma membrane or to the trans-Golgi network (By similarity)

**Copa** : coatamer protein complex subunit alpha; The coatamer is a cytosolic protein complex that binds to dilysine motifs and reversibly associates with Golgi non-clathrin-coated vesicles, which further mediate biosynthetic protein transport from the ER, via the Golgi up to the trans Golgi network. Coatamer complex is required for budding from Golgi membranes, and is essential for the retrograde Golgi-to-ER transport of dilysine-tagged proteins. In mammals, the coatamer can only be recruited by membranes associated to ADP-ribosylation factors (ARFs), which are small GTP-binding proteins; the [...]

**Cp** : ceruloplasmin; Ceruloplasmin is a blue, copper-binding (6-7 atoms per molecule) glycoprotein. It has ferroxidase activity oxidizing Fe(2+) to Fe(3+) without releasing radical oxygen species. It is involved in iron transport across the cell membrane. Provides Cu(2+) ions for the ascorbate-mediated deaminase degradation of the heparan sulfate chains of GPC1. May also play a role in fetal lung development or pulmonary antioxidant defense (By similarity)

**D10Wsu52e** : DNA segment, Chr 10, Wayne State University 52, expressed; Catalytic subunit of the tRNA-splicing ligase complex that acts by directly joining spliced tRNA halves to mature-sized tRNAs by incorporating the precursor-derived splice junction phosphate into the mature tRNA as a canonical 3',5'- phosphodiester. May act as a RNA ligase with broad substrate specificity, and may function toward other RNAs (By similarity). Essential during post-implantation development of embryos

**Ddx1** : DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1; Acts as an ATP-dependent RNA helicase, able to unwind both RNA-RNA and RNA-DNA duplexes. Possesses 5' single-stranded RNA overhang nuclease activity. Possesses ATPase activity on various RNA, but not DNA polynucleotides. May play a role in RNA clearance at DNA double-strand breaks (DSBs), thereby facilitating the template-guided repair of transcriptionally active regions of the

genome. Together with RELA, acts as a coactivator to enhance NF-kappa-B-mediated transcriptional activation. Acts as a positive transcriptional regulator of cyclin CCND2 [...]

**Dnm3** : dynamin 3; Microtubule-associated force-producing protein involved in producing microtubule bundles and able to bind and hydrolyze GTP. Most probably involved in vesicular trafficking processes, in particular endocytosis (By similarity)

**Drg1** : developmentally regulated GTP binding protein 1; Critical regulator of cell growth under specific conditions. Implicated in differentiation and cell cycle arrest

**Eef1g** : eukaryotic translation elongation factor 1 gamma; Probably plays a role in anchoring the complex to other cellular components (By similarity)

**Eif4b** : eukaryotic translation initiation factor 4B; Required for the binding of mRNA to ribosomes. Functions in close association with EIF4-F and EIF4-A. Binds near the 5'- terminal cap of mRNA in presence of EIF-4F and ATP. Promotes the ATPase activity and the ATP-dependent RNA unwinding activity of both EIF4-A and EIF4-F (By similarity)

**Erlin1** : ER lipid raft associated 1; Component of the ERLIN1/ERLIN2 complex which mediates the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP3Rs) (By similarity)

**Erlin2** : ER lipid raft associated 2; Component of the ERLIN1/ERLIN2 complex which mediates the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP3Rs). Also involved in ITPR1 degradation by the ERAD pathway (By similarity)

**Fam164a** : family with sequence similarity 164, member A

**Fam98b** : family with sequence similarity 98, member B

**Farsa** : phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit

**Farsb** : phenylalanyl-tRNA synthetase, beta subunit

**Fuk** : fucokinase

**G3bp1** : Ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein 1; May be a regulated effector of stress granule assembly. Phosphorylation-dependent sequence-specific endoribonuclease in vitro. Cleaves exclusively between cytosine and adenine and cleaves MYC mRNA preferentially at the 3'-UTR. ATP- and magnesium- dependent helicase. Unwinds

preferentially partial DNA and RNA duplexes having a 17 bp annealed portion and either a hanging 3' tail or hanging tails at both 5'- and 3'-ends. Unwinds DNA/DNA, RNA/DNA, and RNA/RNA substrates with comparable efficiency. Acts unidirectionally by moving i [...]

**Gabra1** : gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 1; GABA, the major inhibitory neurotransmitter in the vertebrate brain, mediates neuronal inhibition by binding to the GABA/benzodiazepine receptor and opening an integral chloride channel

**Gpr158** : G protein-coupled receptor 158; Orphan receptor

**Hrg** : histidine-rich glycoprotein; Plasma glycoprotein that binds a number of ligands such as heme, heparin, heparan sulfate, thrombospondin, plasminogen, and divalent metal ions. Binds heparin and heparin/glycosaminoglycans in a zinc-dependent manner. Binds heparan sulfate on the surface of liver, lung, kidney and heart endothelial cells. Binds to N-sulfated polysaccharide chains on the surface of liver endothelial cells. Inhibits rosette formation. Acts as an adapter protein and is implicated in regulating many processes such as immune complex and pathogen clearance, cell chemotaxis, cell [...]

**Luzp1** : leucine zipper protein 1

**Mapk1** : mitogen-activated protein kinase 1; Serine/threonine kinase which acts as an essential component of the MAP kinase signal transduction pathway. MAPK1/ERK2 and MAPK3/ERK1 are the 2 MAPKs which play an important role in the MAPK/ERK cascade. They participate also in a signaling cascade initiated by activated KIT and KITLG/SCF. Depending on the cellular context, the MAPK/ERK cascade mediates diverse biological functions such as cell growth, adhesion, survival and differentiation through the regulation of transcription, translation, cytoskeletal rearrangements. The MAPK/ERK cascade plays a [...]

**Mtap1a** : microtubule-associated protein 1 A; Structural protein involved in the filamentous cross-bridging between microtubules and other skeletal elements

**Mtap1b** : microtubule-associated protein 1B; Phosphorylated MAP1B may play a role in the cytoskeletal changes that accompany neurite extension. Possibly MAP1B Binds to at least two tubulin subunits in the polymer, and this bridging of subunits might be involved in nucleating microtubule polymerization and in stabilizing microtubules. Acts as a positive cofactor in DAPK1-mediated autophagic vesicle formation and membrane blebbing (By similarity).



Facilitates tyrosination of alpha-tubulin in neuronal microtubules. Required for synaptic maturation

**Mug1** : murinoglobulin 1; A proteinase activates the inhibitor by specific proteolysis in the bait region, which, by an unknown mechanism leads to reaction at the cysteinyl-glutamyl internal thiol ester site and to a conformational change, whereby the proteinase is trapped and/or covalently bound to the inhibitor. While in the tetrameric proteinase inhibitors steric inhibition is sufficiently strong, monomeric forms need a covalent linkage between the activated glutamyl residue of the original thiol ester and a terminal amino group of a lysine or another nucleophilic group on the proteinase, f [...]

**Nckap1** : NCK-associated protein 1; Part of the WAVE complex that regulates lamellipodia formation. The WAVE complex regulates actin filament reorganization via its interaction with the Arp2/3 complex. Actin remodeling activity is regulated by RAC1

**Ncl** : nucleolin; Nucleolin is the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells. It is found associated with intranucleolar chromatin and pre-ribosomal particles. It induces chromatin decondensation by binding to histone H1. It is thought to play a role in pre-rRNA transcription and ribosome assembly. May play a role in the process of transcriptional elongation. Binds RNA oligonucleotides with 5'-UUAGGG-3' repeats more tightly than the telomeric single-stranded DNA 5'-TTAGGG-3' repeats (By similarity)

**Nemf** : nuclear export mediator factor

**Pitpnm2** : phosphatidylinositol transfer protein, membrane-associated 2; Catalyzes the transfer of phosphatidylinositol and phosphatidylcholine between membranes (in vitro). Binds calcium ions (By similarity)

**Prkce** : protein kinase C, epsilon; Calcium-independent, phospholipid- and diacylglycerol (DAG)-dependent serine/threonine-protein kinase that plays essential roles in the regulation of multiple cellular processes linked to cytoskeletal proteins, such as cell adhesion, motility, migration and cell cycle, functions in neuron growth and ion channel regulation, and is involved in immune response, cancer cell invasion and regulation of apoptosis. Mediates cell adhesion to the extracellular matrix via integrin-dependent signaling, by mediating angiotensin-2-induced activation of integrin beta-1 (ITG [...])

**Pzp** : pregnancy zone protein; Is able to inhibit all four classes of proteinases by a unique 'trapping' mechanism. This protein has a peptide stretch, called the 'bait region' which contains specific cleavage sites for different proteinases. When a proteinase cleaves the bait region, a conformational change is induced in the protein which traps the proteinase. The entrapped enzyme remains active against low molecular weight substrates (activity against high molecular weight substrates is greatly reduced). Following cleavage in the bait region a thioester bond is hydrolyzed and mediates the c [...]

**Raph1** : Ras association (RalGDS/AF-6) and pleckstrin homology domains 1

**Rtn4** : reticulon 4

**Serpina1c** : serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 1C; Inhibitor of serine proteases. Can inhibit trypsin and chymotrypsin; relatively ineffective against elastase

**Serpina3k** : serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3K; Contrapsin inhibits trypsin-like proteases

**Suclg1** : succinate-CoA ligase, GDP-forming, alpha subunit; Catalyzes the ATP- or GTP-dependent ligation of succinate and CoA to form succinyl-CoA. The nature of the beta subunit determines the nucleotide specificity (By similarity)

**Synj1** : synaptojanin 1; Inositol 5-phosphatase which has a role in clathrin- mediated endocytosis (By similarity)

**Trf** : transferrin

**Uhrf1bp1l** : UHRF1 (ICBP90) binding protein 1-like

**Yars** : tyrosyl-tRNA synthetase; Catalyzes the attachment of tyrosine to tRNA(Tyr) in a two-step reaction: tyrosine is first activated by ATP to form Tyr- AMP and then transferred to the acceptor end of tRNA(Tyr) (By similarity)

## ARTICLES

### IV. Articles

#### IV. 1. [Article I : \*TgBIN1\*](#)

[IV. 2. Article II : htau;TgBIN1](#)

**BIN1 recovers tauopathy-induced long-term memory deficits in mice and interacts with Tau through Thr<sup>348</sup> phosphorylation**

Maxime Sartori<sup>1,2,3,4,\*</sup>, Tiago Mendes<sup>5,6,7,8,\*</sup>, Shruti Desai<sup>5,6,7,\*</sup>, Alessia Lasorsa<sup>7,9</sup>, Adrien Herledan<sup>6,10,11</sup>, Nicolas Malmanche<sup>5,6,7</sup>, Petra Mäkinen<sup>12</sup>, Mikael Marttinen<sup>12</sup>, Idir Malki<sup>7,9</sup>, Julien Chapuis<sup>5,6,7</sup>, Amandine Flaig<sup>5,6,7</sup>, Anaïs-Camille Vreulx<sup>5,6,7</sup>, Philippe Amouyel<sup>5,6,7</sup>, Florence Leroux<sup>6,10,11</sup>, Benoit Déprez<sup>6,10,11</sup>, François-Xavier Cantrelle<sup>7,9</sup>, Damien Maréchal<sup>1,2,3,4</sup>, Laurent Pradier<sup>8</sup>, Mikko Hiltunen<sup>12</sup>, Isabelle Landrieu<sup>7,9</sup>, Devrim Kilinc<sup>5,6,7,#</sup>, Yann Hérault<sup>1,2,3,4,#</sup>, Jocelyn Laporte<sup>1,2,3,4,#</sup>, Jean-Charles Lambert<sup>5,6,7,#</sup>

\* Maxime Sartori, Tiago Mendes, and Shruti Desai contributed equally to this work.

# Devrim Kilinc, Yann Hérault, Jocelyn Laporte and Jean-Charles Lambert contributed equally to this work.

<sup>1</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch, France

<sup>2</sup> INSERM U1258, Illkirch, France

<sup>3</sup> CNRS UMR7104, Illkirch, France

<sup>4</sup> Strasbourg University, Illkirch, France

<sup>5</sup> INSERM, U1167, RID-AGE-Risk Factors and Molecular Determinants of Aging-Related Diseases, Lille, France

<sup>6</sup> Institut Pasteur de Lille, Lille, France

<sup>7</sup> University of Lille, DISTALZ Laboratory of Excellence (LabEx), Lille, France

<sup>8</sup> SANOFI Neurosciences, Chilly-Mazarin, France

<sup>9</sup> CNRS UMR8576, Lille, France

<sup>10</sup> University of Lille, EGID, Lille, France

<sup>11</sup> Inserm, U1177, Lille, France

<sup>12</sup> Institute of Biomedicine, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland

**Correspondence to:**

Yann Herault, PhD

IGBMC, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France.

Tel.: +33 3 88 65 57 15

Fax: +33 3 88 65 32 01

E-mail: herault@igbmc.fr

For animal models and behavioral analyses

Jocelyn Laporte, PhD

IGBMC, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France.

Tel.: +33 3 88 65 34 12

Fax: +33 3 88 65 32 01

E-mail: jocelyn@igbmc.fr

**TBD**

Jean-Charles Lambert, PhD

Inserm UMR1167, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette 59019 Lille cédex

Tel: + 33 3 20 87 73 91

Fax: + 33 3 20 87 78 94

E-mail: jean-charles.lambert@pasteur-lille.fr

For molecular, cellular, and human brain experiments

**Keywords:** Alzheimer's disease, BIN1, Tau, tauopathy, long-term memory, neurodegeneration, high-content screening, proximity ligation assay, nuclear magnetic resonance, Cdk, calcineurin

**Abstract**

The bridging integrator 1 gene (*BIN1*) is a major genetic risk factor for Alzheimer's disease (AD). In this report, we investigated how *BIN1*-dependent pathophysiological processes might be associated with Tau. We first generated a cohort of control and transgenic mice either overexpressing human MAPT (*TgMAPT*) or both human MAPT and *BIN1* (*TgMAPT;TgBIN1*), which we followed-up from 3 to 15 months. In *TgMAPT;TgBIN1* mice short-term memory deficits appeared earlier than in *TgMAPT* mice; however – unlike *TgMAPT* mice – *TgMAPT;TgBIN1* mice did not exhibit any long-term or spatial memory deficits for at least 15 months. After sacrifice of the cohort at 18 months, immunohistochemistry revealed that *BIN1* overexpression prevents both Tau mislocalization and somatic inclusion in the hippocampus, where an increase in *BIN1*-Tau interaction was also observed. We then sought mechanisms controlling the *BIN1*-Tau interaction. We developed a high-content screening approach to characterize modulators of the *BIN1*-Tau interaction in an agnostic way (1,126 compounds targeting multiple pathways), and we identified – among others – an inhibitor of Calcineurin, a Ser/Thr phosphatase. We determined that Calcineurin dephosphorylates a Cyclin-dependent kinase phosphorylation site at T348 that shifts the dynamic equilibrium of the open/closed conformation of the neuronal *BIN1* isoform towards the open form. Phosphorylation of this site increases the availability of the *BIN1* SH3 domain for Tau interaction, as demonstrated by nuclear magnetic resonance experiments and in primary neurons. Finally, we observed that the levels of the neuronal *BIN1* isoform were decreased in AD brains, whereas phospho-*BIN1*(T348):*BIN1* ratio was increased, suggesting a compensatory mechanism. In conclusion, our data support the idea that *BIN1* modulates the AD risk through an intricate regulation of its interaction with Tau. Any increase in *BIN1* expression or activity may disrupt this regulatory balance with Tau and have direct effects on learning and memory.

## Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder and is clinically characterized among others by memory deficits affecting first short term and then long term and spatial memory. AD constitutes a major public, medical, societal, and economic issue worldwide, with 35.6 million people suffering from the disease and a forecast of 106 million in 2050.(Prince et al. 2013) Responding effectively to this AD crisis necessitates a better understanding of this disease in order to improve diagnosis and therapy.

AD is characterized by two main types of brain lesions: (i) amyloid plaques, resulting from the extracellular accumulation of amyloid beta ( $A\beta$ ) peptides; (ii) neurofibrillar degeneration, due to the intracellular aggregation of abnormally hyperphosphorylated tau proteins. This aggregation is associated with an abnormal localization of Tau proteins from the axonal compartment to the somato-dendritic compartment.(Zempel and Mandelkow 2014)

The discovery of mutations in the *APP*, *PS1* and *PS2* genes (coding for amyloid precursor protein, APP, and presenilins 1 and 2), responsible for early-onset, autosomal-dominant forms of AD has placed  $A\beta$  oligomer production at the centre of the pathophysiological process.(Hardy and Selkoe 2002) A better understanding of the genetic component of the common, complex forms of AD, which is exceptionally high among multifactorial aging-related diseases,(Gatz et al. 2006) is required to decipher the pathophysiological processes of the AD. Genome-wide association studies (GWAS) allowed for the identification of more than 30 loci associated with the late-onset forms of AD,(Hollingworth et al. 2011; Lambert et al. 2009; Lambert et al. 2013; Sims et al. 2017) and part of them pointed out a potential failure in  $A\beta$  clearance, leading to more insidious  $A\beta$  accumulation in the brain.(Lambert and Amouyel 2010; Sims et al. 2017) On the other hand, it is only recently that AD genetic risk factors have been also associated with Tau pathology, following the development of systematic screenings in *Drosophila* which allowed for the identification of genetic modifiers by assessing eye roughness and eye size as readouts of Tau neurotoxicity (Dourlen et al. 2017; Shulman et al. 2011; Shulman et al. 2014) and their associations with endophenotypes related to Tau.(Beecham et al. 2014; Cruchaga et al. 2013; Dourlen et al. 2017) Such observations are of high importance since, contrary to amyloid



plaques, neurofibrillary tangles (NFTs) are well correlated with cognitive impairment both in humans (Nelson et al. 2012) and in animal models.(Huber et al. 2018)

Among the genes described to genetically interact with Tau in *Drosophila*, the bridging integrator 1 gene (*BIN1*) was further described to directly interact with the Tau protein by NMR spectroscopy using recombinant proteins, *in vitro* glutathion S-transferase (GST) pull-down from HEK293 lysates, as well as reciprocal co-immunoprecipitation from mouse brain synaptosome homogenates.(Chapuis, Hansmannel, Gistelinc, Mounier, Van Cauwenberghe, Kolen, Geller, Sottejeau, Harold, Dourlen, Grenier-Boley, Kamatani, Delepine, Demiautte, Zelenika, Zommer, Hamdane, Bellenguez, Dartigues, Hauw, Letronne, Ayrat, Slegers, Schellens, Broeck, Engelborghs, De Deyn, Vandenberghe, O'Donovan, Owen, Epelbaum, Mercken, Karran, Bantscheff, Drewes, Joberty, Campion, Octave, Berr, Lathrop, Callaerts, Mann, Williams, Buee, Dewachter, Van Broeckhoven, Amouyel, Moechars, Dermaut, and Lambert 2013) In addition, a genome-wide significant functional risk variant in the vicinity of *BIN1* has been associated with Tau loads (but not with A $\beta$  loads) in AD brains.(Dourlen et al. 2017)

*BIN1* gene codes for amphiphysin 2, also called BIN1, a ubiquitously expressed protein involved in membrane remodeling. BIN1 comprises a N-BAR domain involved in membrane curvature sensing, an SH3 domain that binds to proline-rich motifs in a number of proteins including itself, and a clathrin- and AP2-binding domain (CLAP) specific of the isoform 1.(Prokic, Cowling, and Laporte 2014) In the central nervous system (CNS), BIN1 is mostly found in the axon initial segment, at the nodes of Ranvier,(Butler et al. 1997) and at the synapse,(Ramjaun et al. 1997; Daudin et al. 2018) and was also associated with myelinated axons and oligodendrocytes in the white and grey matter.(De Rossi et al. 2016) However, little is known about its function in the CNS. We recently described the consequences of increased human BIN1 expression in the mouse brain, which exhibits early alterations in the neuronal tract between the entorhinal cortex and the dentate gyrus of the hippocampus, leading to impaired novel object recognition and aging-related changes.(Daudin et al. 2018) Altogether, BIN1 overexpression affects the aging brain and induces neurodegeneration. (Daudin et al. 2018)

Little is also known about BIN1 in the context of AD. Several teams evaluated potential links between AD and BIN1 and determined: (i) BIN1 may regulate BACE1 intracellular

trafficking through multiple mechanisms and subsequently alter A $\beta$  peptide production;(Miyagawa et al. 2016) (ii) BIN1 may have a role in plasma membrane remodeling during myelination, which is known to be affected in AD;(De Rossi et al. 2016; McKenzie et al. 2017) (iii) BIN1 may participate in the neuron-to-neuron propagation of Tau prion strains;(Calafate et al. 2016) and (iv) BIN1 may directly interact with Tau and interfere with Tau neurotoxicity *via* unknown mechanisms.(Dourlen et al. 2017; Malki et al. 2017) Strong efforts are thus still needed to determine how BIN1 is involved in the pathophysiological processes of AD. In this study, we assessed for the first time the impact of human *BIN1* overexpression in a mouse model of tauopathy and further dissected the interaction between Tau and BIN1 at the molecular and cellular levels.

## Results

### ***BIN1* overexpression modulates hTau phenotypes in short- and long-term memory**

Although a genetic interaction between *Bin1* and *MAPT* has been shown in *Drosophila* and the corresponding proteins have been described to physically interact, (Dourlen et al. 2017; Malki et al. 2017) the impact of *BIN1* expression levels on cognitive function has not yet been investigated in a mammalian tauopathy model. For this purpose, we crossed the hTau mouse, a tauopathy model that overexpresses human *MAPT* (but does not express endogenous murine *Mapt* (Polydoro et al. 2009)) with the Tg*BIN1* mouse that overexpresses human *BIN1* under the control of its own promoter and recapitulates the tissue-specific expression of different *BIN1* isoforms. (Daudin et al. 2018) Briefly, generation of mice were obtained on C57BL/6J genetic background by crossing *Mapt*<sup>+/-</sup>;Tg*MAPT*/0 and *Mapt*<sup>+/-</sup>;Tg*BIN1*/0 (Daudin et al. 2018) to obtain *Mapt*<sup>+/-</sup> as control littermates, *Mapt*<sup>+/-</sup>;Tg*MAPT*/0 (noted here hTau) as tauopathy model, (Polydoro et al. 2009) and, finally, *Mapt*<sup>+/-</sup>;Tg*MAPT*/0;Tg*BIN1*/0 noted here hTau;Tg*BIN1*. Notably, in the Tg*BIN1* mouse, brain *Mapt* expression is similar to that observed in the WT mouse (Fig. S1).

To assess if *BIN1* overexpression affected the short-term, non-spatial memory deficit in the hTau mice, a novel object recognition (NOR) task was performed, longitudinally at 3, 6, 9, 12, and 15 months. *MAPT* overexpression induced short-term memory deficits in males and females from 9 months on, characterized by their inability to discriminate between familiar and novel objects (Fig. 1). Strikingly, hTau;Tg*BIN1* mice displayed short-term memory deficits earlier than hTau mice, by 3 months, both in males and females. Notably, *Mapt* heterozygous deletion alone had no impact on this task and Tg*BIN1* males present NOR deficits only starting from 6 months. (Daudin et al. 2018) There was no place or object preference, regardless of genotype or sex (Fig. S2). In conclusion, *BIN1* overexpression worsened hTau phenotypes in the NOR task at an early age.

In parallel to the NOR test, we assessed in this mouse cohort (non-naïve animals) the effect of *BIN1* and *MAPT* overexpression on long-term spatial memory using Morris water maze (MWM) tasks at the same relative ages. All groups were able to achieve the same performance in reducing the distance needed to reach the hidden platform (Fig. 2 and S3). The hTau mice displayed a deficit in recalling the platform location 24

h after the last training session by 12 months (Fig. 2 and S4). However, hTau;Tg*BIN1* males were able to perform this task at all ages tested, indicating that *BIN1* overexpression rescued the long-term and spatial memory of the hTau mice (Fig. 2) and hTau;Tg*BIN1* females displayed a delayed deficit at 15 months (Fig. S4). Notably, 15-month-old Tg*BIN1* mice did not have a deficit in this task as was observed for the WT mice (Fig. S5). To validate that the memory deficit observed for hTau mice were not due to a visual or locomotor deficit, we measured the distance and time required by the 15 month old mice to reach the visible platform. No difference was noted in the swimming velocities of different genotypes (Fig. S6). Overall, *BIN1* overexpression modulates hTau phenotypes by exacerbating short-term memory deficits and preventing long-term memory deficits.

### ***BIN1* expression prevents Tau intracellular inclusions and increases its interaction with Tau in the hippocampus**

The hTau mice have been described to develop detectable Tau aggregation and intracellular inclusions in the hippocampus and entorhinal cortex by 9 months.(Andorfer et al. 2005; Polydoro et al. 2009) We therefore tested the hypothesis that the mechanism underlying the rescue of the long-term and spatial memory deficits in hTau males through *BIN1* overexpression may be linked to an alteration of this phenotype. We sacrificed our cohort at 18 months and performed immunolabeling with antibodies specifically targeting Tau phosphorylated at Ser202 and Thr205 (AT8 antibody) and Thr231 (AT180 antibody) in the hippocampus (Fig. 3). As expected, no staining was evident in control mice. In hTau mice, Tau was mislocalized to the somatic compartment and formed prominent intracellular inclusions in the hippocampus (dentate gyrus, CA3, CA2, and CA1) (Fig. 3A). However, in hTau;Tg*BIN1* mice the number of cells with intracellular inclusions decreased by 5.9-fold or by 4.3-fold in the hippocampus when labeled with AT8 or AT180 antibodies, respectively (Fig. 3B and 3C). Since it is known that hyperphosphorylation of soluble Tau precedes Tau somatic inclusion,(Buee et al. 2000) we determined if reduction of Tau inclusions upon *BIN1* overexpression is due to an alteration of Tau phosphorylation pattern or of soluble Tau levels. However, no difference in soluble phosphorylated Tau protein was observed between hTau and hTau;Tg*BIN1* mice in the hippocampus (Fig. S7), indicating that *BIN1* does not potentially regulate the level of soluble phosphorylated Tau protein or its phosphorylation pattern.

It has been previously described that BIN1 is able to physically interact with Tau. We assessed if BIN1 overexpression modified the level of its interaction with Tau. For this purpose we used proximity ligation assay (PLA) in brain slices from sacrificed animals (Fig. 3D) and quantified the PLA density as a read-out of the BIN1-Tau interaction (Fig. 3E). We observed a strong increase in the PLA signal for the hTau;TgBIN1 mice when compared to both controls and hTau mice (6.2-fold and 2.7-fold in spot density, respectively). Notably, as a positive control, we also used PLA to assess the interaction between  $\alpha$ -tubulin and Tau (Fig. S8) and detected an increase in this interaction in hTau and hTau;TgBIN1 mice relative to controls (Fig. 3F). Taken together, these data indicate that BIN1 overexpression increases its interaction with Tau in the hippocampus and prevents Tau mislocalization and somatic inclusion, notably in the brain regions involved in long-term and spatial memory.

### **BIN1 expression in neurons modulates BIN1-Tau interaction**

Our data in transgenic mice support the idea that the BIN1-Tau interaction is relevant for the pathophysiological functions of Tau in AD and potentially in neurons. To gain further insight into cellular mechanisms of BIN1-Tau interaction, we monitored the dynamics of the Bin1-Tau interaction during neuronal maturation in hippocampal primary neuronal cultures (PNC) at 7, 14, and 21 days *in vitro* (DIV), using western blots and PLA (Fig. 4). We first observed an increase in BIN1 and Tau amounts with time (Fig. 4A and 4B), whereas Tau phosphorylation was lower at certain epitopes, in particular, at Thr231 (Fig. 4C). Of note, this phosphorylation site has been described to inhibit the interaction between Tau's proline-rich domain (PRD) and BIN1's SH3 domains. (Sottejeau et al. 2015) In parallel, we observed a relative increase in BIN1-Tau PLA volumes in the neuronal network with time of culture (Fig. 4D and 4E), and the BIN1-Tau PLA signal was highly correlated with Tau volume irrespective of DIV (Fig. 4F), suggesting a uniform distribution of PLA signals in the network. We then assessed the impact of BIN1 expression on the PLA signal at DIV14, by underexpressing BIN1 or overexpressing BIN1 isoform 1 (BIN1iso1) at DIV8 *via* transduction of lentiviruses expressing shRNA against BIN1 or the corresponding cDNA, respectively (Fig. 4H and S9). BIN1 underexpression led to a decrease in PLA signal; conversely, BIN1iso1 overexpression led to an increase in PLA signal (Fig. 4G and 4I). These data indicate that even if the BIN1-Tau interaction occurred at restricted loci in neurons (*e.g.*, at microtubule tips, as previously described (Sottejeau et al.

2015)), the BIN1-Tau complex formation depends on the global amount of BIN1 in neurons, as observed in the transgenic mice. Together, our data support the notion that variation in BIN1 expression affects the dynamics of BIN1-Tau complexes and their subsequent physiological and/or pathophysiological functions.

### **Search for signaling pathways modulating the BIN1-Tau interaction in neurons**

In addition to the BIN1 expression level as a modulator of the BIN1-Tau interaction, we had previously shown that phosphorylation of the Tau PRD domain (mainly at T231) inhibits its interaction with the BIN1 SH3 domain.(Sottejeau et al. 2015) This suggested that BIN1-Tau interaction dynamics likely depended on specific signaling pathways that regulate Tau phosphorylation. However, the cell signaling pathways susceptible to modulate the dynamic BIN1-Tau interaction remained unknown. To answer this question, we developed an agnostic strategy and set-up a semi-automated high-content screening (HCS) approach, using PNC as cellular model and PLA volume as readout for BIN1-Tau interaction (Fig. 5A).

We tested a library of 1,126 compounds (at 10  $\mu$ M) known to mainly target key elements of canonical pathways (see the Materials and Methods section for a full description of the HCS design). In brief, HCS was made in triplicate (one well per compound in each screen) using independent cultures. 79 compounds showed potential toxicity, as assessed by Tau and MAP2 network densities (Fig. 5B), and were excluded. We then applied several selection criteria to identify most promising compounds: (i) only compounds showing an effect in the same direction in all three independent screens were retained for further investigation; (ii) we selected the 10% of compounds showing the strongest variations (5% increasing PLA and 5% decreasing PLA). This led to 72 compounds for validation in dose-response experiments (Fig. 5C). Following this validation step, we were able to retain 12 compounds (Fig. 5D) that consistently exhibited the strongest variations in PLA signals. We grouped the targets of these compounds into 5 categories: (i) phosphorylation; (ii) nitric oxide synthase; (iii)  $Ca^{2+}$  homeostasis; (iv) membrane receptors; and (v) others (see Fig. S10 for the dose-response curves). As BIN1-Tau interaction has been shown to be modulated by phosphorylation,(Sottejeau et al. 2015) we decided to focus on two compounds whose targets are regulators of phosphorylation: (i) the Calcineurin (CaN) inhibitor Cyclosporin A (CsA), which, at 10 nM, increased PLA:Tau ratio by 42.6%; and (ii) the MEK inhibitor U0126, which, at 10

$\mu\text{M}$ , decreased PLA:Tau ratio by 36.2% (Fig. 5E). In conclusion, CaN and MEK-dependent signaling pathways – among others – are able to modulate the complex dynamics of the BIN1-Tau interaction in neurons.

### **The conformational change in BIN1 isoform 1 upon phosphorylation modulates BIN1-Tau interaction**

Of particular interest, CaN is a Ser/Thr phosphatase which has been described to dephosphorylate amphiphysin 1 (amphi1), the homolog of BIN1. (Bauerfeind, Takei, and De Camilli 1997) We thus postulated that CaN may also target BIN1 and sought potential phosphorylation sites within BIN1 explaining the increase in the PLA signal observed after CaN inhibition. Interestingly, we had previously characterized a conformational change in BIN1iso1 between open and closed forms. This involves an intramolecular interaction between the SH3 and CLAP PRD of BIN1iso1, making the SH3 domain unavailable for intermolecular interactions for instance with Tau. (Malki et al. 2017) Since phosphorylations in the PRD have already been described to inhibit PRD/SH3 domains, (Sottejeau et al. 2015) we postulated that phosphorylation in the CLAP PRD domains of BIN1iso1 may play a role in favoring BIN1's open form. This would implicate that phosphorylation in this domain would lead to an increase in BIN1-Tau interaction and consequently in the PLA signal (and therefore explain the PLA increase observed upon inhibiting CaN, which dephosphorylates this site). When comparing amphi1 and BIN1 protein sequences, their CLAP PRD domains appear to be highly conserved (Fig. 6A). Considering that amphi1 T310 (corresponding to BIN1 T348) has been described to be phosphorylated by Cdks, (Floyd et al. 2001) we hypothesized that T348 (in the vicinity of the PRD sequence interacting with the BIN1-SH3 domain (Malki et al. 2017)) may be controlling the open/closed conformation of BIN1iso1.

We first developed an antibody against BIN1 phosphorylated at T348 to determine if the BIN1 T348 phosphorylation occurred in neurons. Treating neuronal protein extracts with a protein phosphatase pool decreased BIN1 T348 phosphorylation (Fig. 6B). As control, Tau T231 phosphorylation was also decreased (Fig. S11A). Next, since T348 is within a consensus sequence recognized for phosphorylation by cyclin-dependent kinases (Cdks), we tested if Cdks were able to phosphorylate BIN1 T348. By using recombinant Cdk2 or Cdk5 and BIN1iso1, we showed that both kinases are able to directly phosphorylate T348 (Fig. 6C), as well as Tau T231 *in vitro* (Fig. S11B)

confirming previous results (Sottejeau et al., 2015). We finally tested CsA and U0126 in PNC for their effect on BIN1 T348 and Tau phosphorylation. We observed that CsA – but not U0126 – was able to significantly increase BIN1 T348 phosphorylation in PNC ( $85\pm 26\%$  vs.  $4\pm 26\%$ , respectively) suggesting that CaN, is indeed able to dephosphorylate BIN1 at T348 (Fig. 6D and 6E). Remarkably, CaN inhibition did not impact Tau T231 phosphorylation, which we had previously described as a major modulator of the BIN1-Tau interaction, (Sottejeau et al. 2015) suggesting that the BIN1 T348 phosphorylation drives the impact of CsA on PLA. Conversely, U0126 likely modifies the BIN1-Tau interaction through the Tau T231 phosphorylation, without any impact on BIN1 T348 (Fig. 6D and 6E). Notably, we had previously characterized T231 as one of the 15 Ser/Thr sites where Tau gets phosphorylated by ERK2, downstream of MEK. (Qi et al. 2016)

To determine if phospho-T348 may control the dynamics of the open/closed conformation of BIN1iso1, we used nuclear magnetic resonance (NMR). We first tested whether this phosphorylation could impact the intramolecular interactions of BIN1 SH3 in the context of full BIN1iso1 protein. Signal from the BIN1-SH3 domain was observed in the spectra of Cdk2-phosphorylated recombinant BIN1iso1, whereas these same signals were barely detectable in the spectra of non-phosphorylated BIN1iso1 under identical acquisition and processing conditions (Fig. S12). Detection of these signals in the context of the large BIN1iso1 protein showed that the BIN1-SH3 domain kept some mobility and that the equilibrium was less in favor of the intramolecular interaction once the BIN1-CLAP domain was phosphorylated compared to the non-phosphorylated BIN1iso1 protein. However, since we detected multiple phosphorylation sites in the Cdk2-BIN1iso1 by NMR (Fig. S12), we generated a recombinant BIN1iso1 with T348E (BIN1-CLAP-T348E) to mimic the single phosphorylation event. Signals from the isolated BIN1-SH3 domain were also detected in the spectra of the mutated BIN1iso1 (Fig. S13), suggesting that phosphorylation at T348 is sufficient to shift to the BIN1iso1 open form (Fig. 6F). Finally, to further validate this observation,  $^{15}\text{N}$ -labeled BIN1 SH3 domain was titrated with CLAP (334-359) or phospho-CLAP (334-359) peptides and the titration was monitored using  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  heteronuclear single quantum coherence (HSQC) spectroscopy of  $^{15}\text{N}$ -BIN1 SH3, one spectrum being recorded at each titration point (Fig. S14). The  $K_d$  values, obtained by fitting the chemical shift values measured in the spectra series to the saturation



equation, were  $71 \pm 13 \mu\text{M}$  for CLAP (334-359) peptide and  $736 \pm 70 \mu\text{M}$  for phospho-CLAP (334-359) peptide, showing a 10-fold increase in  $K_d$  due to a single phosphorylation event in the peptide (Fig. 6G). Cumulatively, these results indicate that phosphorylation of T348 in the BIN1 CLAP domain is able to shift the dynamic equilibrium of the BIN1iso1 conformation towards the open form, thereby increasing the availability of the BIN1 SH3 domain for other interactions.

We next assessed whether the open/closed dynamics may impact the formation of the BIN1-Tau complex by controlling the availability of the BIN1iso1 SH3 domain in neurons and thus its ability to interact with Tau. For this purpose, we infected at DIV8 hippocampal PNC with lentiviruses overexpressing wild-type BIN1iso1 and its mutated form, BIN1iso1-T348E, which, as previously demonstrated, leads to a systematically open form of BIN1iso1. We observed a 3-fold increase in PLA volume in PNC transduced with BIN1iso1-T348E when compared to BIN1iso1 (Fig. 6H and 6I). This observation is in accordance with the increased availability of the BIN1iso1-T348E SH3 domain for Tau.

Finally, we quantified the amount of neuronal isoforms of total and phospho-BIN1 (T348) in protein extracts from 14 brain samples with increasing neurofibrillary pathology (Braak stages 0 to 6). The relative amounts of total and phosphorylated BIN1 exhibited a trend to decrease with increasing Braak stage (Fig. 7B and 7C). Surprisingly, the phospho-BIN1:BIN1 ratio exhibited a trend to increase with increasing Braak stage (Fig. 7D). Among the 14 individuals, 4 were controls and 12 were diagnosed with AD. After stratification based on the AD status, we observed a statistically non-significant decrease in total BIN1 in AD cases compared to controls ( $p = 0.05$ ), but not in phospho-BIN1 ( $p = 0.71$ ) (Fig. 7E and 7F). Interestingly, phospho-BIN1:BIN1 ratio was significantly increased in the brains of AD cases ( $p = 0.02$ ) (Fig. 7G). Altogether, these data indicate that, in pathological conditions, the global level of the neuronal isoform of BIN1 is decreased, but a higher fraction of this BIN1 population is phosphorylated.

## Discussion

There is no longer any doubt that BIN1 is a major genetic risk factor for AD. (Lambert et al. 2013) However, as for other GWAS-defined genes, it is often difficult to determine the implication of such genes in pathophysiological processes (or even in physiological ones in organs of interest). In this paper, we aimed to determine if the BIN1-Tau interaction is involved in the neuropathological process of a mouse tauopathy model and to decipher the cellular processes and signaling pathways potentially regulating it.

To determine if BIN1 could interfere with Tau pathology in vivo, we first developed a mammalian tauopathy model overexpressing neuron-specific forms of *BIN1*. We observed that *BIN1* overexpression in the hTau mice expedited the appearance of short-term memory deficits from 9 to 3 months, but prevented spatial and long-term memory deficits up to 15 months, the highest age tested. Remarkably, the rescue of spatial and long-term memory by *BIN1* overexpression was associated with a strong decrease in phosphorylated Tau inclusions within the neuronal somata in the hippocampus, and a strong increase in the BIN1-Tau interaction in the neuronal network. Next, we analyzed the BIN1-Tau interaction in the physiological context. BIN1 expression level appeared to be a strong modulator of the BIN1-Tau interaction in PNC. To identify signaling pathways modulating the BIN1-Tau interaction in neurons, we developed an agnostic HCS approach and determined a number of potential targets; one of best hits being an inhibitor of CaN, a Ser/Thr phosphatase. This observation led us to identify BIN1 phosphorylation at T348 as both a CaN target and a major regulator of the BIN1-Tau interaction. We determined that BIN1 phosphorylation at T348 increased the availability of the BIN1-SH3 domain to interact with Tau and consequently led to an increase in this interaction in neurons. Finally, we determined that brain BIN1 isoforms (mainly isoform 1) decreased in the brains of postmortem AD patients compared to control cases, whereas – surprisingly – phospho-BIN1(T348):BIN1 ratio increased, suggesting that this site may also be involved in the AD process.

Altogether, our data support the hypothesis that a complex and dynamic regulation of the BIN1-Tau interaction is involved in the development of the AD pathophysiological process. However, it is still not clear if this interaction is protective or deleterious. Indeed, *BIN1* overexpression modulates *MAPT* phenotypes by exacerbating short-term memory deficits, but by preventing long-term memory deficits. Both of these

processes require the hippocampus, but the cortical regions involved are different, *i.e.*, lateral entorhinal cortex and medial entorhinal cortex, respectively. (Broadbent, Squire, and Clark 2004; Van Cauter et al. 2013) The equilibrium between Tau and BIN1 levels may be slightly different in these cortical brain regions and in temporality, potentially explaining the opposite effects observed. In addition, signaling pathways controlling the phosphorylation of BIN1 and Tau, and subsequently the BIN1-Tau interaction may also differ temporally and regionally. However, since we developed a cohort study, it was not possible to evaluate such temporal and regional variations at each time of behavioral tests. It is nevertheless worth noting that the rescue of spatial and long-term memory by BIN1 overexpression was associated with a strong decrease in phosphorylated Tau inclusions within the neuronal somata and a strong increase in the BIN1-Tau interaction in the hippocampus. Remarkably, in hTau mice, the BIN1-Tau interaction was lower than in both control and htau;TgBIN1 mice. These observations thus suggest that the BIN1-Tau interaction may be protective by blocking the relocalization and accumulation of phosphorylated Tau in the neuronal somata, a major hallmark of AD.

The hypothesis that a dynamic regulation of the BIN1-Tau interaction is involved in AD process also implies that a high level of BIN1 expression would be protective. This, however, would contradict our previous report that BIN1 mRNA is over-represented in the brains of AD cases compared to controls. (Chapuis et al. 2017) It should be noted that at that time, we had not evaluated the isoform-dependency of the BIN1 expression, and – interestingly – subsequent publications reporting protein levels showed that unlike the overexpression of ubiquitous isoforms, the brain isoforms were specifically underexpressed in the AD brains. (Glennon et al. 2013; Holler et al. 2014) We validated this observation in brain samples and showed that this decrease was dependent on the Braak stage (Fig 7). Since the brain isoforms are the main isoforms that are overexpressed in the brain of our transgenic mice model, these data corroborate the idea that specific overexpression of the brain BIN1 isoforms may be protective. We may thus postulate that the overexpression of brain isoforms in the TgBIN1 mouse reverses a neuropathological process that occurs in AD brains. Notably, this protective effect could be partly or fully explained by other mechanisms than the BIN1-Tau interaction in neurons. Indeed, we observed that at 18 months *MAPT* over-expression is associated with myelin abnormalities, and a significant rescue of this phenotype was

observed in hTau;Tg*BIN1* mice (Fig. S15). Of note, the over-expression of BIN1 alone did not induce any myelin abnormalities (see supplementary results; (Fig. S16)). Thus, the memory impairments observed in the behavioral analyses of the hTau mice may also be associated with myelin disorganization in the fornix, and be rescued upon BIN1 overexpression. Interestingly, BIN1 has been described to be strongly expressed in oligodendrocytes (De Rossi et al. 2016) and Tau has been also previously linked with potential myelin dysfunction in tauopathies. (Ferrer 2018)

Beyond this possibility, identifying the signaling mechanisms controlling the BIN1-Tau interaction might be of high interest to understand the pathophysiological processes in AD. These pathways could be either protective or deleterious, by favoring or abrogating the BIN1-Tau interaction, respectively. In this report we characterized a key regulatory element, which is the phosphorylation of BIN1 at T348. Remarkably, we determined that the phospho-BIN1(T348):BIN1 ratio increased with increasing Braak stage, and in the brains of AD cases. These findings indicate that a higher fraction of brain BIN1 isoforms is phosphorylated at T348 in AD brains, where the global level of brain BIN1 isoforms is decreased (due to the low number of samples analyzed, this observation will need to be replicated in independent samples). This may suggest that the relative increase in BIN1 T348 phosphorylation may occur to compensate in part the decrease in the brain BIN1 isoforms in order to maintain the BIN1-Tau interaction. Regardless of the potential mechanisms involved, these observations suggest that BIN1 T348 phosphorylation may be involved in the development of AD.

Our data thus indicate that the BIN1-Tau interaction is complex and dynamic, potentially controlled by numerous actors modifying the level of phosphorylation of both BIN1 and Tau. Indeed, we had previously shown that the phosphorylation of Tau at T231 was a major regulator of the BIN1-Tau interaction, but in the opposite direction, *i.e.*, leading to a decrease in this interaction. Importantly, the increase in Tau phosphorylation at T231 is considered as an early marker of the development of AD. (Buee et al. 2000) This dual BIN1/Tau regulation is illustrated in our HCS screening, which revealed that inhibiting CaN favors BIN1-Tau interaction by increasing BIN p-T348, whereas inhibiting MEK hinders it by increasing Tau p-T231. Cdks – particularly Cdk5 – highlight this complexity, since these kinases are able to phosphorylate both BIN1 T348 and Tau T231, but with opposite effects on the abilities of Tau and BIN1 to interact with each other: increased Cdk5 activity would increase

BIN1's affinity for Tau through phosphorylation of BIN1 at T348, and, conversely, would decrease Tau's affinity for BIN1 through phosphorylating Tau at T231 (Fig. 8). This complex interplay between actors modulating BIN1 and Tau phosphorylation may be a limitation for developing drugs to favor or prevent the BIN1-Tau interaction. A better understanding of the mechanisms involved will thus be needed to identify potential cell signaling pathways and drug targets that would uncouple the BIN1-Tau phosphorylation crosstalk. In this context, CaN-dependent pathways may be of interest, since we observed that only BIN1 T348 is modulated by CaN, but not Tau T231.

In conclusion, for the first time, we characterized the impact of overexpression of BIN1, a major genetic risk factor of AD, in a tauopathy model. Our data also reinforce the hypothesis that a potential protective impact of this overexpression on the AD process may be linked to the direct interaction of BIN1 and Tau, and depends strongly on the phosphorylation statuses of both proteins.

## Materials and Methods

### Animal ethics

Animal experiments were approved by the Com'Eth (project file: 2014-056) and accredited by the French Ministry for Superior Education and Research in accordance with the Directive of the European Parliament: 2010/63/EU. For all tests described, mice were kept in specific pathogen free conditions with free access to food and water, and were bred with littermates. The light cycle was controlled as 12 h light and 12 h dark (lights on at 7AM). Before all behavioral experiments, handling was done every day for one week before the beginning of the experiment.

### Mouse lines and genotyping

We used several mouse lines carrying the inactivation of *Mapt*: B6.Cg *Mapt*<sup>tm1(EGFP)Klt/+</sup>, noted here *Mapt*<sup>+/-</sup>, a line overexpressing human Tau: B6.Cg *Mapt*<sup>tm1(EGFP)Klt/tm1(EGFP)Klt</sup> *Tg(MAPT)8cPdav/J*, named here hTau, and another line overexpressing human BIN1: B6 *Tg(Bin1)U154.16.16Yah*, named here TgBIN1/0.(Daudin et al. 2018) In order to generate cohorts of animals carrying hTau alone, hTau;TgBIN1, and *Mapt*<sup>+/-</sup> as control littermate, we crossed *Mapt*<sup>+/-</sup>; *Tg(MAPT)8cPdav/J* with *Mapt*<sup>+/-</sup>; TgBIN1. All animals were crossed on C57BL/6J background. Primer sequences are available in [Table S1](#).

### Design of behavioral experiments

Animals studied in behavioral tasks were both males and females. Same animals were longitudinally tested at 3, 6, 9, 12, and 15 months. All animals were killed at 18 months for histology and molecular biology experiments.

### Novel object recognition task

This task was performed in the same conditions as in the open field paradigm (see above). The objects to be discriminated were a glass marble (2.5 cm in diameter) and a plastic dice (2 cm). The animals were first habituated to the open field for 30 min. The next day, they were submitted to a 10 min acquisition trial during which they were placed in the open field in the presence of two similar objects (object A; marble or dice). The time the animal took to explore the object A (when the animal's snout was directed towards the object at a distance  $\leq 1$  cm) was recorded manually. A 10 min retention trial was performed 1 h later. During this trial, one of the familiar objects in the open field was replaced with a new one (object B), and the time periods that the animal took

to explore the two objects were recorded ( $t_A$  and  $t_B$  for objects A and B, respectively). Two exclusion criteria were applied to select those animals that had memorized the objects: (i) during the acquisition trial, mice exploration should be longer than 3 s, and (ii) during the retention trial, mice exploration should also be longer than 3 s. The exploration index for object B was defined as  $(t_B / (t_A + t_B)) \times 100$ . Memory was defined by the percentage of time animals spent investigating the novel object statistically different from the chance (50%). To control for odor cues, the open field arena and the objects were thoroughly cleaned with 50% ethanol, dried, and ventilated between sessions. All animals were tracked with Noldius software (Ethovision).

### **Morris water maze task**

The Morris water maze was used to test spatial learning and memory. Each session was performed one week after NOR task and constituted the last behavioral experiment. The water maze is a circular pool (150 cm in diameter, 60 cm in height), filled with water up to 40 cm mark that is maintained at 20-22°C, and made opaque using a white aqueous emulsion (Acusol OP 301 opacifier). The surface was split into 4 quadrants: South-East (SE), North-West (NW), North-East (NE), and South-West (SW). The escape platform, made of rough plastic, was submerged 1 cm below the water's surface. Experiments were performed to study reference memory through a spatial search strategy that involved finding the hidden platform. The spatial memory session consisted of a 6-day (J1 to J6) learning phase with four 90 s trials per day. Each trial started with mice facing the interior wall of the pool and ended when they climbed onto the platform located on the SE quadrant, or after a maximum searching time of 90 s. The starting position was changed pseudo-randomly between trials. Mice were left undisturbed in their home cage for 90 min intertrial intervals. On the 7<sup>th</sup> day, mice were given the 60 s probe test, in which the platform had been removed. The distances traveled in each quadrant (NW, NE, SW, and SE) were recorded, as well as the time spent in the target quadrant. At 6, 9 and 12 months of age, the platform was located in the NE quadrant, whereas at 15 months of age, the platform was located in the SW quadrant. All animals were tracked with Noldius software (Ethovision).

### **Brain protein extraction and Western blotting**

Mice were killed by cervical dislocation and brains were quickly removed and dissected. Structures were immediately frozen in liquid nitrogen, and conserved at -80°C. For protein extraction we used fresh extraction buffer with pH adjusted to 7,5 (20

mM Tris at pH = 7,5; 50 mM NaCl; 2 mM EGTA; 1% Triton X-100; 10 mM NaF; 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 2 mM β Glycerophosphate; cOmplete™ EDTA-free protease inhibitor cocktail). Tissues were lysed using Precellys apparatus and centrifuged at 33,000 ×g for 30 min. Protein quantification was performed using the BCA protein assay (Thermo Scientific; Waltham, MA). 10-20 μg of total protein from extracts were separated in SDS–polyacrylamide gels (10%) and transferred to nitrocellulose membranes. Depending on the target protein, we used bovine serum albumin or milk (5% in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20, TTBS; 1 h at RT) to block non-specific binding sites of phosphorylated and non-phosphorylated proteins, respectively. Immunoblotting was carried out with primary antibodies (Table S2) for 1 h at RT. Then membranes were washed 5 times in TTBS, followed by incubation with secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (Table S2). Immunoreactivity was visualized using ECL chemiluminescence system (SuperSignal™, Thermo Scientific). Chemiluminescence was captured with Amersham Imager and signals were quantified with ImageJ (NIH; Bethesda, MD).

### **Immunofluorescence in brain slices**

Mice were anesthetized with 5% ketamine and 10% xylazine and perfused first with PBS and then with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. After removal, brains were immersed in 4% PFA overnight at 4°C, followed by multiple rinses with PBS, and put in 30% sucrose in PBS until they sink. Once they sink, they were embedded in O.C.T. tissue freezing compound (Scigen; Gardena, CA), and stored at -80°C until they were cut with a cryostat at 10 μm thickness. For immunofluorescence, slices were first permeabilized with 0.1% Triton in PBS, with 10% horse serum and 5% BSA for 30 min. The primary antibody (Table S2) was then applied overnight at 4°C in the permeabilization buffer. After multiple rinses with PBS, the secondary antibody (Table S2) in 0.1% Triton was applied for 1 h at RT. After multiple rinses, slices were stained with 1:1000 Hoechst (Sigma; St. Louis, MO). After multiple rinses, slices were mounted in Fluorsave (Merck Millipore; Darmstadt, Germany). Slices were imaged with NanoZoomer slice scanner (Hamamatsu Photonics; Massy, France).

### **Electron microscopy of brain slices**

Mice were PFA-fixed as described. After removal, brains were immersed in 4% PFA and 4% glutaraldehyde in PBS overnight at 4°C. Coronal sections were obtained with Leica VT1000 vibratome (Leica Biosystems; Nanterre, France), and the tissue was cut



to expose the dorsal fornix and the upper part of the hippocampus as shown in [Fig. 3](#). The tissues were post-fixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated through graded ethanol (50, 70, 90, and 100%) and propylene oxide for 30 min each, and embedded in Epon 812 (EMS; Hatfield, PA). Semithin sections were cut at 2  $\mu\text{m}$  on an ultramicrotome (Ultracut UCT; Leica) and ultrathin sections were cut at 70 nm, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined at 70 kV using a Morgagni 268D electron microscope (Thermo Scientific). Images were captured digitally by Mega View III camera (Soft Imaging System; Münster, Germany).

### **Primary neuronal culture**

Culture media and supplements were from Thermo Scientific, unless mentioned otherwise. Primary hippocampal neurons were obtained from P0/P1 rats, according to previously described procedures (Beaudoin et al. 2012; Kaech and Banker 2006) with minor modifications. Briefly, cortices and hippocampi were isolated from new-born rats, washed with ice-cold dissection medium (HBSS supplemented with HEPES, sodium pyruvate, and penicillin/streptomycin), and trypsinized (2.5%; 10 min; 37°C). Trypsin was inactivated with dissociation medium (MEM supplemented with inactivated FBS, Glutamax, D-glucose (Sigma), MEM vitamins, and penicillin/streptomycin), followed by DNase (5 mg/ml; Sigma) incubation for 1 min and wash with dissection medium. Media was replaced by dissociation medium and tissue was triturated with a fire-polished cotton-plugged Pasteur pipette to obtain a homogenous cell suspension, followed by centrifugation (200  $\times g$  for 5 min) and wash with dissociation medium. Cells were resuspended in culture medium (Neurobasal A supplemented with Glutamax and B<sub>27</sub> neural supplement with antioxidants), counted, and plated in 384-well plates (Greiner bio-one; Kremsmünster, Austria) at a density of 50,000 cells/cm<sup>2</sup> for HCS, on Ø13 mm coverslips in 24-well plates at a density of 25,000 cells/cm<sup>2</sup> for proximity ligation assay (PLA), or directly in 24-well plates without coverslips at density 100,000 cells/cm<sup>2</sup> for immunoblots. Coverslips and plates were pre-coated with poly-L-lysine (Alamanda Polymers; Huntsville, AL) overnight at 37°C and rinsed thoroughly with water. After 20-24 h, culture media was replaced with supplemented Neurobasal A medium and cultures were maintained in a tissue culture incubator (Panasonic; Osaka, Japan) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 7, 14, or 21 days.

### **Viral transductions**

PNC were transduced on DIV8 with lentiviral constructs for silencing (MOI = 4) using Mission pLKO,1-puro-CMV-shRNA vectors (Sigma), non-targeting (05191520MN) and shBIN1 (TRCN0000380439). Overexpression constructs were obtained from Gene Art (Thermo Fisher) based on pLenti6/Ubc/v5-DEST vectors (Life Technologies, Carlsbad, CA): BIN1iso1 (NM\_009668), BIN1iso1 phosphomimetic T348E (cDNA with Thr<sup>348</sup>→Glu), BIN1 isoform 9 (NM\_139349), and an overexpression control vector (mock). The transduction was performed according to a previously described procedure (Long et al. 2015) with minor modifications: For PNC in 24-well plates, viral constructs at multiplicity of infection (MOI) 2 were added to pre-warmed supplemented Neurobasal A media with Polybrene (0.1% final concentration; Sigma) at 10x concentration. Half of the culture media from multi-well plates were collected and stored. The transduction mixture was added to each well to reach 250 µl final volume and neurons were incubated for 6 h. At the end of this period, wells were topped with 250 µl collected media and neurons were maintained in the incubator until fixation or protein harvest. Transduced neurons were either fixed or harvested on DIV14.

### Immunoblotting

PNC were harvested in minimum volume of 40 µl/well in ice-cold lysis buffer as described earlier.(Chapuis et al. 2017) Lysates were mixed with 4x LDS (Novex; Life Technologies) and 10x reducing agent (Novex) loaded on pre-cast NuPage 4-12% bis-Tris acrylamide 10 well gels (Novex) and transferred to nitrocellulose membranes using the BioRad Trans-blot transfer system kit (BioRad, Hercules, CA). Membranes were blocked in 5% non-fat milk in 1x TNT buffer. Primary antibodies were diluted in SuperBlock T20 (TBS) blocking buffer (Thermo Fisher) and kept at 4°C overnight: mouse BIN1-99D (clone 99D; 1:1,000; cat. no. 05-449, Merck Millipore), rabbit TauC (1:10,000), mouse beta-actin (1:10,000; Sigma), rabbit phospho-BIN1 Thr 348 (1:10,000; custom made by Biotem, Apprieu, France), mouse Tau 1 non-phospho Ser 195-Ser 202 (aa197-205) (1:10,000; Merck Millipore), mouse AT180 phospho Thr 231 (1:500, Thermo Fisher), mouse RZ3 Thr 231 (1:500), and mouse PHF1 phospho Ser396/404 (1:1000). The last two antibodies were kind gifts from Peter Davies. We further confirmed the specificity of this antibody for the neuronal isoform by silencing BIN1 and overexpressing BIN1iso1 or BIN1iso9 (Fig. S17). Detection was performed using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (1:5000, Jackson) for 1-2 h at RT. The membrane was revealed through chemiluminescence

(Luminata Crescendo™, EMD Merck Millipore) and imaged with Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Mississauga, Canada). The images were quantified with ImageQuantTL Software (GE Healthcare).

### **Analysis of neuropathological human sample cohort**

Assessment of AD-related neurofibrillary pathology (Braak stage) was performed for 14 individuals after death (Table S3) with immunostaining of paraffin sections with AT8 antibody, which detects hyperphosphorylated Tau.(Braak et al. 2006) Protein extractions from the frozen temporal lobe tissue samples were performed as previously described.(Natunen et al. 2013) Protein quantification was performed using BCA protein assay. Total proteins (20 µg/lane) were separated on 4-12% Bis-Tris-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE; Invitrogen) under reducing conditions and subsequently blotted onto polyvinylidene difluoride membranes using iBlot 2 Dry Blotting System (Thermo Scientific). Primary antibodies against phospho-BIN1 Thr 348 (1:1,000), total BIN1 (1:1,000) and β-actin (1:1,000; cat. no. ab8226, Abcam) were used for immunoblotting. After incubation with the appropriate HRP-conjugated secondary antibodies, the protein bands were detected using ImageJ.

### **Lambda protein phosphatase assay**

Crude protein extracts were incubated with Lambda protein phosphatase (New England Biolabs; Ipswich, MA), following supplier's instructions with minor changes. DIV21 PNC were harvested on ice in 40 µl ice-cold lysis buffer per well without protein phosphatase inhibitors, lysates were sonicated, centrifuged for 10 min at 1,000× *g* and the supernatant was distributed into 2 new tubes; volumes were adjusted to 40 µl with MilliQ H<sub>2</sub>O, and supplemented with 5 µl of 10× NEBuffer and 5 µl of 10 mM MnCl<sub>2</sub> (provided with the enzyme); 1 µl of lambda protein phosphatase (λ-PP) was added to one of the tubes and both tubes were incubated for 30 min at 30°C. 4× LDS and 10× reducing agent were added to the tubes, samples were boiled at 95°C for 10 min and immunoblotted as described before.

### **In vitro assay with recombinant proteins**

BIN1 phosphorylation in vitro was assessed in kinase buffer containing 20 mM MOPS, pH 7.4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM ATP, and 1 mM DTT. Purified GST-BIN1 (500 ng) was incubated with recombinant GST-tagged Cdk5/p35 (100 ng) at RT for 1h. The reaction was terminated by the addition of boiled SDS sample buffer. After electrophoresis of

the samples were run on SDS-PAGE. In addition, Cdk2/CycA3 kinase (Welburn and Endicott 2005) was used to obtain Bin1iso1 phosphorylated on T348 residue. The capacity of the kinase to phosphorylate T348 was first verified using the CLAP (334-359) peptide as substrate and mass spectrometry to assess the addition of a phosphate group. In addition, the phosphorylated peptide was detected using the antibody directed against pT348 (Fig. S12B, inset). For NMR experiments, 100  $\mu$ M  $^{15}$ N-BIN1iso1 was incubated with recombinant Cdk2/CycA3 kinase (molar ratio 1/100), for 3 h at 37°C, in the presence of 2 mM ATP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 2 mM DTT, 30 mM NaCl and protease inhibitors in 50 mM HEPES, pH 8.0 (Fig. S12). Control experiment was performed in the absence of ATP. Phosphorylation of Bin1Iso1 at T348 was verified using western blot analysis with an antibody directed against pT348.

### NMR spectroscopy

NMR experiments were recorded at 20°C on Bruker 900-MHz spectrometer. NMR measurements were performed in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.3, 30 mM NaCl, 3 mM DTT and 10% D<sub>2</sub>O. BIN1iso1, BIN1iso1-CLAP-T348E and Cdk2-phospho-BIN1iso1  $^1$ H- $^{15}$ N HSQC spectra were all recorded with a TXI probe at a protein concentration of 100  $\mu$ M. These 2D spectra were acquired with 3072 points in the direct and 180 points in indirect dimensions for spectral width of 13 ppm and 26 ppm, respectively, and with 512 scans. BIN1-SH3 domain  $^1$ H- $^{15}$ N HSQC spectrum was recorded with a cryogenic probe with 3072 points in the direct and 256 points in indirect dimensions for spectral width of 14 ppm and 26 ppm, respectively, and with 48 scans. Spectra were processed using TopSpin software (Bruker). BIN1-SH3 domain backbone assignments were previously reported. (Malki et al. 2017) The NMR titration data were obtained by adding aliquots of 4 mM stock solutions of unlabeled peptides Q L R K G P P V P P P P K H **I** P S K E V K Q I L CLAP (334-359) or phospho-T348 CLAP (334-359), phosphorylated residue in bold in the sequence, to 100  $\mu$ M  $^{15}$ N-labeled BIN1-SH3 domain, using HSQC spectra to monitor changes in amide and tryptophan indole chemical shift values.  $K_d$  were calculated based on these data (see Supplementary Information for details).

### Semi-automated high-content screening for modulators of BIN1-Tau interaction

A compound screen was setup by combining a commercial library of 1,120 compounds (10  $\mu$ M; #2890; Tocris Biosciences, Bristol, UK), 6 Sanofi proprietary compounds (0.1, 1, and 10  $\mu$ M; Sanofi; Chilly-Mazarin, France), Okadaic acid (1  $\mu$ M; Merck Millipore)

as a control compound, and DMSO (0.1%; VWR; Radnor, PA). Tocriscreen™ Mini is a library of well-characterized biologically active compounds that allows the screening of a wide-range of cellular processes, such as inflammation, apoptosis, cell differentiation, signal transduction, intracellular transport. 1000× stock compounds were transferred into intermediate 384-well plates using Echo 550 liquid Handler (Labcyte; San Jose, CA), and plates were sealed and kept at -20°C. Neurons cultured in 384-well plates were maintained for 21 days and transferred to HCS platform incubator (Liconic instruments; Mauren, Liechtenstein) on the day of screening. Compounds in intermediate plates were resuspended in 30 µl Neurobasal A, to reach 5× concentration, followed by a 2 min-long centrifugation at 100 ×g. 10 µl of resuspended compounds were then added into respective wells in PNC plates using Bravo automated liquid handling platform (Agilent; Santa Clara, California, USA), containing 40 µl of culture media, and plates were returned to the incubator. To achieve equal treatment duration for all plates, the compounds were resuspended and transferred with 10 min intervals between plates. Neurons were incubated with compounds for 2.5 h and fixed with 4% paraformaldehyde (EMS; Hatfield, PA) in PBS (Dutscher; Brumath, France) for 20 min at RT, permeabilized with 0.3% Triton-X (Sigma) in PBS for 10 min at RT, and blocked with 5% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) and 0.1% Triton-X in PBS for 1 h at RT. Alternatively, neurons in 384-well plates were blocked with 2.5% BSA (Sigma) and 0.1% Triton-X in PBS, up to 14 days at 4°C. Neurons were washed with PBS at RT between each step.

### **Proximity ligation assay (PLA)**

All components of PLA (Duolink PLA probes and *in situ* detection reagents) apart from the primary and secondary antibodies were from Sigma. PLA was performed following manufacturer's instructions with minor modifications. (Bagchi, Fredriksson, and Wallen-Mackenzie 2015; Soderberg et al. 2008) After protein blocking, neurons were incubated with the following primary antibodies overnight at 4°C: BIN1-99D (mouse monoclonal IgG, 1:200; Merck Millipore), Tau (rabbit polyclonal IgG, 1:500; Dako-Agilent), MAP2 (chicken polyclonal IgG, 1:500; Synaptic Systems; Göttingen, Germany), and GFAP (chicken polyclonal IgG, 1:300; Synaptic Systems). Samples were washed with a solution of 0.15 M NaCl (Merck Millipore), 0.01 M Tris (Sigma), 0.05% Tween-20 (Sigma), at pH 7.4 (Buffer A), incubated with PLA probes Mouse-minus and Rabbit-plus (secondary antibodies labeled with complementary DNA

strands) in Duolink antibody diluent for 1 h at 37°C, and washed with Buffer A. This was followed by the enzymatic ligation of the two DNA strands, provided that they were in close proximity (< 30 nm), (Soderberg et al. 2008) for 30 min at 37°C and another wash with Buffer A. This was followed by the enzymatic rolling-circle amplification of DNA and hybridization of Cy3-labelled oligonucleotides (PLA orange) for 100 min at 37°C. Samples were then washed with a solution of 0.1 M NaCl and 0.2 M Tris, at pH 7.5 (Buffer B). After the PLA process, samples were incubated with the following secondary antibodies for 1 h at RT: AlexaFlour488 donkey-anti-chicken, AlexaFlour488 donkey-anti-mouse, AlexaFlour647 donkey-anti-rabbit, and DyLight405 donkey-anti-chicken (1:500 for coverslips and 1:1000 for 384-well plates; Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA). Coverslips were washed with PBS and mounted in glycerol. 384-well plates were washed with PBS and sealed.

PLA in brain slices was performed with additional modifications. (Gomes, Sierra, and Devi 2016) Slices were first permeabilized with 0.3% Triton in PBS for 30 min and blocked with Duolink blocking solution for 2 h at 37°C. Slices were next treated with the IgG blocking reagent overnight at 4°C and with the protein concentrate, according to manufacturer's instructions (M.O.M. Basic Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Primary antibodies BIN1-99D (1:80), Tau (1:200), and  $\alpha$ -tubulin (mouse monoclonal, 1:200; clone DM1A; Sigma) were diluted in the Duolink antibody diluent and incubated overnight at 4°C. Samples were washed with Buffer A, incubated with PLA probes Mouse-minus and Rabbit-plus in Duolink antibody diluent for 1 h at 37°C, and washed with Buffer A. This was followed by DNA ligation for 30 min at 37°C and another wash with Buffer A. This was followed by the enzymatic amplification and PLA hybridization for 2 h at 37°C. Samples were then washed with Buffer B and 1:5000 Hoechst (H3569, Thermo Scientific). After the PLA process, samples were incubated with the secondary antibodies AlexaFlour488 donkey-anti-mouse and AlexaFlour647 donkey-anti-rabbit (1:200) for 2 h at RT, followed by several washes with Buffer B. To reduce autofluorescence, the brain slices were treated with 0.1% Sudan Black B (Sigma) in 70% ethanol for 15 min. Samples were then washed with Buffer B and mounted in 90% glycerol.

### **Image acquisition and analysis**

Coverslips were imaged with LSM 710 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) using a 40× 1.6 NA objective. Images were acquired at zoom 2 in z-stacks

of 0.3  $\mu\text{m}$  interval. 10-13 images per condition were acquired for each of the three independent experiments. Images were deconvoluted using AutoQuantX3 Software (Bitplane, Zurich, Switzerland) and analysed with Imaris Software (Bitplane), using the "surfaces" tool for defining PLA spots, Tau network, and BIN1 puncta in three dimensions. Imaris results were analyzed using a custom MATLAB (MathWorks; Natick, MA) code that removes outliers based on  $\pm 3$  median absolute deviations (MAD).

384-well plates were imaged using IN Cell Analyzer 6000 Cell Imaging System (GE Healthcare; Little Chalfont, UK) equipped with a Nikon 60 $\times$  0.95 NA objective and a CMOS camera. 16 images (2,048  $\times$  2,048 pixels) per well were acquired in four channels (DAPI, dsRed, FITC, and Cy5) using appropriate filter sets and with following acquisition parameters: 2 $\times$ 2 binning; bias = 96.9; gain = 1.0 (Fig. S18). Images were analyzed with Columbus image data storage and analysis system (Perkin Elmer; Waltham, MA) with analysis scripts optimized *via* a custom MATLAB code (Fig. S18B). Optimal analysis scripts were determined separately for each plate.

Brain slices were imaged with Axio Scan Z1 (Zeiss) using a 40 $\times$  1.6 NA objective. Images were acquired in 12 z-stacks of 1  $\mu\text{m}$  interval. Regions of interest were marked around the hippocampus and the perirhinal cortex during acquisition in each of the 3 independent experiments. PLA spots were analyzed with Imaris using the "surfaces" tool. Imaris results were analyzed using MATLAB after removing outliers based on  $\pm 3$  MAD.

### **HCS script optimization and plate validation**

Before image transfer, IN Cell image registration and transfer files were manually edited to import images only from control wells to Columbus, thereby generating the so-called control plates for script optimization and plate validation. Analysis scripts consisted of a series of Columbus commands that determine (i) total Tau staining area and (ii) total area of PLA spots within the Tau network, for each well (Fig. S18A). Four optimization parameters were defined: (i) Tau area threshold in terms of standard deviation (SD) of Tau intensity; (ii) sensitivity parameter for PLA spot detection; (iii) background correction parameter for PLA spot detection; and (iv) minimum PLA spot contrast. Analysis scripts were created by assigning distinct values to each optimization parameter. For example, assigning three distinct values per parameter

resulted in  $3^4 = 81$  combinations; hence the optimization was performed by running Columbus with 81 separate analysis scripts.

Measured values were corrected for spatial bias (horizontal) using the slope of the line that fits the column averages in the control plate based on the least-squares method. Three values typically used in HCS analysis (Bray et al. 2004) were evaluated: (i)

strictly standardized mean difference ( $\beta$  factor,  $\beta = (\mu_n - \mu_p) / \sqrt{\sigma_n^2 + \sigma_p^2}$ ); (ii) Z factor ( $Z' = 1 - 3(\sigma_p + \sigma_n) / |\mu_p - \mu_n|$ ); and (iii) signal-to-background ratio ( $S/B = \mu_p / \mu_n$ ), where  $\mu$  and  $\sigma$  are mean and standard deviation, and  $p$  and  $n$  indicate positive and negative controls. Optimal analysis script was determined as the one with the highest  $\beta$  factor ( $\beta \geq 2$ ), provided that it produced S/B of at least 10. Additional rounds of parameter optimization were performed as deemed necessary.

### Plate analysis and hits selection

Full plates were analyzed with optimal analysis scripts after correcting for local bias in terms of total Tau area, total MAP2 area, and total area of PLA spots within Tau area (Fig. S18C): First the local median of 5x5 wells surrounding the target well calculated and normalized with the plate median excluding edge wells, *i.e.*, *corrected value = raw value  $\times$  plate median / local median*. For each plate, compounds affecting network quality, defined as being outside median  $\pm 3$  median absolute deviations (MAD) in terms of Tau area or Tau:MAP2 area ratio (edge wells were excluded from these calculations), were excluded (Fig. S19). For each well, corrected PLA:Tau area ratio was normalized by plate mean, excluding edge wells and wells with compounds affecting network quality. After all screenings were performed, mean and SEM of normalized, corrected PLA:Tau area ratio were calculated for each compound, for compounds that did not affect network quality in at least 2 screenings. Compounds potentially affecting BIN1-Tau interaction were determined as those belonging to the top or bottom 5% tiers.

### Validation of selected compounds

Hit validation was performed in a two-step procedure: first, dose-response curves were generated for selected compounds to identify specific effects; second, the impact of selected compounds on BIN1 phosphorylation was assessed through immunoblotting.



Since several of the selected compounds had multiple protein targets at 10  $\mu$ M concentration used in our screen, dose-response experiments were designed to validate the specific effects of the compounds and/or to identify relevant target proteins. Dose-response experiments were performed for 72 selected compounds that induced similar effect on PLA density in all three screens using the same protocol as for the compound screen. Selected compounds were diluted four log scales to obtain a dose-response curve (10nM, 100nM, 1 $\mu$ M and 10 $\mu$ M) and each compound and concentration was tested in three separate plates. Script optimization, plate validation, plate analysis, and well correction and exclusion processes were performed as described above. For each well, corrected PLA:Tau area ratios were normalized by the mean obtained from DMSO-treated wells of the same plate. The means of each compound at 10  $\mu$ M were compared with the results from screening (conducted at 10  $\mu$ M), and compounds that had similar effects in both sets of experiments were retained for further analysis. For each compound, dose-response curves were fit with 4-parameter or 3-parameter (where Hill slope is 1) nonlinear regression models, based on the extra sum-of-squares F test using GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA). PNC on DIV21 were incubated with selected compounds at 10  $\mu$ M for 2.5 h and BIN1 and Tau phosphorylation was assessed through immunoblotting.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed in GraphPad Prism 7 or in Matlab. When variables were normally distributed, parametric analyses were applied: one- or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni-corrected post hoc tests, Student's t-test, or one sample t-test. When variables were non-normally distributed, we conducted non-parametric analysis: Kruskal-Wallis ANOVA, followed by Dunn's test or Wilcoxon signed rank test with Tukey-Kramer correction.

### **Acknowledgements**

We thank the imaging and animal platforms of the IGBMC and ICS for help, and Nadia Messaddeq and Coralie Spiegelhalter for technical assistance. We thank Hamida Merzougui for technical assistance in recombinant protein preparation. We thank Nora L. Salaberry for technical assistance in preparing the summary cartoon. We thank the BiCeL platform of the Institut Pasteur de Lille for technical support. This study was funded by INSERM, CNRS, University of Strasbourg, ANR-10-LABX-0030-INR, a French state fund managed by the ANR

under the framework program Investissements d’Avenir (10-IDEX-0002), TGE RMN THC (FR-3050, France), FRABio (University of Lille, CNRS, FR 3688), ANR-BIN-ALZ-15-CE16-0002, France Alzheimer, the Alzheimer's Association (BFG-14-318355), the EU Joint Programme – Neurodegenerative Diseases Research (JPND; 3DMiniBrain), Fondation Vaincre Alzheimer (2017 pilot grant), Institut Pasteur de Lille, and Nord-Pas-de-Calais Regional Council. This work was also funded by the Lille Métropole Communauté Urbaine, the French government’s LABEX DISTALZ program (development of innovative strategies for a transdisciplinary approach to Alzheimer’s disease) The NMR facilities were funded by the Nord Regional Council, CNRS, Institute Pasteur de Lille, European Community (FEDER), French Research Ministry and the University of Lille. This work was also funded by the Academy of Finland (307866), Sigrid Jusélius Foundation, and the Strategic Neuroscience Funding of the University of Eastern Finland. M.S. was a fellow of France Alzheimer and received a fellowship from the Fond Paul Mendel de l’Université de Strasbourg. T.M. was supported by a CIFRE fellowship and by the LABEX DISTALZ program.

### **Author’s contributions**

I.L., D.K., Y.H., J.L., and J.-C.L. designed and/or supervised research. M.S. and D.M. performed the genotyping and first cohort selection and/or the behavioral experiments in animal model. M.S. performed Tau inclusion labeling and quantifications on mouse brains. S.D. performed PLA and quantification in mouse brains. T.M., S.D., N.M., J.C., A.F., and A.-C.V. performed the *in vitro* experiments. T.M., A.H., F.L., B.D., L.P., D.K., and J.-C.L. performed and/or analyzed the HCS experiments. P.M., M.M., and M.H. performed Western blots and/or analyzed the human sample cohort. A.L., I.M., F.-X.C., and I.L. performed and/or analyzed the NMR experiments. M.S., T.M., P.A., L.P., I.L., D.K., Y.H., J.L., and J.-C.L. wrote and/or revised the paper.

### **Conflict of interest**

J.L. is owner of a patent on the rescue of myotubular myopathy by BIN1 modulation. T.M. and L.P. are employees of Sanofi S.A.

## References

1. Prince, M., Bryce, R., Albanese, E. et al. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement* **9**, 63-75.e62 (2013).
2. Zempel, H. & Mandelkow, E. Lost after translation: missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease. *Trends Neurosci* **37**, 721-732 (2014).
3. Hardy, J. & Selkoe, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **297**, 353-356 (2002).
4. Gatz, M., Reynolds, C.A., Fratiglioni, L. et al. Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* **63**, 168-174 (2006).
5. Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R. et al. Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* **43**, 429-435 (2011).
6. Lambert, J.C., Heath, S., Even, G. et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* **41**, 1094-1099 (2009).
7. Lambert, J.C., Ibrahim-Verbaas, C.A., Harold, D. et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* **45**, 1452-1458 (2013).
8. Sims, R., van der Lee, S.J., Naj, A.C. et al. Rare coding variants in PLCG2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Genet* **49**, 1373-1384 (2017).
9. Lambert, J.C. & Amouyel, P. Deciphering genetic susceptibility to frontotemporal lobar dementia. *Nat Genet* **42**, 189-190 (2010).
10. Dourlen, P., Fernandez-Gomez, F.J., Dupont, C. et al. Functional screening of Alzheimer risk loci identifies PTK2B as an in vivo modulator and early marker of Tau pathology. *Mol Psychiatry* **22**, 874-883 (2017).
11. Shulman, J.M., Chipendo, P., Chibnik, L.B. et al. Functional screening of Alzheimer pathology genome-wide association signals in Drosophila. *Am J Hum Genet* **88**, 232-238 (2011).
12. Shulman, J.M., Imboywa, S., Giagtzoglou, N. et al. Functional screening in Drosophila identifies Alzheimer's disease susceptibility genes and implicates Tau-mediated mechanisms. *Hum Mol Genet* **23**, 870-877 (2014).
13. Beecham, G.W., Hamilton, K., Naj, A.C. et al. Genome-wide association meta-analysis of neuropathologic features of Alzheimer's disease and related dementias. *PLoS Genet* **10**, e1004606 (2014).
14. Cruchaga, C., Kauwe, J.S., Harari, O. et al. GWAS of cerebrospinal fluid tau levels identifies risk variants for Alzheimer's disease. *Neuron* **78**, 256-268 (2013).
15. Nelson, P.T., Alafuzoff, I., Bigio, E.H. et al. Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**, 362-381 (2012).
16. Huber, C.M., Yee, C., May, T., Dhanala, A. & Mitchell, C.S. Cognitive Decline in Preclinical Alzheimer's Disease: Amyloid-Beta versus Tauopathy. *J Alzheimers Dis* **61**, 265-281 (2018).
17. Chapuis, J., Hansmannel, F., Gistelincq, M. et al. Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol Psychiatry* **18**, 1225-1234 (2013).
18. Prokic, I., Cowling, B.S. & Laporte, J. Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J Mol Med (Berl)* **92**, 453-463 (2014).
19. Butler, M.H., David, C., Ochoa, G.C. et al. Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J Cell Biol* **137**, 1355-1367 (1997).
20. Ramjaun, A.R., Micheva, K.D., Bouchelet, I. & McPherson, P.S. Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *J Biol Chem* **272**, 16700-16706 (1997).

21. Daudin, R., Marechal, D., Wang, Q. et al. BIN1 genetic risk factor for Alzheimer is sufficient to induce early structural tract alterations in entorhinal cortex-dentate gyrus pathway and related hippocampal multi-scale impairments. *bioRxiv* (2018).
22. De Rossi, P., Buggia-Prevot, V., Clayton, B.L. et al. Predominant expression of Alzheimer's disease-associated BIN1 in mature oligodendrocytes and localization to white matter tracts. *Mol Neurodegener* **11**, 59 (2016).
23. Miyagawa, T., Ebinuma, I., Morohashi, Y. et al. BIN1 regulates BACE1 intracellular trafficking and amyloid-beta production. *Hum Mol Genet* **25**, 2948-2958 (2016).
24. McKenzie, A.T., Moyon, S., Wang, M. et al. Multiscale network modeling of oligodendrocytes reveals molecular components of myelin dysregulation in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **12**, 82 (2017).
25. Calafate, S., Flavin, W., Verstreken, P. & Moechars, D. Loss of Bin1 Promotes the Propagation of Tau Pathology. *Cell Rep* **17**, 931-940 (2016).
26. Malki, I., Cantrelle, F.X., Sottejeau, Y. et al. Regulation of the interaction between the neuronal BIN1 isoform 1 and Tau proteins - role of the SH3 domain. *Febs j* **284**, 3218-3229 (2017).
27. Polydoro, M., Acker, C.M., Duff, K., Castillo, P.E. & Davies, P. Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of tau pathology. *J Neurosci* **29**, 10741-10749 (2009).
28. Andorfer, C., Acker, C.M., Kress, Y. et al. Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *J Neurosci* **25**, 5446-5454 (2005).
29. Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A. & Hof, P.R. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* **33**, 95-130 (2000).
30. Sottejeau, Y., Bretteville, A., Cantrelle, F.X. et al. Tau phosphorylation regulates the interaction between BIN1's SH3 domain and Tau's proline-rich domain. *Acta Neuropathol Commun* **3**, 58 (2015).
31. Bauerfeind, R., Takei, K. & De Camilli, P. Amphiphysin I is associated with coated endocytic intermediates and undergoes stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals. *J Biol Chem* **272**, 30984-30992 (1997).
32. Floyd, S.R., Porro, E.B., Slepnev, V.I. et al. Amphiphysin 1 binds the cyclin-dependent kinase (cdk) 5 regulatory subunit p35 and is phosphorylated by cdk5 and cdc2. *J Biol Chem* **276**, 8104-8110 (2001).
33. Qi, H., Prabakaran, S., Cantrelle, F.X. et al. Characterization of Neuronal Tau Protein as a Target of Extracellular Signal-regulated Kinase. *J Biol Chem* **291**, 7742-7753 (2016).
34. Broadbent, N.J., Squire, L.R. & Clark, R.E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14515-14520 (2004).
35. Van Cauter, T., Camon, J., Alverne, A. et al. Distinct roles of medial and lateral entorhinal cortex in spatial cognition. *Cereb Cortex* **23**, 451-459 (2013).
36. Chapuis, J., Flaig, A., Grenier-Boley, B. et al. Genome-wide, high-content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 as a major modulator of APP metabolism. *Acta Neuropathol* **133**, 955-966 (2017).
37. Glennon, E.B., Whitehouse, I.J., Miners, J.S. et al. BIN1 is decreased in sporadic but not familial Alzheimer's disease or in aging. *PLoS One* **8**, e78806 (2013).
38. Holler, C.J., Davis, P.R., Beckett, T.L. et al. Bridging integrator 1 (BIN1) protein expression increases in the Alzheimer's disease brain and correlates with neurofibrillary tangle pathology. *J Alzheimers Dis* **42**, 1221-1227 (2014).
39. Ferrer, I. Oligodendroglial pathology in neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates: The forgotten partner. *Prog Neurobiol* **169**, 24-54 (2018).
40. Duff, K. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and mechanisms of pathogenesis. *Biochem Soc Symp*, 195-202 (2001).
41. Beaudoin, G.M., 3rd, Lee, S.H., Singh, D. et al. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nat Protoc* **7**, 1741-1754 (2012).

42. Kaech, S. & Banker, G. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* **1**, 2406-2415 (2006).
43. Long, K., Mohan, C., Anderl, J. et al. Analysis of autophagosome formation using lentiviral biosensors for live fluorescent cellular imaging. *Methods Mol Biol* **1219**, 157-169 (2015).
44. Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H. & Del Tredici, K. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* **112**, 389-404 (2006).
45. Natunen, T., Parrado, A.R., Helisalmi, S. et al. Elucidation of the BACE1 regulating factor GGA3 in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **37**, 217-232 (2013).
46. Welburn, J. & Endicott, J. Methods for preparation of proteins and protein complexes that regulate the eukaryotic cell cycle for structural studies. *Methods Mol Biol* **296**, 219-235 (2005).
47. Bagchi, S., Fredriksson, R. & Wallen-Mackenzie, A. In Situ Proximity Ligation Assay (PLA). *Methods Mol Biol* **1318**, 149-159 (2015).
48. Soderberg, O., Leuchowius, K.J., Gullberg, M. et al. Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay. *Methods* **45**, 227-232 (2008).
49. Gomes, I., Sierra, S. & Devi, L.A. Detection of Receptor Heteromerization Using In Situ Proximity Ligation Assay. *Curr Protoc Pharmacol* **75**, 2.16.11-12.16.31 (2016).
50. Bray, M.A., Carpenter, A., Imaging Platform, B.I.o.M.I.T. & Harvard in Assay Guidance Manual. (eds. G.S. Sittampalam et al.) (Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD); 2004).

## Figure Legends

**Figure 1.** *BIN1* overexpression worsens hTau phenotypes in short-term memory. Discrimination indices for novel object recognition with one hour of retention at 3 months (**A**), 6 months (**B**), 9 months (**C**), 12 months (**D**), and 15 months (**E**) are shown for control, hTau, and hTau;Tg*BIN1* mice. Dashed lines represent object preference by chance. Blue dots, males; pink dots, females. One-sample *t*-test compared to chance at 50%; \**p*<0.05, \*\**p*<0.01.

**Figure 2.** *BIN1* rescues long-term memory deficit due to MAPT overexpression in hTau males. Spatial and long-term memory in 12- and 15-month-old hTau and hTau;Tg*BIN1* mice assessed with Morris water maze. **A.** Distance traveled to reach the platform at 12 months. Data represent mean  $\pm$  SEM for consecutive days of acquisition (control, *n*=11; hTau, *n*=11; hTau;Tg*BIN1*, *n*=13). **B.** Probe test without platform at 12 months, performed 24 h after the last training session. Dashed line represents chance. Data represent mean  $\pm$  SEM for each quadrant (control, *n*=11; hTau, *n*=11; hTau;Tg*BIN1*, *n*=13). Underlined quadrant marks original platform location. **C.** Distance traveled to reach the platform at 15 months. Data represent mean  $\pm$  SEM for consecutive days of acquisition (control, *n*=11; hTau, *n*=10; hTau;Tg*BIN1*, *n*=13). **D.** Probe test without platform at 15 months, performed 24 h after the last training session. Dashed line represents chance. Data represent mean  $\pm$  SEM for each quadrant (control, *n*=11; hTau, *n*=10; hTau;Tg*BIN1*, *n*=13). Underlined quadrant marks original platform location. One-sample *t*-test compared to chance at 25%; \**p*<0.05, \*\**p*<0.01.

**Figure 3.** *BIN1* overexpression prevents Tau inclusions and increases *BIN1*-Tau interaction in hTau hippocampi. **A.** Immunohistofluorescence of different phospho-Tau proteins in hippocampi of control, hTau and hTau;Tg*BIN1* males at 18 months. Antibodies used were detecting p-Ser202/p-Thr205 Tau (AT8) or p-Thr231 Tau (AT180). Insets show zooms of the hilus areas encompassing the neuronal cell bodies; intracellular inclusions are visible for hTau, but barely for hTau;Tg*BIN1*. Scale bars = 500  $\mu$ m; insets, 50  $\mu$ m. **B-C.** Quantification of the number of cells with intracellular Tau inclusions per mm<sup>2</sup> in control, hTau and hTau;Tg*BIN1* mice labeled with the two phospho-Tau antibodies (control, *n*=4; hTau, *n*=4; hTau;Tg*BIN1*, *n*=5). **D.** *BIN1*-Tau

PLA (cyan), and BIN1 (yellow), Tau (magenta), and Hoechst (white) stainings in the hippocampi of the same mice. Zoomed areas show PLA and Tau channels only. See [Fig. S18](#) for Tubulin-Tau PLA, conducted as technical control. **E-F.** Quantification of BIN1-Tau PLA density. Data expressed as PLA spot number per tissue area (E) or total PLA spot volume per tissue area (F), normalized with control mean (control, n=9; hTau, n=11; hTau;Tg*BIN1*, n=12 hemispheres for spot number; control, n=10; hTau, n=12; hTau;Tg*BIN1*, n=12 hemispheres for volume). Red bars and black squares indicate sample median and mean, respectively. Kruskal-Wallis ANOVA, followed by multiple comparisons test with Tukey-Kramer correction; \*\*\*  $p < 0.0001$ ; \*  $p < 0.05$ . N/S, not significant. Scale bars = 500  $\mu\text{m}$ ; zooms, 50  $\mu\text{m}$ .

**Figure 4.** Characterization of BIN1-Tau interaction in primary neuron cultures (PNC). **A.** Representative immunoblots from neuronal extracts obtained at DIV7, DIV14, and DIV21 (in duplicate) showing BIN1 and total and phosphorylated forms of Tau (Tau1 for non-phospho Ser195/Ser198/Ser199/Ser202; PHF1 for p-Ser396/Ser404; RZ3 and AT180 for p-Thr231). **B-C.** Relative changes in BIN1 and Tau protein levels and in Tau phosphorylation during neuronal maturation. **D.** Representative images of PNC showing PLA spots and Tau immunolabeling during neuronal maturation. **E.** Correlation between total PLA volume and total Tau volume obtained from a representative experiment. Each dot represents a confocal image. **F.** Change in PLA density during neuronal maturation. N = 2 independent experiments. **G.** Representative images of PNC under- and overexpressing BIN1, showing PLA and Tau and BIN1 immunolabeling. shNT: non-targeting shRNA. **H-I.** Total BIN1 volume and PLA density in PNC under- and overexpressing BIN1, normalized with respective controls (shBIN1 with shNT and BIN1iso1 with Mock). N = 3 independent experiments. In box plots, red bars and black squares indicate sample median and mean, respectively. Wilcoxon rank-sum test; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; N/S: not significant.

**Figure 5.** High-content screening (HCS) identifies regulators of BIN1-Tau interaction. **A.** HCS workflow consists of compound screen (DIV21; 10  $\mu\text{M}$ ; 2.5 h) in PNC cultured in 384-well plates, plate-by-plate image segmentation and analysis, hit selection, and hit validation *via* dose-response experiments. **B.** Exemplary images from the HCS

showing U0126 and Cyclosporin A (CsA) that decreased and increased PLA density, respectively. Scale bars = 50  $\mu$ m. **C.** PLA:Tau area ratio for 1,047 compounds that did not induce damage in the neuronal network. Mean  $\pm$  SD from 3 independent screens. **D.** Top and bottom 5% modulators (72 compounds) were retained for dose-response experiments. 12 compounds were validated in dose-response experiments are shown in red. **E.** Dose-response curves of U0126 and CsA (see Fig. S10 for all validated compounds). Mean  $\pm$  SD from 3 independent experiments.

**Figure 6.** BIN1 phosphorylation at T348 regulates BIN1-Tau interaction by modulating open/closed conformation of BIN1. **A.** Alignment of amphi1 and BIN1iso1. The underlined sequence indicates the BIN1 PRD sequence interacting with the BIN1 SH3 domain. **B.** Lambda protein phosphatase ( $\lambda$ -PP) treatment dephosphorylates BIN1; 2 lanes per condition. **C.** In vitro phosphorylation assays with recombinant proteins show that Cdk2 and Cdk5 phosphorylate BIN1 at T348. Also see Fig. S12. **D-E.** Immunoblots and quantification showing the effects of U0126 and CsA (10  $\mu$ M; 2.5 h) on BIN1 and Tau phosphorylation. Inset shows the effect of 10 nM CsA on BIN1 phosphorylation. Mean  $\pm$  SD from 3 independent experiments. One-way ANOVA and paired t-test; \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ . **F.** Behavior of BIN-SH3 domain in the whole BIN1 isoform 1 protein as a function of phosphorylation by Cdk2 or of a mutation at threonine (T) 348 to glutamate (E) as monitored by  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of BIN1iso1 CLAP T348E protein (in blue), Cdk2-phospho-BIN1iso1 (superimposed in red), and BIN1iso1 protein (superimposed in green). Also see Fig. S13. **G.** Titration of BIN1-SH3 domain with concentration of CLAP (334-359) or phospho-T348 CLAP (334-359) peptides. Normalized saturation curves (shown for residue 559), built from the gradual chemical shift changes (normalized; 1 denotes the largest change), are shown as pink stars for CLAP (334-359) and red stars for phospho-CLAP (334-359). Saturation curves are in cyan and green for CLAP (334-359) and phospho-CLAP (334-359), respectively. Also see Fig. S14. **H.** Representative images of PNC overexpressing BIN1iso1 and the BIN1iso1 T348E, its systematically open form, showing PLA signals and Tau and BIN1 immunolabeling. **I.** PLA density in PNC overexpressing BIN1iso1 and BIN1iso1 T348E (normalized with BIN1iso1).  $N = 3$  independent experiments. Red bars and black squares indicate sample median and mean, respectively. Wilcoxon rank-sum test; \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 7.** BIN1 amount and phosphorylation status in post-mortem AD brains. **A.** Western blots showing total BIN1 (99D antibody), BIN1 phosphorylated at T348 (p-T348), and  $\beta$ -actin in the temporal lobes of 14 individuals with increasing neurofibrillary pathology (Braak stage; see [Table S3](#) for demographic details and pathological statuses). **B-D.** Quantification of the BIN1: $\beta$ -actin, BIN1-p-T348: $\beta$ -actin, and BIN1-p-T348:BIN1 signals, normalized with the mean of the control group (Braak stage = 0). Dashed red lines indicate exponential fits;  $p$ -values refer to the Kolmogorov-Smirnov test for the normal distribution of residuals. Data marked in green indicate non-AD cases according to neuropathological diagnosis. **E-G.** Comparison of BIN1: $\beta$ -actin, BIN1-p-T348: $\beta$ -actin, and BIN1-p-T348:BIN1 signals between non-AD and AD cases. Red bars and black squares indicate sample median and mean, respectively;  $p$ -values refer to the Wilcoxon rank-sum test.

**Figure 8.** Complexity and dynamics of the BIN1-Tau interaction in neurons. **A.** At the molecular level, the open/closed conformation of BIN1 regulates the Tau-BIN1 interaction in neurons under the control of the BIN1 T348 phosphorylation. In addition, phosphorylation status of Tau at T231 decreases the BIN1-Tau interaction. **B.** In healthy neurons, the BIN1-Tau interaction occurs at physiological levels. **C.** In AD pathology, a decrease in BIN1iso1 leads to a decrease in BIN1-Tau interaction, potentially favoring the formation of neurofibrillary tangles (despite of compensatory mechanisms through BIN1 T348 phosphorylation). **D.** In tauopathy, overexpressing BIN1iso1 in neurons (as in the case for hTau;Tg*BIN1* mice), Tau somatic inclusion disappear, which is correlated with an increase in the BIN1-Tau interaction.

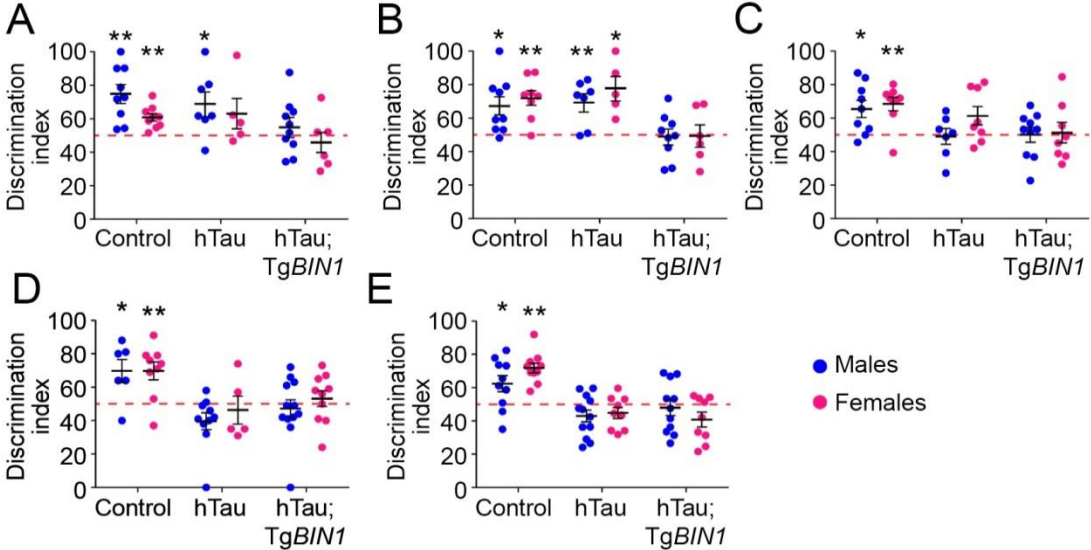
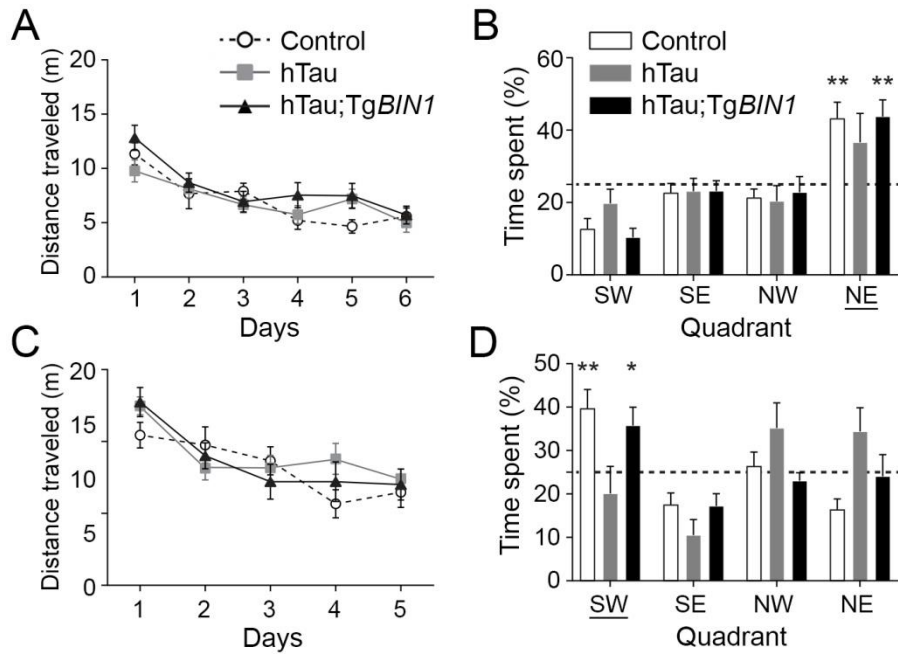


Figure 1.



**Figure 2.**

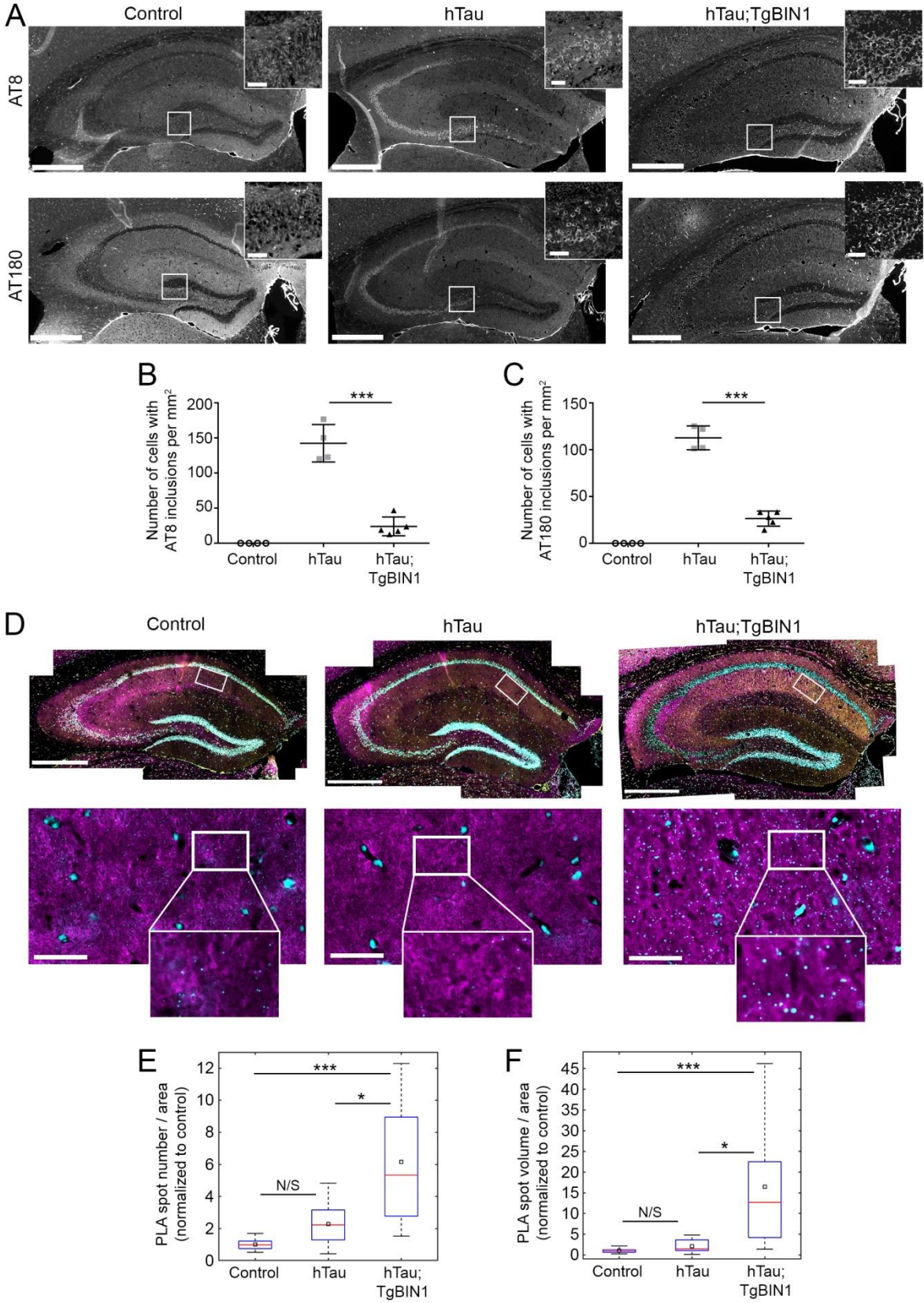


Figure 3.

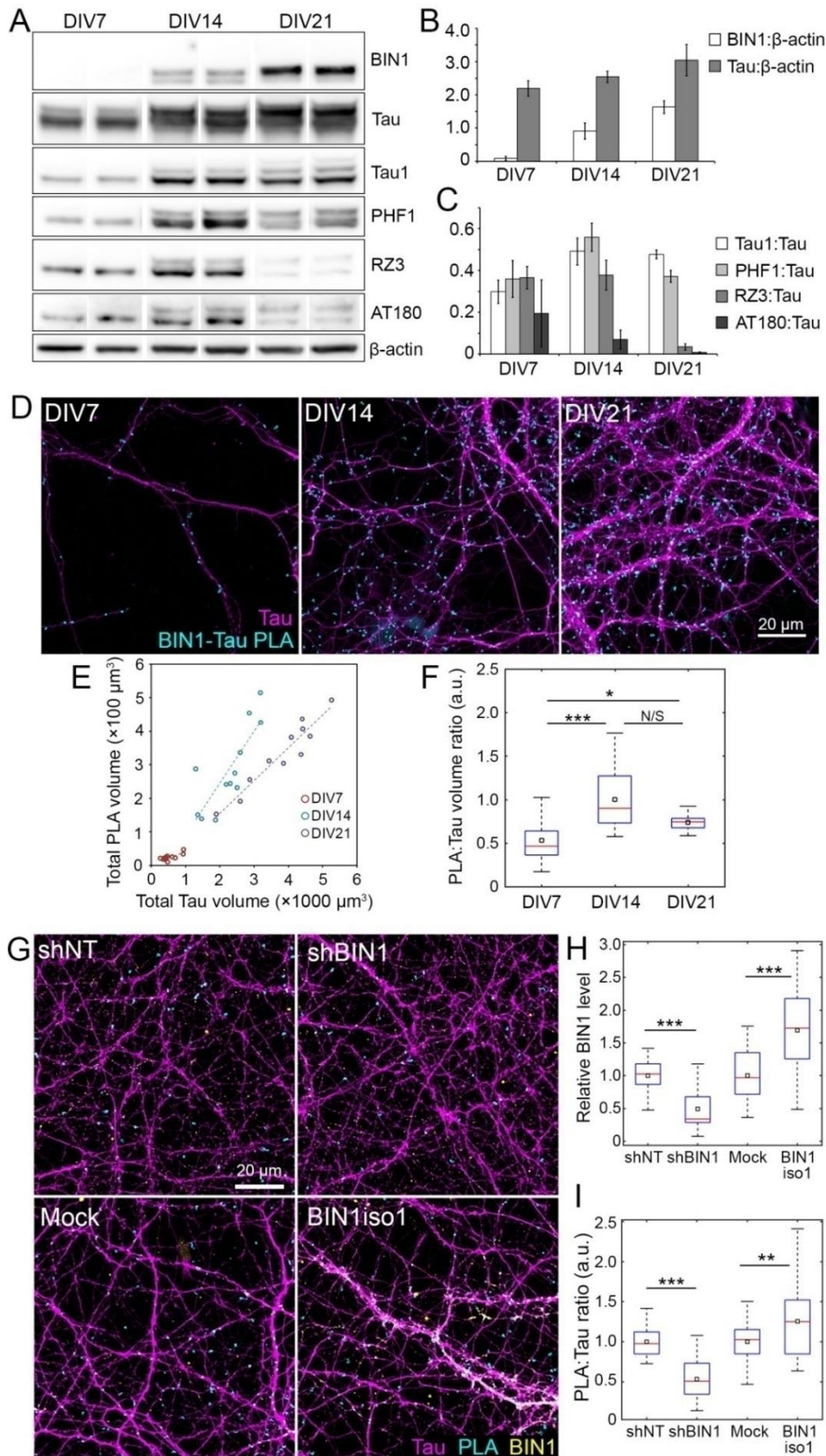


Figure 4.

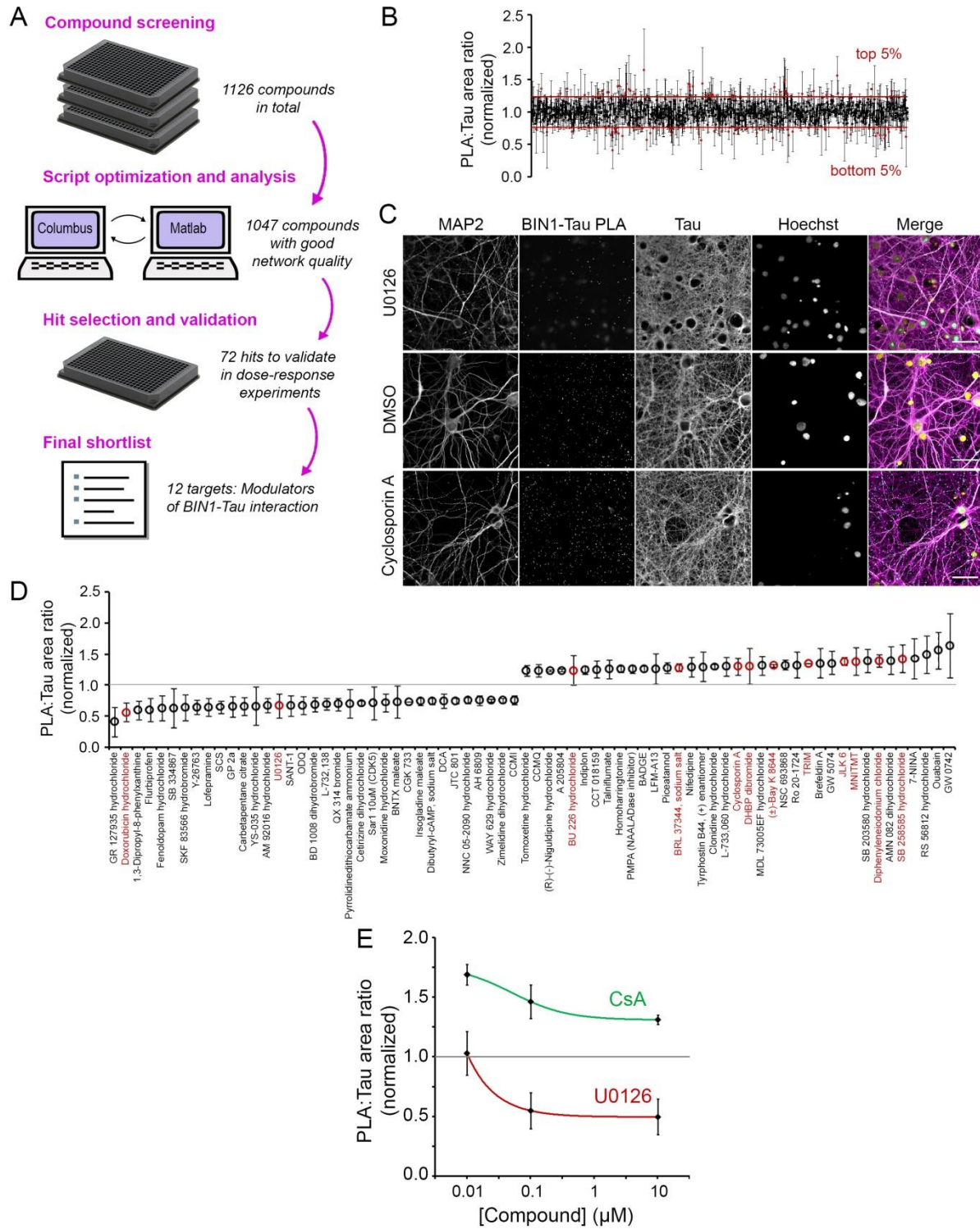


Figure 5.

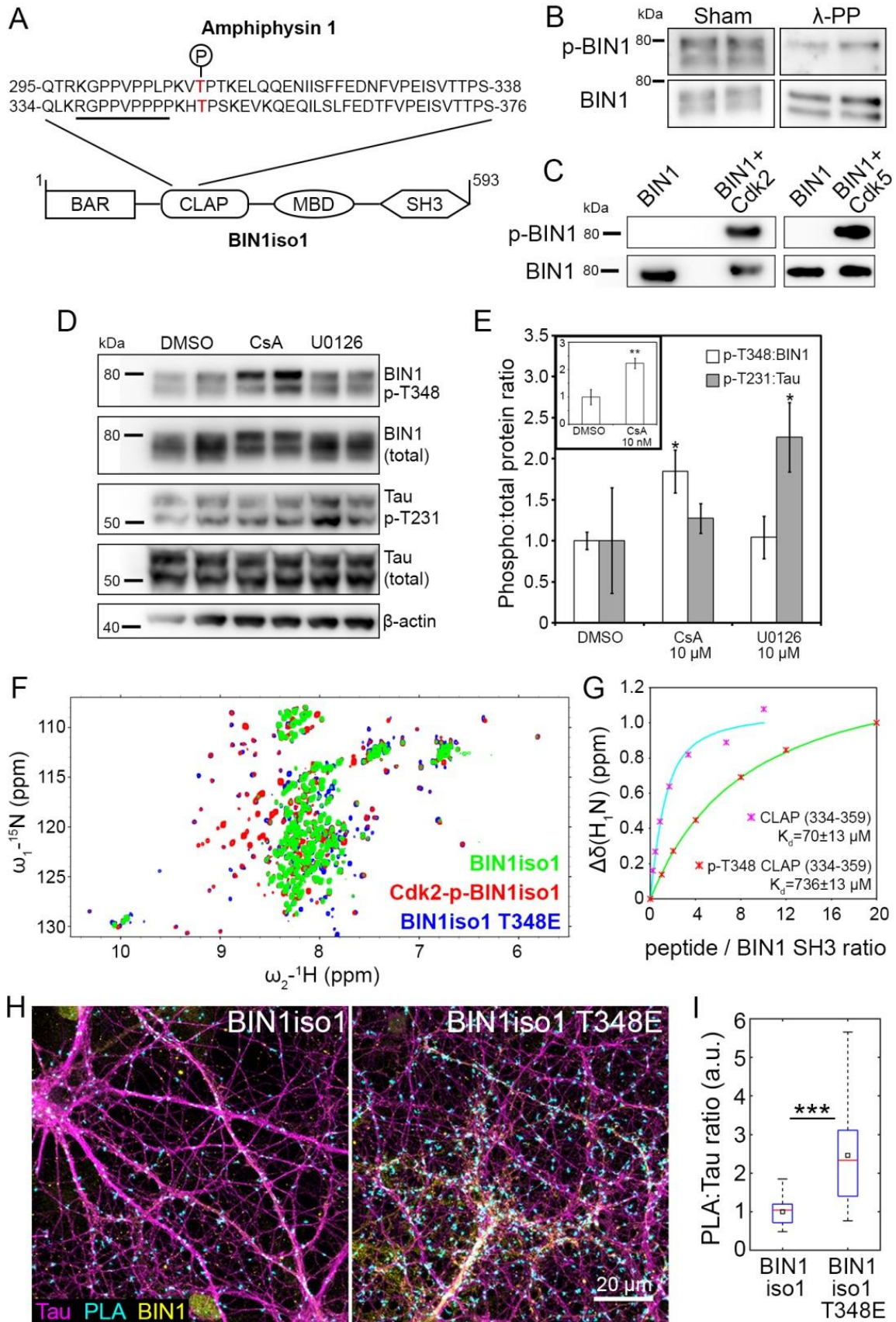


Figure 6.

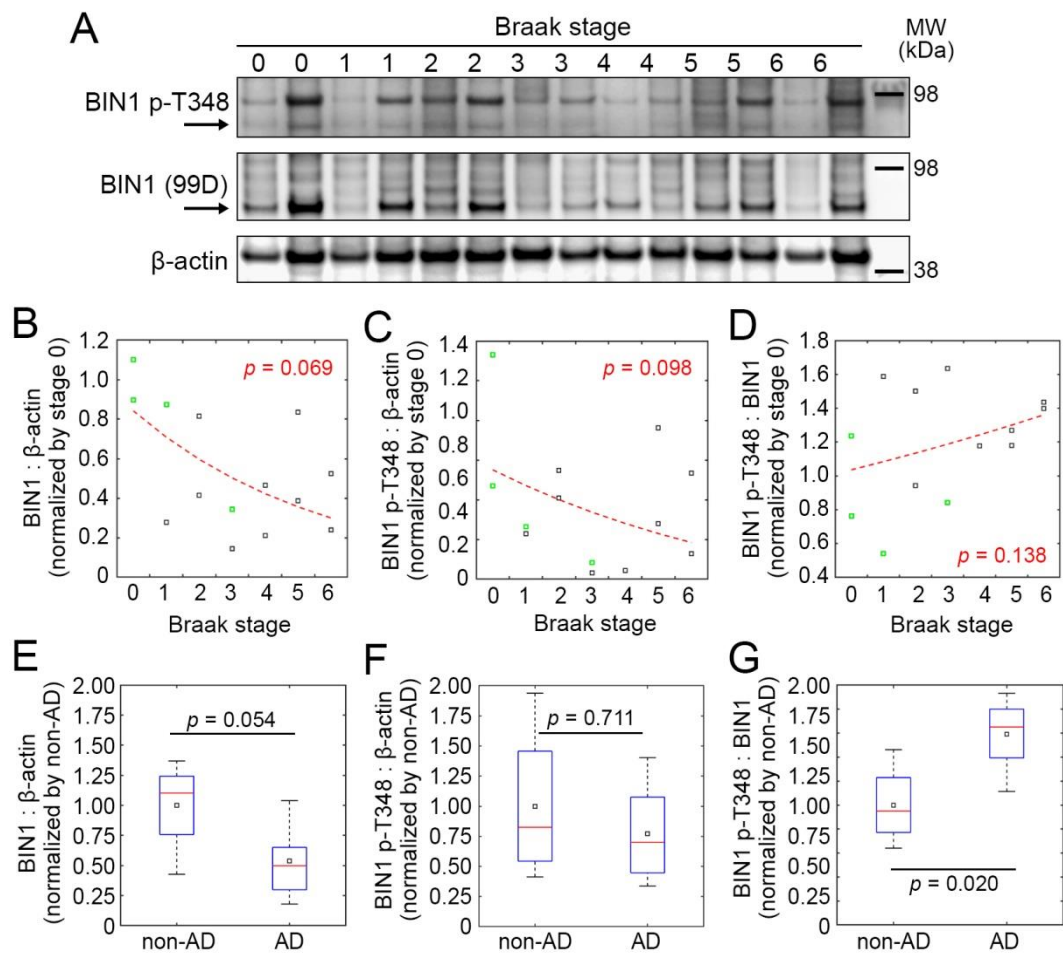


Figure 7.



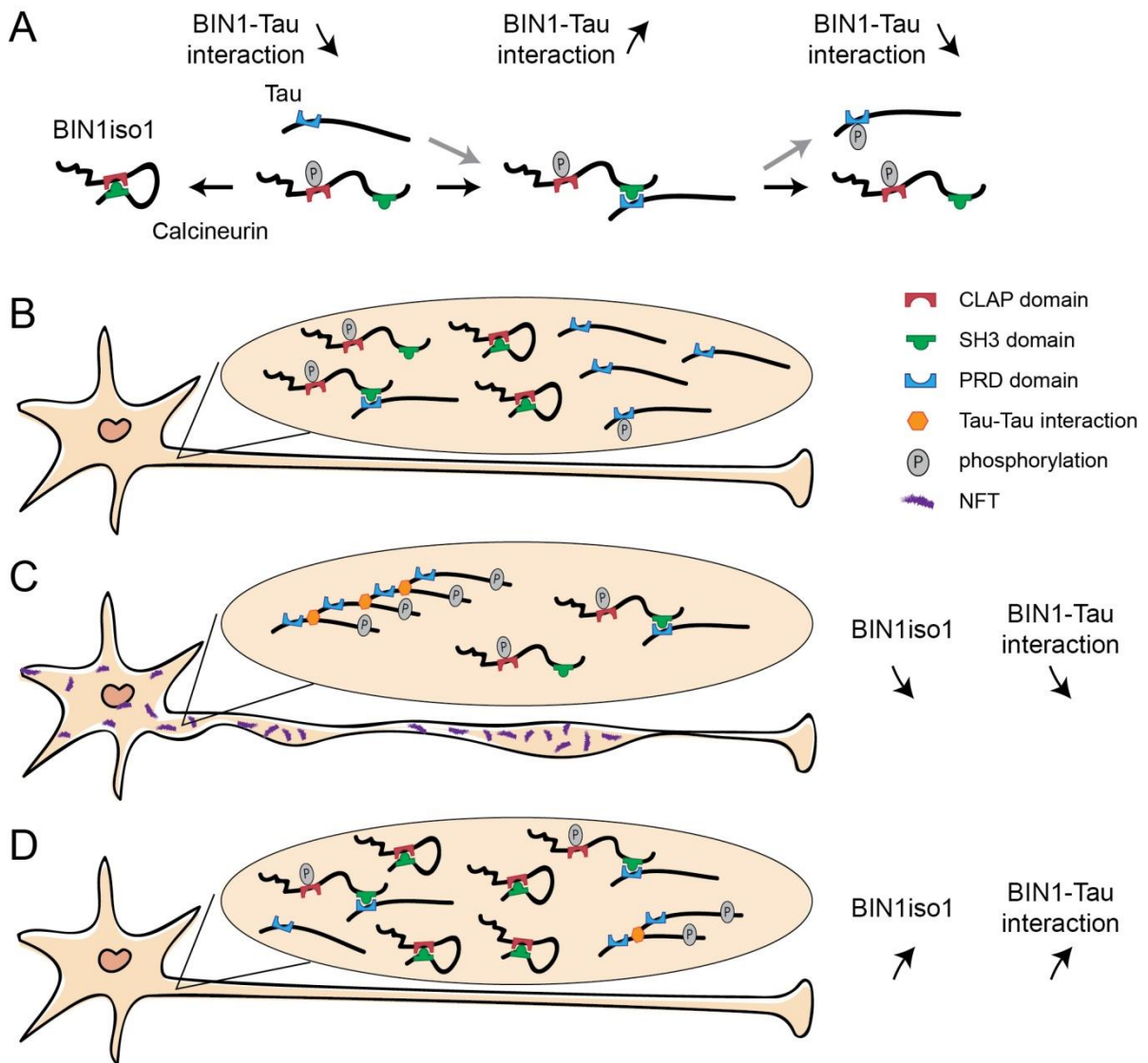


Figure 8.

## Supplementary Materials and Methods

### HCS image segmentation in Columbus

HCS was performed in the IN Cell platform. IN Cell image registration and transfer files (.xdce files) were manually edited to import images to Columbus only from control wells, thereby generating the so-called “control plates” for script optimization and plate validation. HCS image analysis was performed using Columbus software (Fig. S18). In order to improve the detection of Tau and MAP2 areas, somatic regions were excluded from the Tau (Cy5 channel) and MAP2 (FITC channel) images by removing the Hoechst signal (DAPI channel), using the formula  $A \times (if(B_{median} + 0.1 \times B_{stddev}), 1, 0)$ , where  $A$  is the Cy5 or the FITC channel and  $B$  is the DAPI channel. Tau and MAP2 areas were calculated after thresholding using the formula  $(if(A > (A_{mean} - q_1 \times A_{stddev}), 1, 0))$ , where  $A$  is the somata-excluded Cy5 or FITC channels and  $q_1$  is area threshold coefficient in terms of SD. For the FITC channel (MAP2), the parameter  $q_1$  had a constant value of 0.1. For the Cy5 channel (Tau),  $q_1$  was one of the optimization parameters determined through an iterative process, *i.e.*, script optimization. PLA spots (dsRed channel) in the thresholded Tau area using the *Find Spots* and *Select Population* building blocks of Columbus following *Method D*. Here, the *Splitting Coefficient* was kept constant at 0.9, *Spot Area* was restrained between 15 and 60 px<sup>2</sup>, and the upper threshold of *Spot Contrast* was kept constant at 0.9. In addition, three parameters of this building block were determined through script optimization:  $q_2$ , threshold of *Detection Sensitivity*;  $q_3$ , threshold of *Background Correction*; and  $q_4$ , lower threshold of *Spot Contrast*.

### Iterative process to determine optimum parameters for image segmentation script

Each control plate was used to optimize the image segmentation parameters to be used to analyze the corresponding full plate. Multiple Columbus analysis scripts were created by assigning distinct values combinatorially to each of the optimization parameter ( $q_1$ - $q_4$ ). For example, assigning three distinct values per parameter results in  $3^4 = 81$  combinations; hence the optimization was performed by running Columbus in the *Batch Analysis* mode, using 81 analysis scripts. This resulted in 81 result files per control plate, which were then analyzed in MATLAB. Data obtained for each well of the control plate were corrected for spatial bias (horizontal), using the slope of the

line that fits the column averages based on the least-squares method. For each control plate, three values typically used in HCS analysis (Bray and Carpenter, 2013) were

calculated: (i) strictly standardized mean difference,  $\beta$  factor,  $\beta = (\mu_n - \mu_p) / \sqrt{\sigma_n^2 + \sigma_p^2}$ ;

(ii) Z prime factor  $Z' = 1 - 3(\sigma_p + \sigma_n) / |\mu_p - \mu_n|$ ; and (iii) signal-to-background ratio (S/B

$= \mu_p / \mu_n$ ), where  $\mu$  and  $\sigma$  are mean and standard deviation, and  $p$  and  $n$  indicate positive and negative controls (PLA conducted without the BIN1 primary antibody or without the Mouse-minus probe). The optimal parameter set for analysis script was determined to be the one with the highest  $\beta$  factor ( $\beta \geq 2$ ), provided that it produced S/B of at least 10. Additional rounds of parameter optimization were performed when necessary.

### Full plate analysis and identification of hits

Full plates were analyzed in Columbus with the corresponding optimal analysis script. For each well, Tau area, MAP2 area, and PLA spot area within Tau area were corrected for local bias by normalizing the raw values by the ratio of the local median (median of the surrounding wells in the 5x5 neighborhood) to the plate median

(excluding edge wells), *i.e.*, 
$$\text{corrected value} = \text{raw value} / \left( \frac{\text{local median}}{\text{plate median}} \right)$$

For each plate, compounds affecting network quality, defined as not having Tau area or Tau:MAP2 area ratio within median  $\pm 3$  median absolute deviations (MAD), were excluded (Fig. S19). Edge wells were not taken into account when calculating median and MAD. Corrected PLA:Tau area ratio for each well was then normalized by the mean of non-excluded wells. Finally, normalized, corrected PLA:Tau area ratio obtained from 3 screens were pooled to calculate mean and SEM for each compound that were not excluded from at least 2 screenings. Compounds potentially affecting BIN1-Tau interaction were determined as those belonging to the top or bottom 5% tiers.

### Validation of selected compounds

Hit validation was performed by generating dose-response curves for selected compounds to identify specific effects on BIN1-Tau interaction. Since several of the selected compounds had multiple protein targets at 10  $\mu$ M concentration (as used in the HCS) dose-response experiments were designed to determine if the effects were

specific and/or to identify relevant targets. Dose-response experiments were performed for 72 compounds from the top and bottom 5%, which gave similar results in all 3 screens. Compounds were diluted four log scales to obtain a dose-response curve (10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M) and each compound and concentration was tested in three separate plates under identical conditions as in HCS. Script optimization, plate validation, plate analysis, and well correction and exclusion steps were executed as described above. The DMSO-normalized mean of each compound at 10  $\mu$ M was compared with the screen result (also at 10  $\mu$ M), and compounds that had similar effects in both sets of experiments were retained for further analysis. For each compound, dose-response curves were fit with 4-parameter or 3-parameter (where Hill slope is 1) nonlinear regression models, based on the extra sum-of-squares F test using GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA).

#### **K<sub>d</sub> determination using NMR data**

The <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N combined chemical shift changes,  $\Delta\delta(^1\text{H},^{15}\text{N})$ , were calculated using the following equation:  $\Delta\delta(\text{H},\text{N}) = (\Delta\delta^2_{\text{H}} + \Delta\delta^2_{\text{N}} \times 0.159)^{1/2}$ , where  $\Delta\delta_{\text{H}}$  and  $\Delta\delta_{\text{N}}$  are the chemical shift ( $\delta$ ) changes for <sup>1</sup>H and <sup>15</sup>N, respectively. Dissociation constants were obtained by fitting the chemical shift perturbation data to the following equation:  $\delta_{\text{obs}} = \Delta\delta_{\text{max}} (a + b + K_d - ((a + b + K_d)^2 - 4ab)^{1/2}) / 2a$ , where  $\Delta\delta_{\text{obs}}$  is the weighted average of the chemical shifts in the free and bound states and  $\Delta\delta_{\text{max}}$  is the maximal signal change upon saturation (bound state).  $K_d$  is the dissociation constant,  $a$  and  $b$  are the total peptide and BIN1 SH3 concentrations, respectively.  $K_d$  was calculated based on chemical shift perturbations of each resonance with  $\Delta\delta(\text{H},\text{N}) > 0.01$  ppm when comparing the bound and free states, and averaged.

## Supplementary Results

### Myelin alterations in the fornix

Of note, the degree of fornix alteration is also well correlated with memory impairments. Coronal visualization of the fornix at 18 months in hTau and hTau;Tg*BIN1* mice was performed using electron microscopy. *MAPT* overexpression is associated with myelin abnormalities. Indeed, most nerve fibers in the hTau mice presented multiple myelin rings (Fig. S15, arrowheads); however, a significant rescue of this phenotype was observed in hTau;Tg*BIN1* mice. The overexpression of BIN1 alone did not induce any myelin abnormalities (Fig. S16). Thus, the memory impairments observed in the behavioral analyses of the hTau mice may be also associated with myelin disorganization in the fornix, and were rescued upon BIN1 overexpression. Finally, as spatial memory was perturbed in hTau mice, ultrastructural analysis of proximal axons projecting from the CA3 was also conducted *via* electron microscopy. No obvious ultrastructural defects were observed and, notably, the microtubule network appeared well aligned and distributed inside the nerve fibers in hTau, Tg*BIN1*, and hTau;Tg*BIN1* mice (Fig. S20).

## Supplementary Tables

Table S1. Primer sequences

<b>Primer</b>	<b>5' → 3'</b>
Mapt KI WT UP	CTCAGCATCCCACCTGTAAC
Mapt KI WT DW	CCAGTTGTGTATGTCCACCC
Mapt KI Tg UP	AAGTTCATCTGCACCACCG
Mapt KI Tg DW	TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG
TgMAPT (mut) UP	ACTTTGAACAGGATGGCTGAGCCC
TgMAPT (mut) DW	CTGTGCATGGCTGTCCACTAACCTT
TgMAPT (WT) UP	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
TgMAPT (WT) DW	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC
TgBIN1 UP	CGAGGCCTGCGCCGCGATGGC
TgBIN1 DW	CGCAGCCTGGGGACCTCGAAG
rs59335482 UP	CCAGGCTCAAGCAATCCTCCTA
rs59335482 DW	ATTTGTGTTCAAGGCAGCAGGGAGG
rs744373 UP	CTGAGGGATCTCACCTTTGACCTGA
rs744373 DW	AGTCCATCTTCTTCTGCTCTCCCAGCAC
rs7561528 UP	CACTTACCCCAAATGTGGAAGT
rs7561528 DW	GAGCTATCAGCATAAGAAGTGTATGC

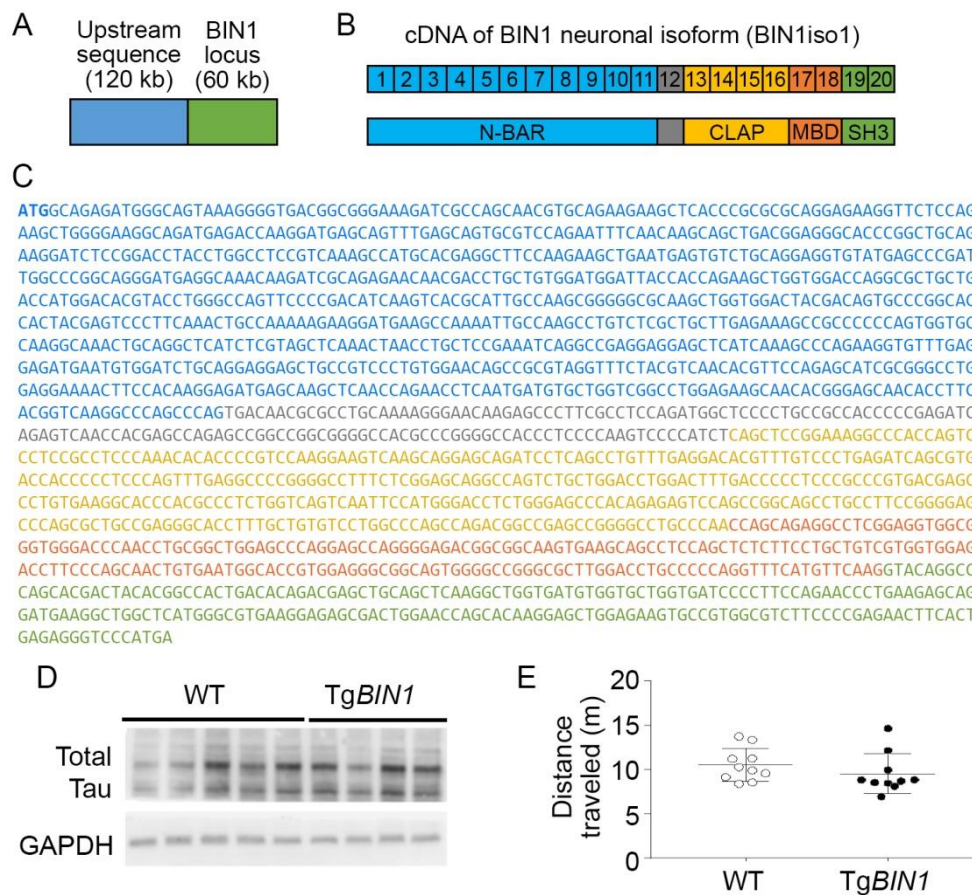
Table S2. Antibodies used in brain slices

<b>Antibody</b>	<b>Reference</b>
Tau [E178]	Abcam, ab32057
BIN1 [C99D]	Sigma, B9428
Phospho Tau Thr231 [AT180]	Thermo Scientific, MN1040
Phospho Tau Ser202 [AT8]	Thermo Scientific, MN1020

**Table S3.** Demographic details of the neuropathological cohort.

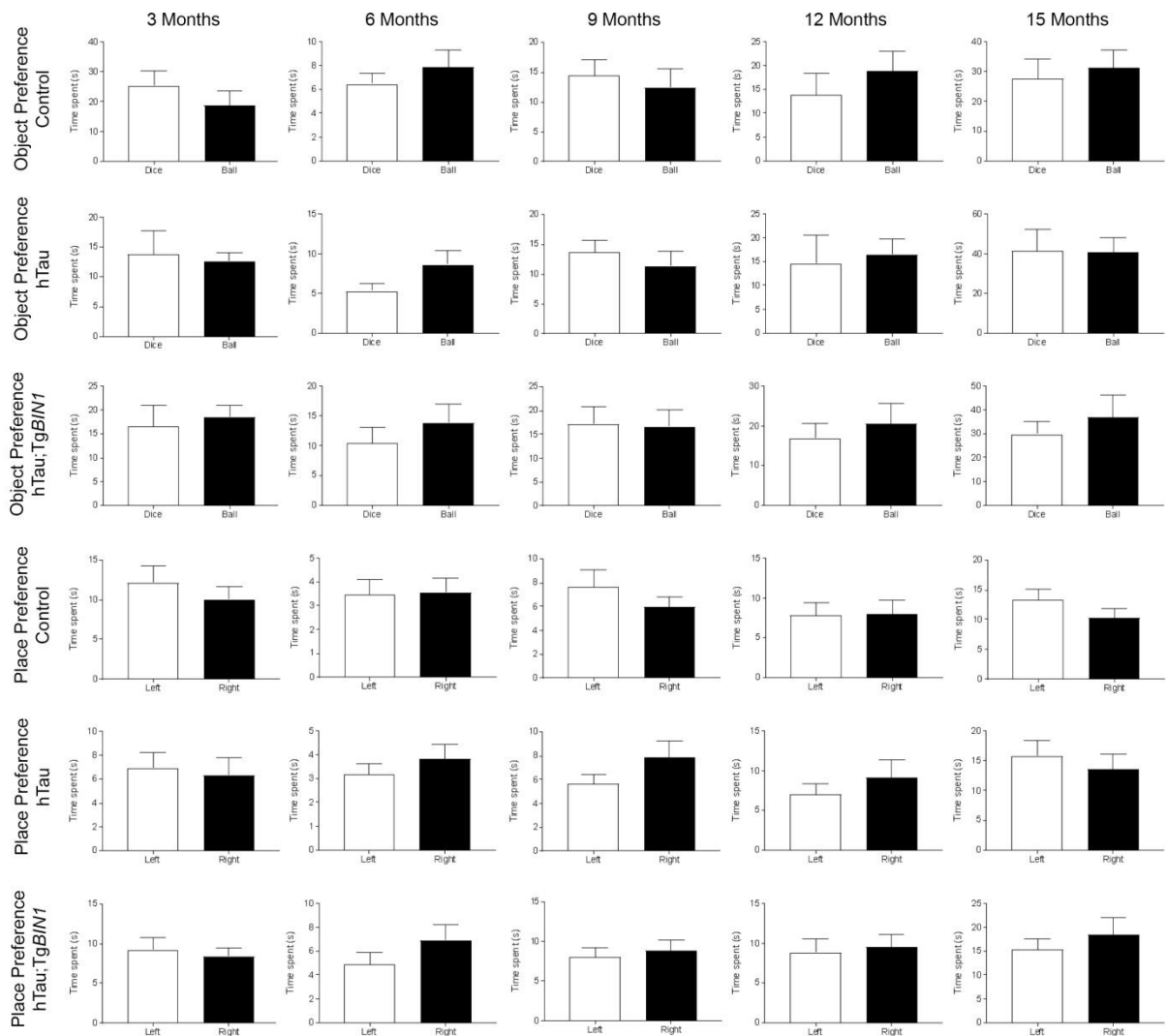
<i>Individual</i>	<i>Braak stage</i>	<i>Gender</i>	<i>Age at death</i>	<i>Post-mortem delay (h)</i>	<i>Brain weight (g)</i>	<i>Neuropathological diagnosis</i>
1	0	M	61	7	900	Non-AD
2	0	F	52	8	1190	Non-AD
3	1	F	82	7	950	AD
4	1	M	84	7	1130	Non-AD
5	2	F	84	5	1100	AD
6	2	F	82	4	1110	AD
7	3	F	76	4	990	AD
8	3	F	92	18	1060	Non-AD
9	4	F	76	24	1165	AD
10	4	F	85	4	1070	AD
11	5	F	85	4	800	AD
12	5	M	80	5	1000	AD
13	6	F	78	5	995	AD
14	6	F	85	4	1035	AD

## Supplementary Figures:

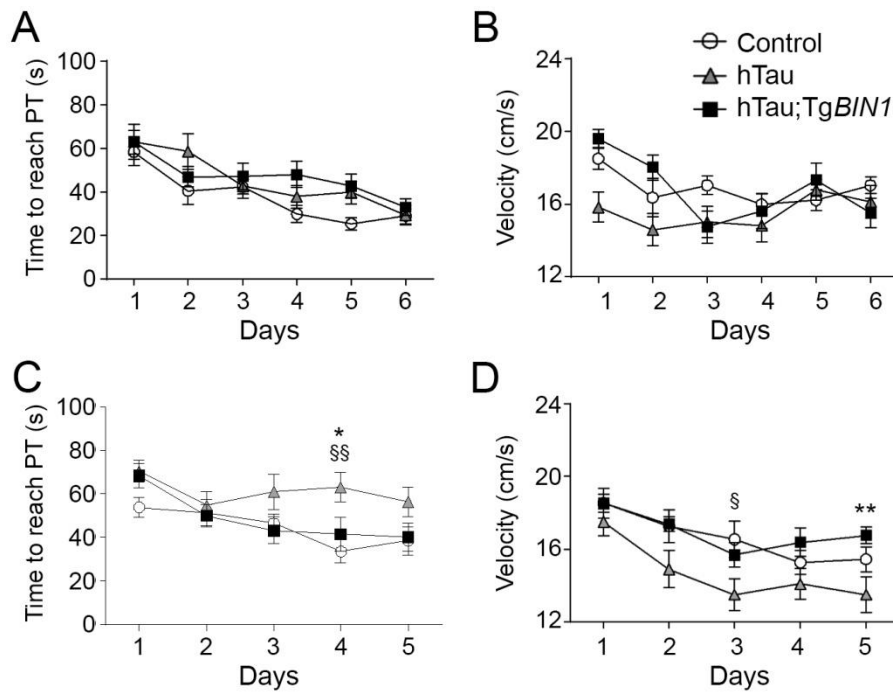


**Figure S1** MAPT and BIN1 expression in the *TgBIN1* mouse. **A.** Drawing of the BAC RP11-437K23 encompassing the *BIN1* locus and upstream sequences. **B.** RNA was extracted from hippocampus of *TgBIN1* mice, reverse-transcribed, cloned and sequenced. Human exons present in hippocampus and corresponding protein domains are displayed with corresponding colors. BAR, BIN-Amphiphysin-Rvs; CLAP, Clathrin and AP2 binding domain; MBD, Myc binding domain; SH3, Src homology domain. **C.** Isoform 1 was the main human BIN1 isoform detected, whose sequence is shown. **D.** Western blot of total Tau in the brains of WT and *TgBIN1* mice. **E.** Distance traveled by WT and *TgBIN1* mice in the open field test.

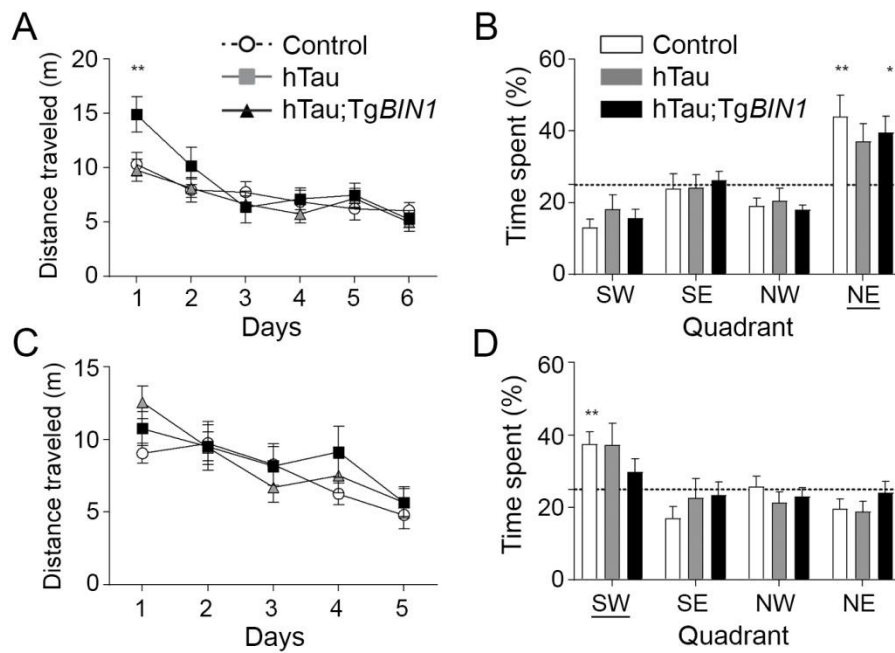




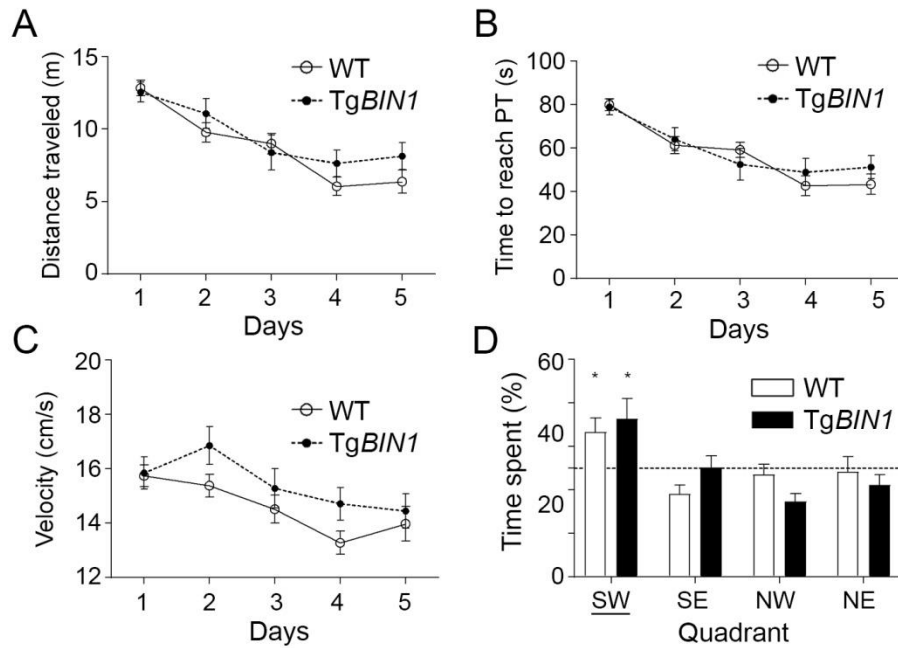
**Figure S2.** Validation of lack of object preference. Percentage of time spent by the 3-, 6-, 9-, 12-, or 15-month-old control, hTau and hTau;TgBIN1 mice with objects located in the right or left positions, during the acquisition phase.



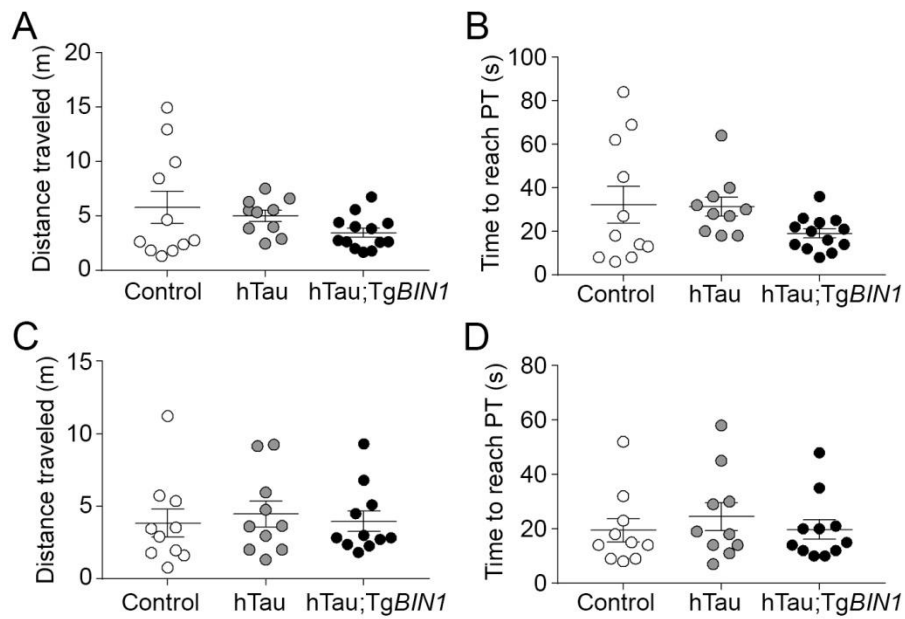
**Figure S3.** Spatial and long-term memory in 12- and 15-month-old *TgBIN1* males assessed with Morris water maze. **A.** Time to reach the platform (PT) at 12 months. **B.** Velocity during task acquisition. **C.** Time to reach the platform (PT) at 15 months. **D.** Velocity during task acquisition. Data represent mean  $\pm$  SEM for consecutive days of acquisition (control  $n=11$ ; hTau  $n=11$ ; hTau;*TgBIN1*  $n=13$ ). Two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test at each day of acquisition. §  $p < 0.05$ , §§  $p < 0.01$  for control vs hTau. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  for hTau vs hTau;*TgBIN1*.



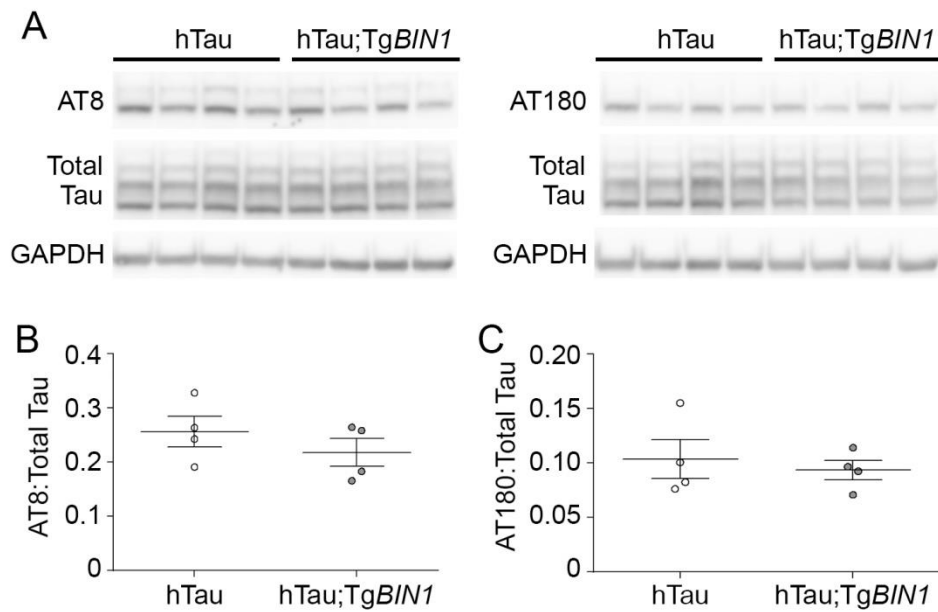
**Figure S4.** *BIN1* does not rescue long-term memory deficits due to *MAPT* overexpression in hTau females. Spatial and long-term memory in 12- and 15-month-old hTau and hTau;Tg*BIN1* mice assessed with Morris water maze. **A.** Distance traveled to reach the platform at 12 months. Data represent mean  $\pm$  SEM for consecutive days of acquisition (control, n=11; hTau, n=9; hTau;Tg*BIN1*, n=11). **B.** Probe test without platform at 12 months, performed 24 h after the last training session. Dashed line represents chance. Data represent mean  $\pm$  SEM for each quadrant (control, n=11; hTau, n=9; hTau;Tg*BIN1*, n=11). Underlined quadrant marks original platform location. **C.** Distance traveled to reach the platform at 15 months. Data represent mean  $\pm$  SEM for consecutive days of acquisition (control, n=11; hTau, n=9; hTau;Tg*BIN1*, n=11). **D.** Probe test without platform at 15 months, performed 24 h after the last training session. Dashed line represents chance. Data represent mean  $\pm$  SEM for each quadrant (control, n=11; hTau, n=9; hTau;Tg*BIN1*, n=11). Underlined quadrant marks original platform location. One sample t-test compared to chance at 25% for the time spent in quadrants, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Two-way ANOVA for the distance travelled, \*\* $p < 0.01$ .



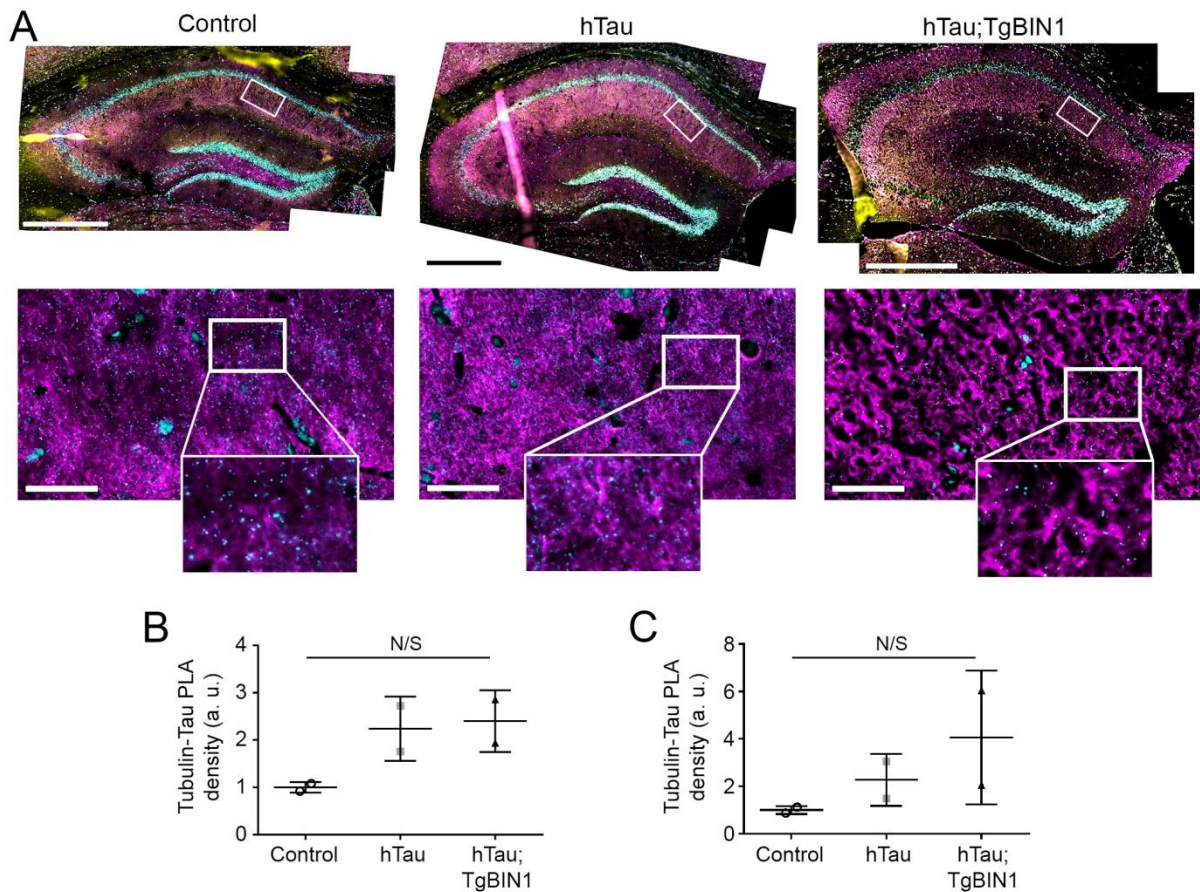
**Figure S5.** *BIN1* overexpression does not affect long-term memory. Spatial and long-term memory in 15-month-old *TgBIN1* males assessed with Morris water maze. **A.** Distance traveled to reach the platform. Data represent mean  $\pm$  SEM for consecutive days of acquisition (WT,  $n=15$ ; *TgBIN1*,  $n=13$ ). **B.** Time to reach the platform (PT). Data represent mean  $\pm$  SEM for consecutive days of acquisition (WT,  $n=15$ ; *TgBIN1*,  $n=13$ ). **C.** Velocity during task acquisition. Data represent mean  $\pm$  SEM for consecutive days of acquisition (WT,  $n=15$ ; *TgBIN1*,  $n=13$ ). **D.** Probe test without the platform, performed 24 h after the last training session. Dashed line represents chance. Data represent mean  $\pm$  SEM for each quadrant (WT,  $n=15$ ; *TgBIN1*,  $n=13$ ). Underlined quadrant marks original platform location. One sample t-test compared to chance at 25%; \*  $p < 0.05$ .



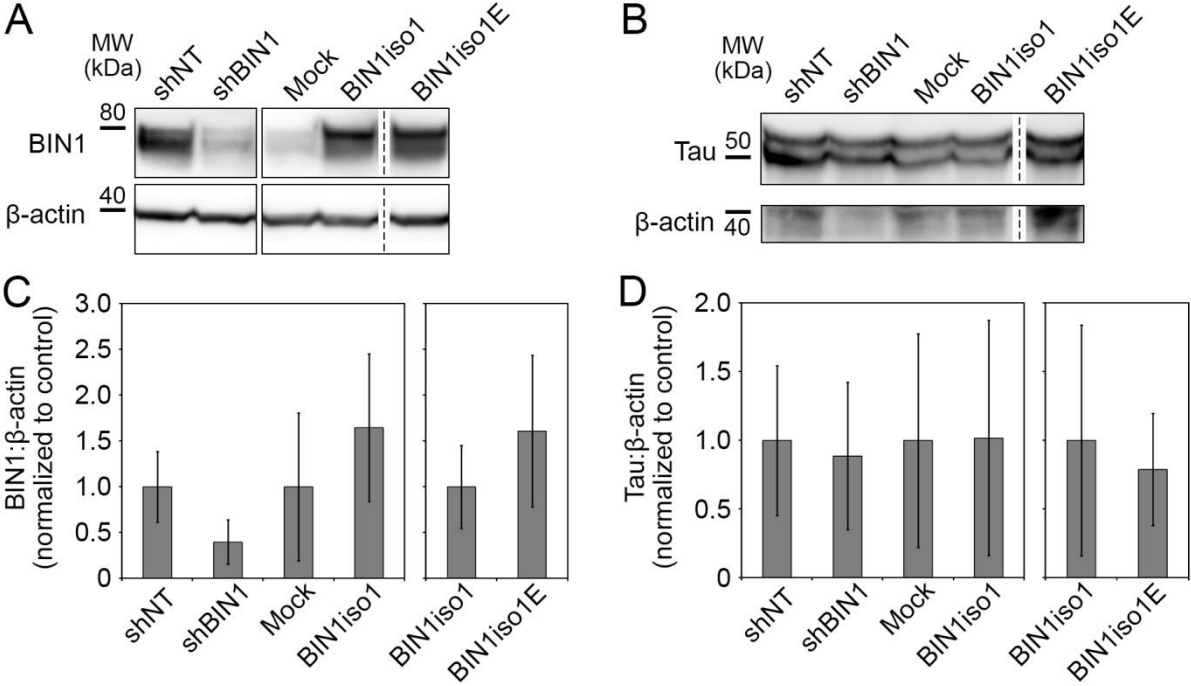
**Figure S6.** Absence of visual or motor deficits in 15-month-old males and females for the Morris water maze. **A.** Distance traveled to reach the visible platform (PT) for males (control, n=11; hTau, n=11; hTau;TgBIN1, n=13). **B.** Time to reach the visible platform for males (control, n=11; hTau, n=11; hTau;TgBIN1, n=13). **C.** Distance traveled for females to reach the visible platform (PT; control, n=10; hTau, n=10; hTau;TgBIN1, n=11). **D.** Time to reach the visible platform for females (control, n=10; hTau, n=10; hTau;TgBIN1, n=11). Data represent mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test.



**Figure S7.** BIN1 does not impact the levels of soluble phospho-Tau proteins. **A.** Western blots of hippocampal lysates from 18-month-old hTau and hTau;TgBIN1 male mice, labeled with antibodies detecting total Tau protein (total Tau), p-Ser202/p-Thr205 Tau (AT8) or p-Thr231 Tau (AT180), and GAPDH. Quantification of phospho-Tau over total Tau signal intensities for AT8 (**B**) and AT180 (**C**) antibodies.

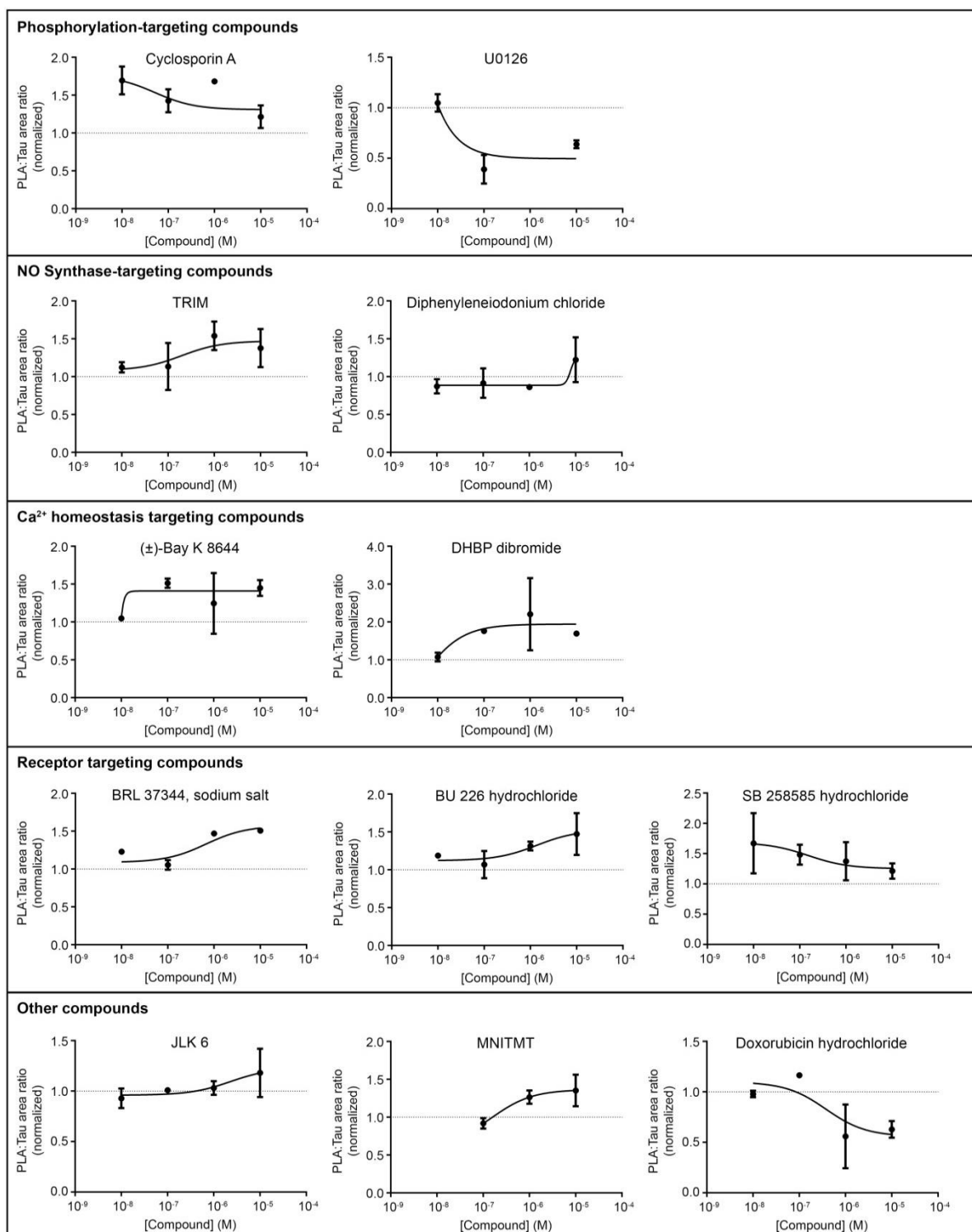


**Figure S8.** Tubulin-Tau PLA in brain slices. **A.** Tubulin-Tau PLA (cyan), and Tubulin (yellow), Tau (magenta), and Hoechst (white) stainings in the hippocampi of control, hTau and hTau;TgBIN1 males at 18 months. Zoomed areas show PLA and Tau channels only. Scale bars = 500  $\mu$ m; zooms, 50  $\mu$ m. **B-C.** Quantification of the Tubulin-Tau PLA density. Data expressed as PLA spot number per tissue area (B) or total PLA spot volume per tissue area (C), normalized with control mean (control, n=2; hTau, n=2; hTau;TgBIN1, n=2). N/S: Not significant according to Kruskal-Wallis ANOVA.



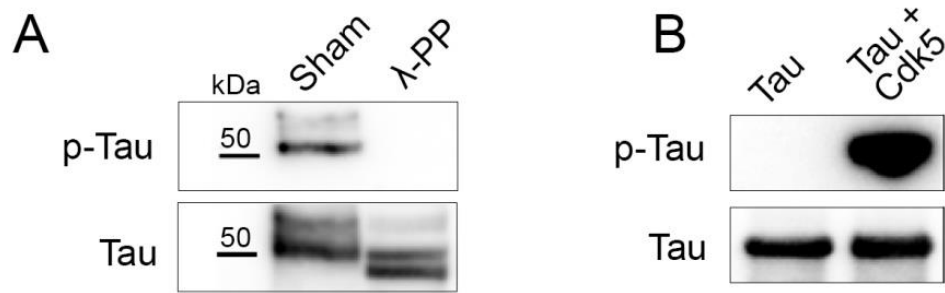
**Figure S9.** Western blots confirming under/over expression of BIN1.



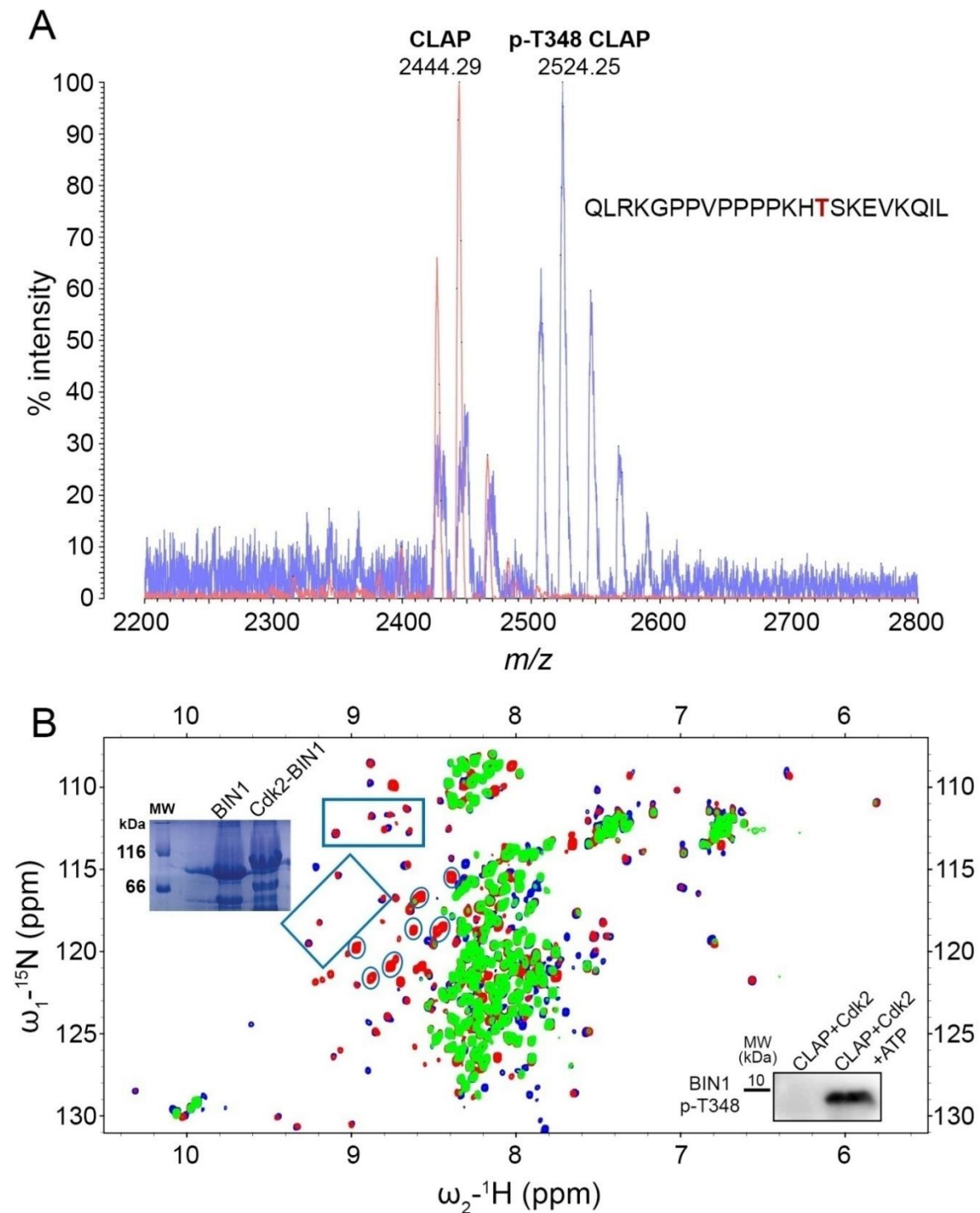


**Figure S10.** Dose-response curves for the 12 shortlisted compounds grouped according to their targets. See Fig 5 for details. Phosphorylation targeting compounds: Cyclosporin A, an inhibitor of Calcineurin (through forming a blocking complex with Cyclophilin); U0126, a potent MEK inhibitor. NO-synthase targeting compounds: TRIM, a potent inhibitor of neuronal and inducible NO-synthases; Diphenyleiodonium chloride, a GPR3 agonist that also inhibits NO-synthase and NADPH oxidase. Ca<sup>2+</sup>

homeostasis targeting compounds: (±)-Bay K 8644, a L-type Ca<sup>2+</sup> channel activator; DHBP dibromide, an inhibitor of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release. Receptor targeting compounds: BRL37344 sodium salt, a β<sub>3</sub> agonist; BU 226 hydrochloride, a potent and highly selective I<sub>2</sub> ligand; SB 258585 hydrochloride, a potent and selective 5-HT<sub>6</sub> antagonist. Other compounds: JLK6, an inhibitor of γ-secretase-mediated βAPP processing; MNITMT, a non-toxic immunosuppressive agent; Doxorubicin hydrochloride, a tumor suppressor drug shown to inhibit DNA topoisomerase II and reduce Tau cellular levels.

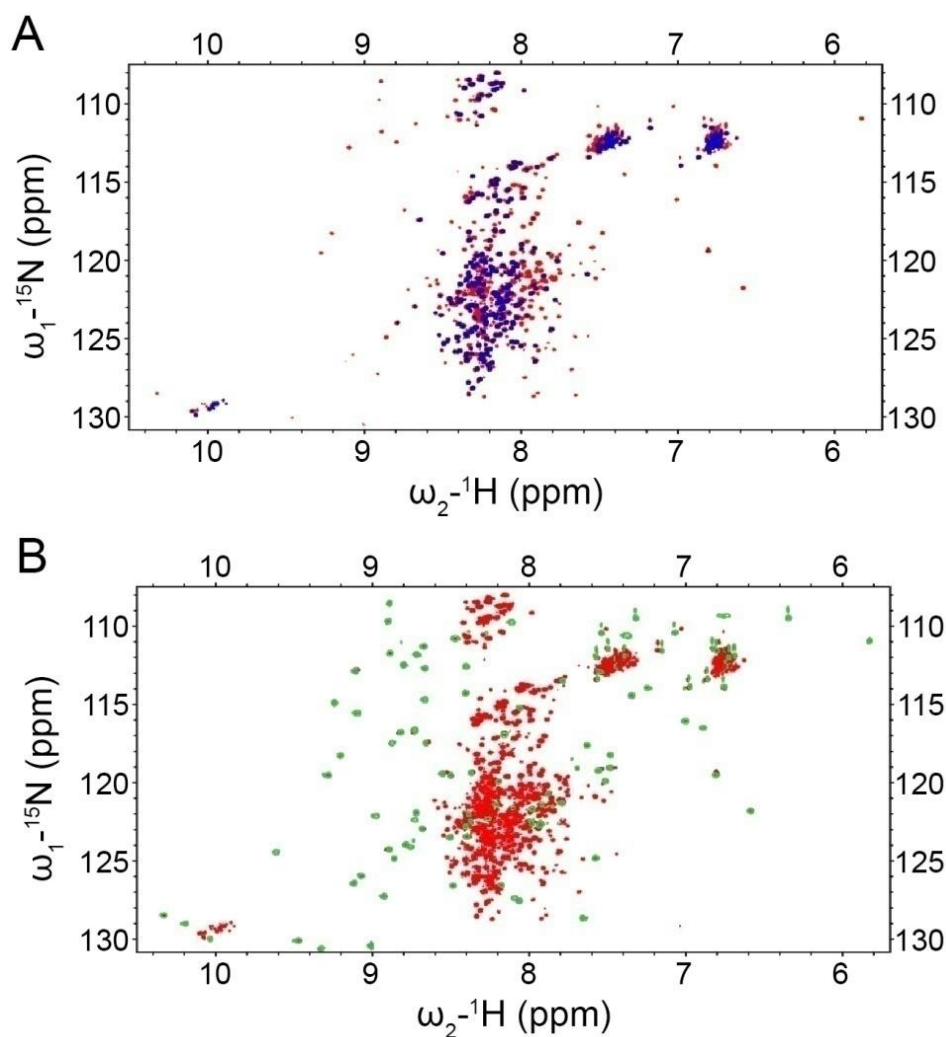


**Figure S11.** Modulation of Tau phosphorylation *in vitro*. **A.** Reduction of Tau phosphorylation at Thr 231 after 30 min incubation of PNC crude extracts with lambda protein phosphatase ( $\lambda$ -PP). **B.** *In vitro* phosphorylated recombinant Tau at Thr 231 is observed after incubation with recombinant Cdk5 for 1 h. Cdk2 dependent phosphorylation of Tau at Thr 231 has been published previously (Sottejeau et al., 2015)

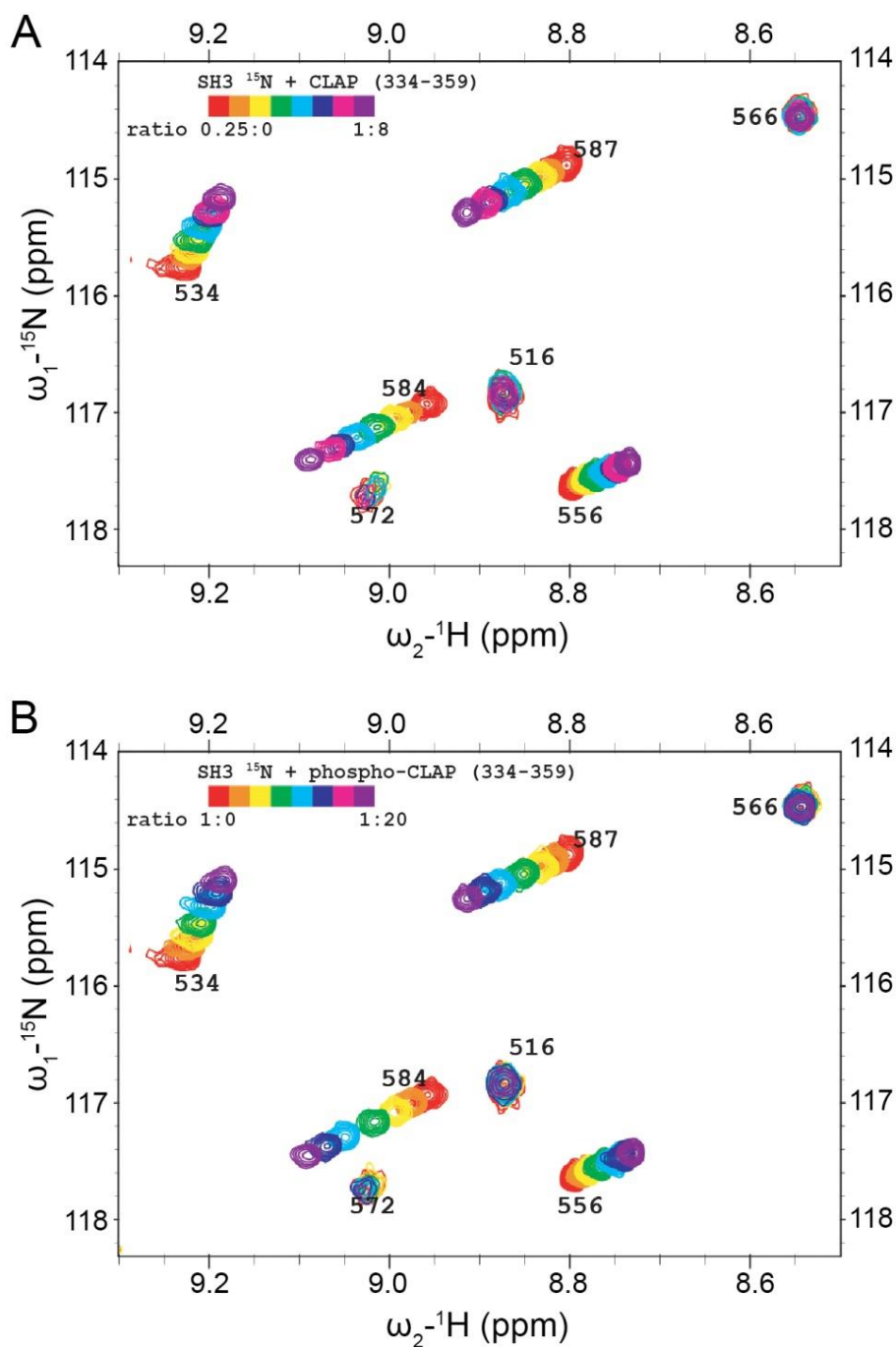


**Figure S12.** NMR measurements confirm that Cdk2 phosphorylates BIN1 CLAP at T348. **A.** Maldi-TOF analysis of CLAP (334-359) peptide before (red) and after (blue) incubation with Cdk2/CycA3 kinase. Incubation of the peptide with the kinase (molar ratio 1/100) at 37°C for 3 h, in the presence of 2 mM ATP, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 2 mM DTT, 30 mM NaCl and protease inhibitors in 50 mM HEPES, pH 8.0, resulted in a mass increase compatible with the incorporation of one phosphate group. T238 is

the only Pro-directed site compatible with the kinase specificity in the peptide. **B.**  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of BIN1Iso1-CLAP-T348E protein (blue), Cdk2-phospho-BIN1Iso1 (superimposed in red) and BIN1Iso1 protein (superimposed in green). Boxed resonances, superimposed in the blue and red spectra, correspond to some of the resonances of the BIN1-SH3 domain, and are only detected in the presence of T348 phosphorylation or the T348E mutation of the CLAP domain (see also [Fig. S13](#)). Circled resonances, only detected in the red spectrum (or Cdk2-phospho-BIN1) correspond to resonances with typical H-N chemical shift values for pS/pT residues. Multiple sites of Cdk2-BIN1 were thus modified in the conditions of this assay, as also shown by the characteristic gel-shift observed by SDS-PAGE (left inset). Further, BIN1 p-T348 antibody recognizes the BIN1 CLAP (334-359) peptide upon Cdk2 phosphorylation (right inset).



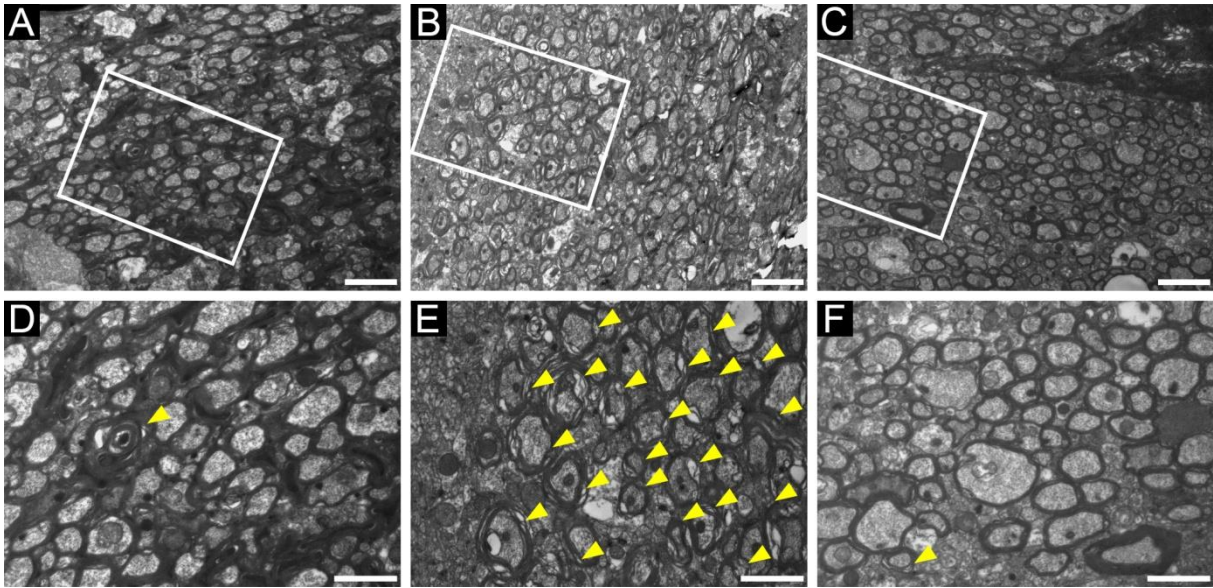
**Figure S13.** Additional signals in BIN1iso1-CLAP-T348E matched signals from BIN1 SH3 domain. Overlays of  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of (A) BIN1iso1-CLAP-T348E protein (in red) and BIN1iso1 protein (superimposed in blue) or of (B) BIN1iso1-CLAP-T348E protein (in red) and BIN1 SH3 domain (superimposed in green). In BIN1iso1 spectrum, in blue, due to the large size of the BIN1iso1 protein, only signals corresponding to mobile disordered regions are detected. These signals show a typical poor dispersion on the  $^1\text{H}$  scale (ca. 7.5-8.5 ppm). Due to this intrinsic need of mobility to detect protein NMR signals, the SH3-BIN1 resonance are only detected when the domain behaves independently of the full protein, as is observed for BIN1iso1-CLAP-T348E (in red). Signals from the SH3-BIN1 domain show a good dispersion on the  $^1\text{H}$  scale (ca. 6.5-9.5 ppm), as expected for globular domain signals. The additional signals observed in BIN1iso1-CLAP-T348E, in red, matched signals from the SH3-BIN1 domain, in green.



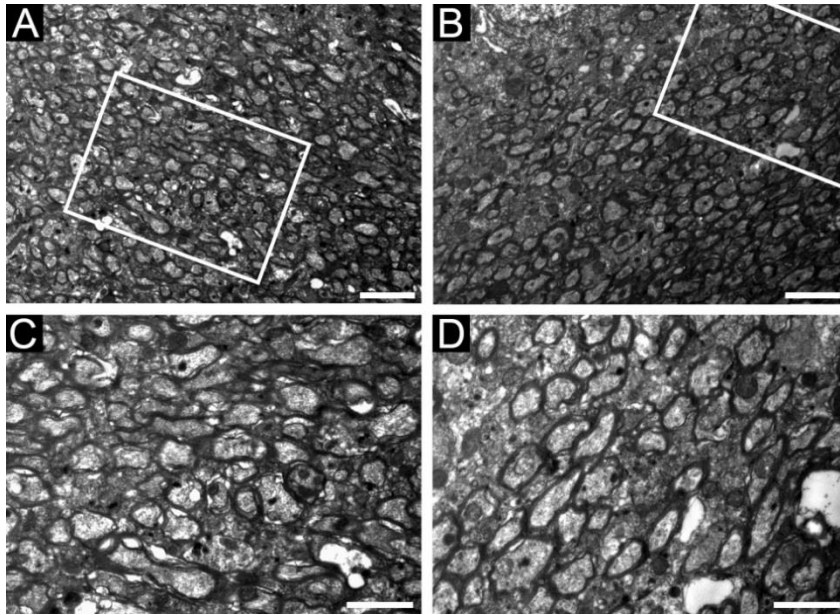
**Figure S14.** Titration of  $^{15}\text{N}$ -BIN1-SH3 with CLAP peptides. Detail of overlaid  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of BIN1-SH3 domain, in the presence of increasing amount of (A) CLAP (334-359) peptide, molar ratios 0.25 to 8 (color scale, from red to violet), or of (B) phospho-CLAP (334-359) peptide, molar ratios 1 to 20 (color scale, from red to violet). One spectrum was recorded for each titration point. The gradual change of the chemical shift value for each resonance was then used to build a saturation curve (see Fig. 6G). Data were averaged to estimate the  $K_d$  values. Note that a larger excess of

phospho-CLAP (334-359) peptide was needed to reach saturation, due to its lower affinity for BIN1-SH3 domain, compared to the non-phosphorylated peptide.

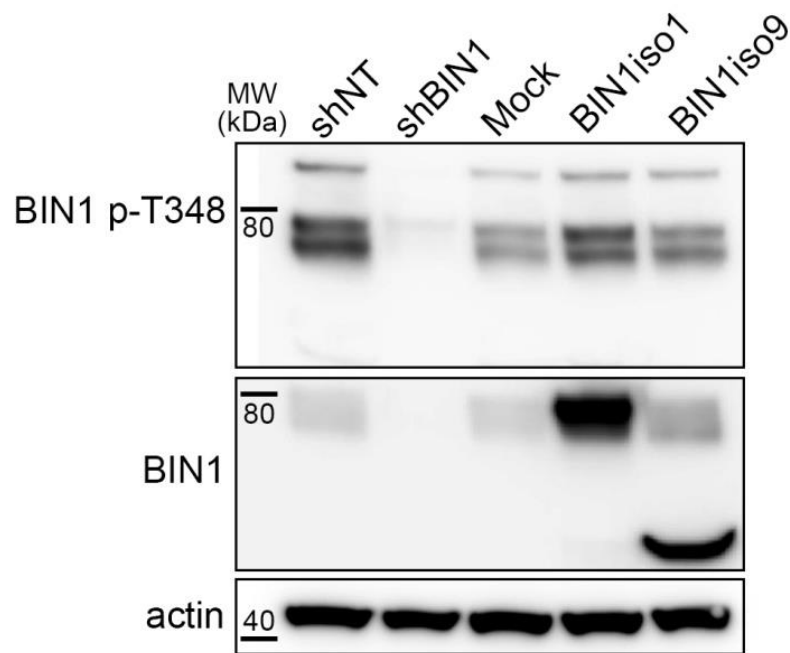




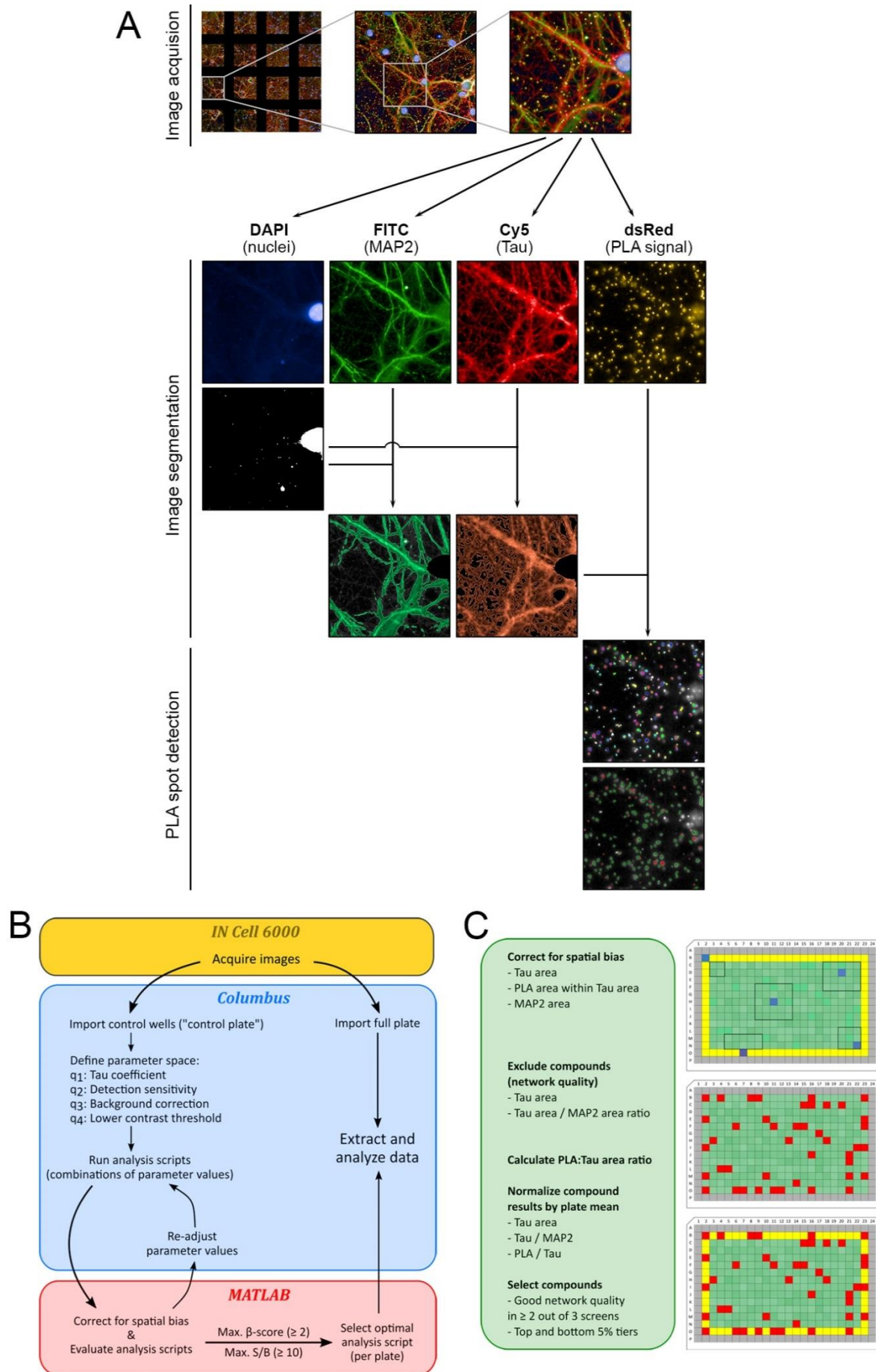
**Figure S15.** Myelin alterations following hTau overexpression was prevented upon BIN1 overexpression. **A-C.** Electron microscopy analysis of the myelinated axons in the fornices of 18-month-old control (A), hTau (B), and hTau;Tg*BIN1* (C) males. **D-F.** Serial magnification of the marked areas. Arrowheads point to myelin abnormalities defined by multiple myelin rings. Micrographs are representative of 2 animals per genotype. Scale bars = 5  $\mu\text{m}$  (A-C) and 2  $\mu\text{m}$  (D-F).



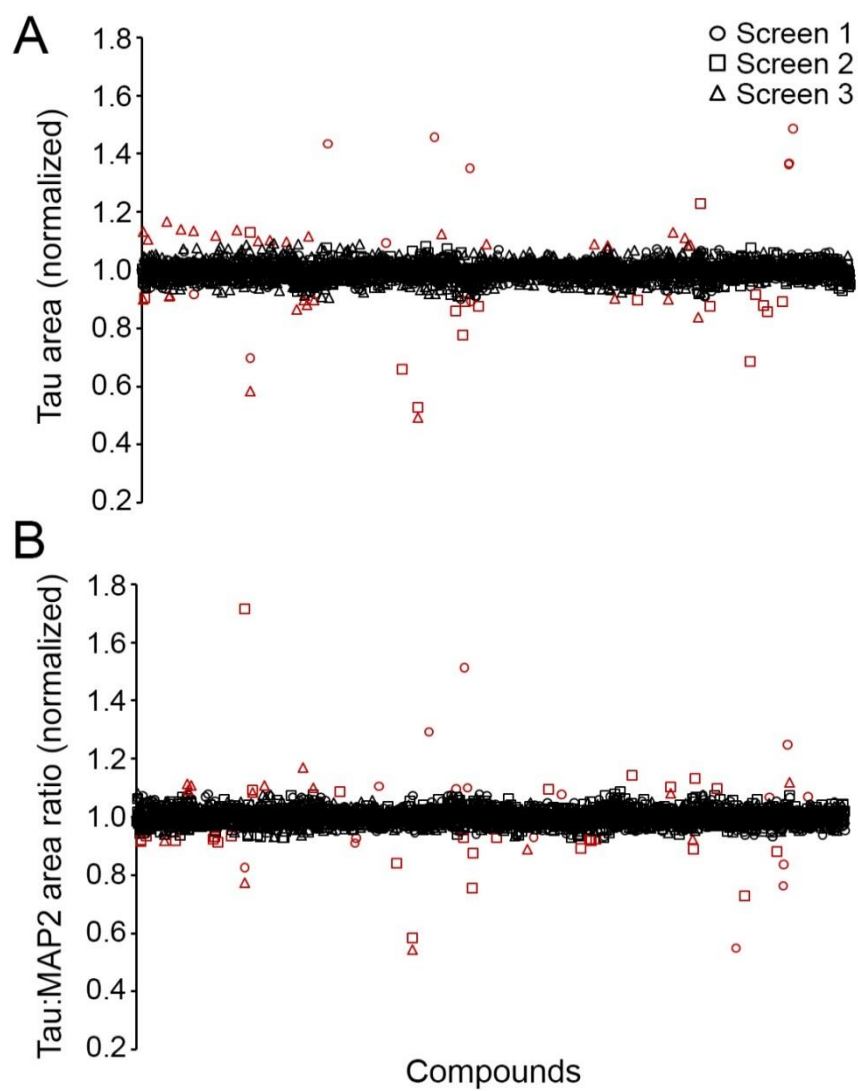
**Figure S16.** Myelin structure is unaffected following BIN1 overexpression. **A-B.** Electron microscopy analysis of the myelinated axons in the fornices of 18-month-old *Mapt*<sup>-/-</sup>; *TgBIN1* (A) and *TgBIN1* (B) males. **C-D.** Serial magnification of the marked areas. Micrographs are representative of 2 animals per genotype. Scale bars = 5  $\mu\text{m}$  (A-B) and 2  $\mu\text{m}$  (C-D).



**Figure S17.** Specificity of BIN1 p-T348 antibody to the neuronal isoform of BIN1 in PNC. Western blot of neurons transduced with shNT, shBIN1, Mock, BIN1iso1, and BIN1iso9 constructs. BIN1 p-T348 signal is modulated as a function of BIN1iso1 under- and overexpression. No BIN1 p-T348 signal was detected at the molecular weight of BIN1iso9.

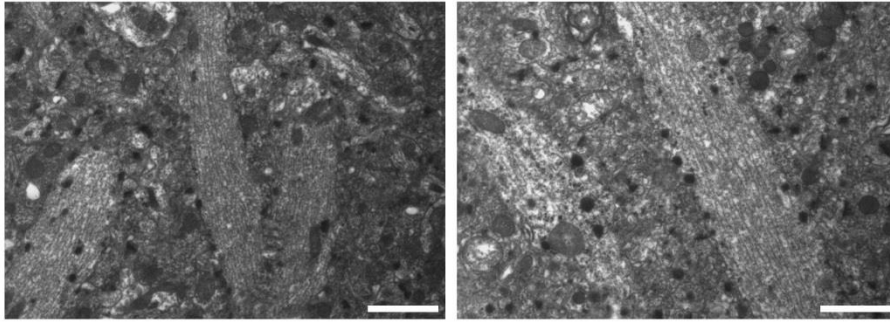


**Figure S18.** HCS image analysis and quantification procedures. **A.** Details of image acquisition, segmentation and PLA detection processes: Acquisition of 16 fields per well in four wavelengths using IN Cell Analyzer 6000; exclusion of somatic regions from FITC and Cy5 channels and delimitation of MAP2 and Tau areas in the Columbus software; detection of PLA spots in non-somatic Tau areas and their filtering based on area and contrast (green spots in the last image). **B.** Schematic showing the iterative process for selecting the optimum analysis script separately for each plate. **C.** Demonstration of data analysis in a representative plate layout. Yellow wells are used to correct for spatial bias. Blue wells and the corresponding 5×5 neighborhood (black outlines) illustrate the correction for local bias. Red wells were excluded based on network quality and the remaining (green) wells were used to calculate plate means for normalization.

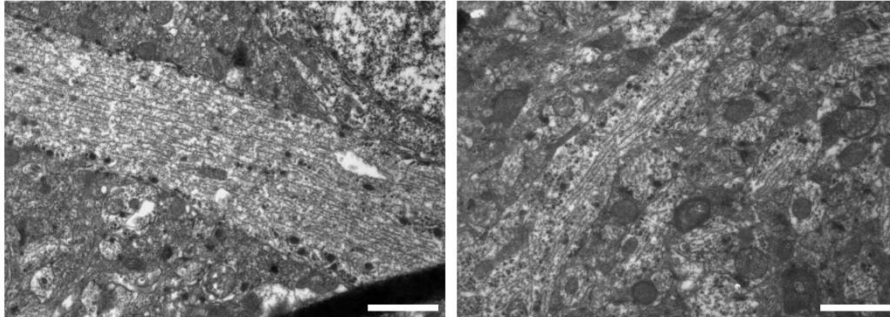


**Figure S19.** Distribution of Tau area (**A**) and Tau:MAP2 area ratio (**B**) of all 1,126 compounds in the three screenings, after plate-by-plate normalization (excluded data points shown in red).

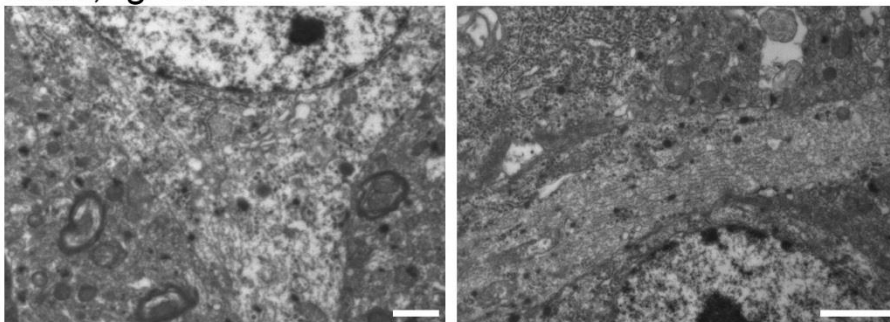
Control



hTau



hTau;TgBIN1



**Figure S20.** Axonal ultrastructure is unaffected in transgenic mice. Electron microscopy analysis of axon fibers in the hippocampal CA1 region of 18-month-old control, hTau, and hTau;TgBIN1 males. Micrographs are representative of 2 animals per genotype. Scale bars = 2  $\mu$ m.





# Bibliographie

---

- Acosta-Cabronero, J., G. B. Williams, G. Pengas, and P. J. Nestor. 2010. 'Absolute diffusivities define the landscape of white matter degeneration in Alzheimer's disease', *Brain*, 133: 529-39.
- Adam, J., N. Basnet, and N. Mizuno. 2015. 'Structural insights into the cooperative remodeling of membranes by amphiphysin/BIN1', *Sci Rep*, 5: 15452.
- Adams, S. L., K. Tilton, J. A. Kozubek, S. Seshadri, and I. Delalle. 2016. 'Subcellular Changes in Bridging Integrator 1 Protein Expression in the Cerebral Cortex During the Progression of Alzheimer Disease Pathology', *J Neuropathol Exp Neurol*, 75: 779-90.
- Ahmed, T., A. Van der Jeugd, D. Blum, M. C. Galas, R. D'Hooge, L. Buee, and D. Balschun. 2014. 'Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion', *Neurobiol Aging*, 35: 2474-78.
- Albensi, B. C., and M. P. Mattson. 2000. 'Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity', *Synapse*, 35: 151-9.
- Alzheimer, Alois. 1907. 'Uber eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde', *Allgemeine Zeitschrift fur Psychiatrie und phychish-Gerichtliche Medizin*.
- Amniai, L., G. Lippens, and I. Landrieu. 2011. 'Characterization of the AT180 epitope of phosphorylated Tau protein by a combined nuclear magnetic resonance and fluorescence spectroscopy approach', *Biochem Biophys Res Commun*, 412: 743-6.
- Anczukow, O., A. Z. Rosenberg, M. Akerman, S. Das, L. Zhan, R. Karni, S. K. Muthuswamy, and A. R. Krainer. 2012. 'The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation', *Nat Struct Mol Biol*, 19: 220-8.
- Anderson, J. M., D. W. Hampton, R. Patani, G. Pryce, R. A. Crowther, R. Reynolds, R. J. Franklin, G. Giovannoni, D. A. Compston, D. Baker, M. G. Spillantini, and S. Chandran. 2008. 'Abnormally phosphorylated tau is associated with neuronal and axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis', *Brain*, 131: 1736-48.
- Andorfer, C., C. M. Acker, Y. Kress, P. R. Hof, K. Duff, and P. Davies. 2005. 'Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms', *J Neurosci*, 25: 5446-54.
- Andorfer, C., Y. Kress, M. Espinoza, R. de Silva, K. L. Tucker, Y. A. Barde, K. Duff, and P. Davies. 2003. 'Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms', *J Neurochem*, 86: 582-90.
- Aronov, S., G. Aranda, L. Behar, and I. Ginzburg. 2001. 'Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal', *J Neurosci*, 21: 6577-87.
- Arriagada, P. V., J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte, and B. T. Hyman. 1992. 'Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease', *Neurology*, 42: 631-9.
- Asuni, A. A., A. Boutajangout, D. Quartermain, and E. M. Sigurdsson. 2007. 'Immunotherapy targeting pathological tau conformers in a tangle mouse model reduces brain pathology with associated functional improvements', *J Neurosci*, 27: 9115-29.
- Avila, J., E. G. de Barreda, N. Pallas-Bazarra, and F. Hernandez. 2013. 'Tau and neuron aging', *Aging Dis*, 4: 23-8.
- Bagchi, S., R. Fredriksson, and A. Wallen-Mackenzie. 2015. 'In Situ Proximity Ligation Assay (PLA)', *Methods Mol Biol*, 1318: 149-59.
- Bast, T., and J. Feldon. 2003. 'Hippocampal modulation of sensorimotor processes', *Prog Neurobiol*, 70: 319-45.
- Bauerfeind, R., K. Takei, and P. De Camilli. 1997. 'Amphiphysin I is associated with coated endocytic intermediates and undergoes stimulation-dependent dephosphorylation in nerve terminals', *J Biol Chem*, 272: 30984-92.

- Beaudoin, G. M., 3rd, S. H. Lee, D. Singh, Y. Yuan, Y. G. Ng, L. F. Reichardt, and J. Arikkath. 2012. 'Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex', *Nat Protoc*, 7: 1741-54.
- Beecham, G. W., K. Hamilton, A. C. Naj, E. R. Martin, M. Huentelman, A. J. Myers, J. J. Corneveaux, J. Hardy, J. P. Vonsattel, S. G. Younkin, D. A. Bennett, P. L. De Jager, E. B. Larson, P. K. Crane, M. I. Kamboh, J. K. Kofler, D. C. Mash, L. Duque, J. R. Gilbert, H. Gwirtsman, J. D. Buxbaum, P. Kramer, D. W. Dickson, L. A. Farrer, M. P. Frosch, B. Ghetti, J. L. Haines, B. T. Hyman, W. A. Kukull, R. P. Mayeux, M. A. Pericak-Vance, J. A. Schneider, J. Q. Trojanowski, E. M. Reiman, G. D. Schellenberg, and T. J. Montine. 2014. 'Genome-wide association meta-analysis of neuropathologic features of Alzheimer's disease and related dementias', *PLoS Genet*, 10: e1004606.
- Bejanin, A., D. R. Schonhaut, R. La Joie, J. H. Kramer, S. L. Baker, N. Sosa, N. Ayakta, A. Cantwell, M. Janabi, M. Lauriola, J. P. O'Neil, M. L. Gorno-Tempini, Z. A. Miller, H. J. Rosen, B. L. Miller, W. J. Jagust, and G. D. Rabinovici. 2017. 'Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease', *Brain*, 140: 3286-300.
- Bercury, K. K., and W. B. Macklin. 2015. 'Dynamics and mechanisms of CNS myelination', *Dev Cell*, 32: 447-58.
- Bergmann, O., K. L. Spalding, and J. Frisen. 2015. 'Adult Neurogenesis in Humans', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7: a018994.
- Bertram, L., and R. E. Tanzi. 2009. 'Genome-wide association studies in Alzheimer's disease', *Hum Mol Genet*, 18: R137-45.
- Bidzan, M., and L. Bidzan. 2014. '[Neurobehavioral manifestation in early period of Alzheimer disease and vascular dementia]', *Psychiatr Pol*, 48: 319-30.
- Binder, J. R., and R. H. Desai. 2011. 'The neurobiology of semantic memory', *Trends Cogn Sci*, 15: 527-36.
- Black, M. M., T. Slaughter, S. Moshiach, M. Obrocka, and I. Fischer. 1996. 'Tau is enriched on dynamic microtubules in the distal region of growing axons', *J Neurosci*, 16: 3601-19.
- Boersma, M. C., E. C. Dresselhaus, L. M. De Biase, A. B. Mihalas, D. E. Bergles, and M. K. Meffert. 2011. 'A requirement for nuclear factor-kappaB in developmental and plasticity-associated synaptogenesis', *J Neurosci*, 31: 5414-25.
- Boettger, L. M., R. E. Handsaker, M. C. Zody, and S. A. McCarroll. 2012. 'Structural haplotypes and recent evolution of the human 17q21.31 region', *Nat Genet*, 44: 881-5.
- Bohm, J., U. Yis, R. Ortac, H. Cakmakci, S. H. Kurul, E. Dirik, and J. Laporte. 2010. 'Case report of intrafamilial variability in autosomal recessive centronuclear myopathy associated to a novel BIN1 stop mutation', *Orphanet J Rare Dis*, 5: 35.
- Bordiuk, O. L., K. Smith, P. J. Morin, and M. V. Semenov. 2014. 'Cell proliferation and neurogenesis in adult mouse brain', *PLoS One*, 9: e111453.
- Braak, H., I. Alafuzoff, T. Arzberger, H. Kretschmar, and K. Del Tredici. 2006. 'Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry', *Acta Neuropathol*, 112: 389-404.
- Braak, H., and E. Braak. 1991. 'Neuropathological staging of Alzheimer-related changes', *Acta Neuropathol*, 82: 239-59.
- Brady, J. P., J. K. Claridge, P. G. Smith, and J. R. Schnell. 2015. 'A conserved amphipathic helix is required for membrane tubule formation by Yop1p', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: E639-48.
- Brandt, R., J. Leger, and G. Lee. 1995. 'Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain', *J Cell Biol*, 131: 1327-40.
- Bray, M. A., A. Carpenter, Broad Institute of M. I. T. Imaging Platform, and Harvard. 2004. 'Advanced Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening and Analysis.' in G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, K. Brimacombe, A. Grossman, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, B. Bejcek, J. M. M. Caaveiro, T. D. Y. Chung, J. L. Dahlin, V. Devanaryan, T. L. Foley, M. Glicksman, M. D. Hall, J. V. Haas, J. Inglese, P. W. Iversen, S. D. Kahl, S. C. Kales, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, O. J. Trask, Jr., J. R. Weidner, M. J. Wildey, M. Xia and X. Xu

- (eds.), *Assay Guidance Manual* (Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD)).
- Brion, J. P., C. Smith, A. M. Couck, J. M. Gallo, and B. H. Anderton. 1993. 'Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease', *J Neurochem*, 61: 2071-80.
- Broadbent, N. J., L. R. Squire, and R. E. Clark. 2004. 'Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 14515-20.
- Broadwell, R. D., and A. M. Cataldo. 1984. 'The neuronal endoplasmic reticulum: its cytochemistry and contribution to the endomembrane system. II. Axons and terminals', *J Comp Neurol*, 230: 231-48.
- Brownlow, M. L., L. Benner, D. D'Agostino, M. N. Gordon, and D. Morgan. 2013. 'Ketogenic diet improves motor performance but not cognition in two mouse models of Alzheimer's pathology', *PLoS One*, 8: e75713.
- Brownlow, M. L., A. Joly-Amado, S. Azam, M. Elza, M. L. Selenica, C. Pappas, B. Small, R. Engelman, M. N. Gordon, and D. Morgan. 2014. 'Partial rescue of memory deficits induced by calorie restriction in a mouse model of tau deposition', *Behav Brain Res*, 271: 79-88.
- Buchman, A. S., and D. A. Bennett. 2011. 'Loss of motor function in preclinical Alzheimer's disease', *Expert Rev Neurother*, 11: 665-76.
- Buee, L., T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, A. Delacourte, and P. R. Hof. 2000. 'Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders', *Brain Res Brain Res Rev*, 33: 95-130.
- Buee, L., L. Troquier, S. Burnouf, K. Belarbi, A. Van der Jeugd, T. Ahmed, F. Fernandez-Gomez, R. Caillierez, M. E. Grosjean, S. Begard, B. Barbot, D. Demeyer, H. Obriot, I. Brion, V. Buee-Scherrer, C. A. Maurage, D. Balschun, R. D'Hooge, M. Hamdane, D. Blum, and N. Sergeant. 2010. 'From tau phosphorylation to tau aggregation: what about neuronal death?', *Biochem Soc Trans*, 38: 967-72.
- Butler, M. H., C. David, G. C. Ochoa, Z. Freyberg, L. Daniell, D. Grabs, O. Cremona, and P. De Camilli. 1997. 'Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle', *J Cell Biol*, 137: 1355-67.
- Cabrales Fontela, Y., H. Kadavath, J. Biernat, D. Riedel, E. Mandelkow, and M. Zweckstetter. 2017. 'Multivalent cross-linking of actin filaments and microtubules through the microtubule-associated protein Tau', *Nat Commun*, 8: 1981.
- Calafate, S., W. Flavin, P. Verstreken, and D. Moechars. 2016. 'Loss of Bin1 Promotes the Propagation of Tau Pathology', *Cell Rep*, 17: 931-40.
- Catani, M., F. Dell'acqua, and M. Thiebaut de Schotten. 2013. 'A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour', *Neurosci Biobehav Rev*, 37: 1724-37.
- Chapuis, J., A. Flaig, B. Grenier-Boley, F. Eysert, V. Pottiez, G. Deloison, A. Vandeputte, A. M. Ayrat, T. Mendes, S. Desai, A. M. Goate, J. S. K. Kauwe, F. Leroux, A. Herledan, F. Demiautte, C. Bauer, F. Checler, R. C. Petersen, K. Blennow, H. Zetterberg, L. Minthon, V. M. Van Deerlin, V. M. Lee, L. M. Shaw, J. Q. Trojanowski, M. Albert, A. Moghekar, R. O'Brien, E. R. Peskind, N. Malmanche, G. D. Schellenberg, P. Dourlen, O. R. Song, C. Cruchaga, P. Amouyel, B. Deprez, P. Brodin, and J. C. Lambert. 2017. 'Genome-wide, high-content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 as a major modulator of APP metabolism', *Acta Neuropathol*, 133: 955-66.
- Chapuis, J., F. Hansmannel, M. Gistelink, A. Mounier, C. Van Cauwenberghe, K. V. Kolen, F. Geller, Y. Sottejeau, D. Harold, P. Dourlen, B. Grenier-Boley, Y. Kamatani, B. Delepine, F. Demiautte, D. Zelenika, N. Zommer, M. Hamdane, C. Bellenguez, J. F. Dartigues, J. J. Hauw, F. Letronne, A. M. Ayrat, K. Sleegers, A. Schellens, L. V. Broeck, S. Engelborghs, P. P. De Deyn, R. Vandenberghe, M. O'Donovan, M. Owen, J. Epelbaum, M. Mercken, E. Karran, M. Bantscheff, G. Drewes, G. Joberty, D. Champion, J. N. Octave, C. Berr, M. Lathrop, P. Callaerts, D. Mann, J. Williams, L. Buee, I. Dewachter, C. Van Broeckhoven, P. Amouyel, D. Moechars, B. Dermaut, and J. C.

- Lambert. 2013. 'Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology', *Mol Psychiatry*, 18: 1225-34.
- Chapuis, J., F. Hansmannel, M. Gistelincq, A. Mounier, C. Van Cauwenberghe, K. V. Kolen, F. Geller, Y. Sottejeau, D. Harold, P. Dourlen, B. Grenier-Boley, Y. Kamatani, B. Delepine, F. Demiautte, D. Zelenika, N. Zommer, M. Hamdane, C. Bellenguez, J. F. Dartigues, J. J. Hauw, F. Letronne, A. M. Ayril, K. Sleegers, A. Schellens, L. V. Broeck, S. Engelborghs, P. P. De Deyn, R. Vandenberghe, M. O'Donovan, M. Owen, J. Epelbaum, M. Mercken, E. Karran, M. Bantscheff, G. Drewes, G. Joberty, D. Campion, J. N. Octave, C. Berr, M. Lathrop, P. Callaerts, D. Mann, J. Williams, L. Buee, I. Dewachter, C. Van Broeckhoven, P. Amouyel, D. Moechars, B. Dermaut, J. C. Lambert, and Gerad consortium. 2013. 'Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology', *Mol Psychiatry*, 18: 1225-34.
- Chen, K. L., R. Y. Yuan, C. J. Hu, and C. Y. Hsu. 2010. 'Amyloid-beta peptide alteration of tau exon-10 splicing via the GSK3beta-SC35 pathway', *Neurobiol Dis*, 40: 378-85.
- Chetelat, G., R. La Joie, N. Villain, A. Perrotin, V. de La Sayette, F. Eustache, and R. Vandenberghe. 2013. 'Amyloid imaging in cognitively normal individuals, at-risk populations and preclinical Alzheimer's disease', *Neuroimage Clin*, 2: 356-65.
- Chiurchiu, V., M. Maccarrone, and A. Orlacchio. 2014. 'The role of reticulons in neurodegenerative diseases', *Neuromolecular Med*, 16: 3-15.
- Chong, F. P., K. Y. Ng, R. Y. Koh, and S. M. Chye. 2018. 'Tau Proteins and Tauopathies in Alzheimer's Disease', *Cell Mol Neurobiol*, 38: 965-80.
- Cipriani, G., C. Lucetti, A. Nuti, and S. Danti. 2014. 'Wandering and dementia', *Psychogeriatrics*, 14: 135-42.
- Claeys, K. G., T. Maisonobe, J. Bohm, J. Laporte, M. Hezode, N. B. Romero, G. Brochier, M. Bitoun, R. Y. Carlier, and T. Stojkovic. 2010. 'Phenotype of a patient with recessive centronuclear myopathy and a novel BIN1 mutation', *Neurology*, 74: 519-21.
- Clark, R. E., S. M. Zola, and L. R. Squire. 2000. 'Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus', *J Neurosci*, 20: 8853-60.
- Clarke, P. G. 1990. 'Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms', *Anat Embryol (Berl)*, 181: 195-213.
- Clavaguera, F., H. Akatsu, G. Fraser, R. A. Crowther, S. Frank, J. Hench, A. Probst, D. T. Winkler, J. Reichwald, M. Staufenbiel, B. Ghetti, M. Goedert, and M. Tolnay. 2013. 'Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 9535-40.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines, and M. A. Pericak-Vance. 1993. 'Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families', *Science*, 261: 921-3.
- Corkin, S. 2002. 'What's new with the amnesic patient H.M.?', *Nat Rev Neurosci*, 3: 153-60.
- Couchie, D., C. Mavilia, I. S. Georgieff, R. K. Liem, M. L. Shelanski, and J. Nunez. 1992. 'Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 4378-81.
- Cowling, B. S., I. Prokic, H. Tasfaout, A. Rabai, F. Humbert, B. Rinaldi, A. S. Nicot, C. Kretz, S. Friant, A. Roux, and J. Laporte. 2017. 'Amphiphysin (BIN1) negatively regulates dynamin 2 for normal muscle maturation', *J Clin Invest*, 127: 4477-87.
- Cruchaga, C., J. S. Kauwe, O. Harari, S. C. Jin, Y. Cai, C. M. Karch, B. A. Benitez, A. T. Jeng, T. Skorupa, D. Carrell, S. Bertelsen, M. Bailey, D. McKean, J. M. Shulman, P. L. De Jager, L. Chibnik, D. A. Bennett, S. E. Arnold, D. Harold, R. Sims, A. Gerrish, J. Williams, V. M. Van Deerlin, V. M. Lee, L. M. Shaw, J. Q. Trojanowski, J. L. Haines, R. Mayeux, M. A. Pericak-Vance, L. A. Farrer, G. D. Schellenberg, E. R. Peskind, D. Galasko, A. M. Fagan, D. M. Holtzman, J. C. Morris, and A. M. Goate. 2013. 'GWAS of cerebrospinal fluid tau levels identifies risk variants for Alzheimer's disease', *Neuron*, 78: 256-68.
- D'Alessandro, M., K. Hnia, V. Gache, C. Koch, C. Gavriilidis, D. Rodriguez, A. S. Nicot, N. B. Romero, Y. Schwab, E. Gomes, M. Labouesse, and J. Laporte. 2015. 'Amphiphysin 2 Orchestrates Nucleus

- Positioning and Shape by Linking the Nuclear Envelope to the Actin and Microtubule Cytoskeleton', *Dev Cell*, 35: 186-98.
- Daudin, Rachel, Damien Marechal, Qian Wang, Yoshihumi Abe, Nicolas Bourg, Maxime Sartori, Yann Loe-Mie, Joanna Lipecka, Chiara Guerrera, Andrew McKenzie, Brigitte Potier, Patrick Dutar, Julia Viard, Aude-Marie Lepagnol-Bestel, Alexandra Winkeler, Valerie Hindie, Marie-Christine Birling, Loic Lindner, Claire Chevalier, Guillaume Pavlovic, Martina Reiss, Harald Kranz, Guillaume Dupuis, Sandrine Leveque-Fort, Jorge Diaz, Elisabeth Davenas, Doulaye Dembele, Jocelyn Laporte, Christelle Thibault-Carpentier, Bernard Malissen, Jean-Christophe Rain, Luisa Ciobanu, Denis Le Bihan, Bin Zhang, Yann Herault, and Michel Simonneau. 2018. 'BIN1 genetic risk factor for Alzheimer is sufficient to induce early structural tract alterations in entorhinal cortex-dentate gyrus pathway and related hippocampal multi-scale impairments', *bioRxiv*.
- De Jager, P. L., G. Srivastava, K. Lunnon, J. Burgess, L. C. Schalkwyk, L. Yu, M. L. Eaton, B. T. Keenan, J. Ernst, C. McCabe, A. Tang, T. Raj, J. Replogle, W. Brodeur, S. Gabriel, H. S. Chai, C. Younkin, S. G. Younkin, F. Zou, M. Szyf, C. B. Epstein, J. A. Schneider, B. E. Bernstein, A. Meissner, N. Ertekin-Taner, L. B. Chibnik, M. Kellis, J. Mill, and D. A. Bennett. 2014. 'Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci', *Nat Neurosci*, 17: 1156-63.
- De Rossi, P., V. Buggia-Prevot, B. L. Clayton, J. B. Vasquez, C. van Sanford, R. J. Andrew, R. Lesnick, A. Botte, C. Deyts, S. Salem, E. Rao, R. C. Rice, A. Parent, S. Kar, B. Popko, P. Pytel, S. Estus, and G. Thinakaran. 2016. 'Predominant expression of Alzheimer's disease-associated BIN1 in mature oligodendrocytes and localization to white matter tracts', *Mol Neurodegener*, 11: 59.
- Delekate, A., M. Zagrebelsky, S. Kramer, M. E. Schwab, and M. Korte. 2011. 'NogoA restricts synaptic plasticity in the adult hippocampus on a fast time scale', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 2569-74.
- Di Paolo, G., S. Sankaranarayanan, M. R. Wenk, L. Daniell, E. Perucco, B. J. Caldarone, R. Flavell, M. R. Picciotto, T. A. Ryan, O. Cremona, and P. De Camilli. 2002. 'Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice', *Neuron*, 33: 789-804.
- Dixit, R., J. L. Ross, Y. E. Goldman, and E. L. Holzbaur. 2008. 'Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau', *Science*, 319: 1086-9.
- Doring, M., A. Loos, N. Schrader, B. Pfander, and R. Bauerfeind. 2006. 'Nerve growth factor-induced phosphorylation of amphiphysin-1 by casein kinase 2 regulates clathrin-amphiphysin interactions', *J Neurochem*, 98: 2013-22.
- Dourlen, P., F. J. Fernandez-Gomez, C. Dupont, B. Grenier-Boley, C. Bellenguez, H. Obriot, R. Caillierez, Y. Sottejeau, J. Chapuis, A. Bretteville, F. Abdelfettah, C. Delay, N. Malmanche, H. Soininen, M. Hiltunen, M. C. Galas, P. Amouyel, N. Sergeant, L. Buee, J. C. Lambert, and B. Deraut. 2017. 'Functional screening of Alzheimer risk loci identifies PTK2B as an in vivo modulator and early marker of Tau pathology', *Mol Psychiatry*, 22: 874-83.
- Drager, N. M., E. Nachman, M. Winterhoff, S. Bruhmann, P. Shah, T. Katsinelos, S. Boulant, A. A. Telemann, J. Faix, and T. R. Jahn. 2017. 'Bin1 directly remodels actin dynamics through its BAR domain', *EMBO Rep*, 18: 2051-66.
- Drew, L. J., S. Fusi, and R. Hen. 2013. 'Adult neurogenesis in the mammalian hippocampus: why the dentate gyrus?', *Learn Mem*, 20: 710-29.
- Duan, A. R., E. M. Jonasson, E. O. Alberico, C. Li, J. P. Scripture, R. A. Miller, M. S. Alber, and H. V. Goodson. 2017. 'Interactions between Tau and Different Conformations of Tubulin: Implications for Tau Function and Mechanism', *J Mol Biol*, 429: 1424-38.
- Duff, K., H. Knight, L. M. Refolo, S. Sanders, X. Yu, M. Picciano, B. Malester, M. Hutton, J. Adamson, M. Goedert, K. Burki, and P. Davies. 2000. 'Characterization of pathology in transgenic mice over-expressing human genomic and cDNA tau transgenes', *Neurobiol Dis*, 7: 87-98.
- Dujardin, S., M. Colin, and L. Buee. 2015. 'Invited review: Animal models of tauopathies and their implications for research/translation into the clinic', *Neuropathol Appl Neurobiol*, 41: 59-80.
- Dujardin, S., K. Lecolle, R. Caillierez, S. Begard, N. Zommer, C. Lachaud, S. Carrier, N. Dufour, G. Auregan, J. Winderickx, P. Hantraye, N. Deglon, M. Colin, and L. Buee. 2014. 'Neuron-to-neuron

- wild-type Tau protein transfer through a trans-synaptic mechanism: relevance to sporadic tauopathies', *Acta Neuropathol Commun*, 2: 14.
- Ebneth, A., R. Godemann, K. Stamer, S. Illenberger, B. Trinczek, and E. Mandelkow. 1998. 'Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease', *J Cell Biol*, 143: 777-94.
- Edeling, M. A., C. Smith, and D. Owen. 2006. 'Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 32-44.
- Einstein, G., R. Buranosky, and B. J. Crain. 1994. 'Dendritic pathology of granule cells in Alzheimer's disease is unrelated to neuritic plaques', *J Neurosci*, 14: 5077-88.
- Elie, A., E. Prezel, C. Guerin, E. Denarier, S. Ramirez-Rios, L. Serre, A. Andrieux, A. Fourest-Lieuvin, L. Blanchoin, and I. Arnal. 2015. 'Tau co-organizes dynamic microtubule and actin networks', *Sci Rep*, 5: 9964.
- Ellis, J. D., M. Barrios-Rodiles, R. Colak, M. Irimia, T. Kim, J. A. Calarco, X. Wang, Q. Pan, D. O'Hanlon, P. M. Kim, J. L. Wrana, and B. J. Blencowe. 2012. 'Tissue-specific alternative splicing remodels protein-protein interaction networks', *Mol Cell*, 46: 884-92.
- Espindola, S. L., A. Damianich, R. J. Alvarez, M. Sartor, J. E. Belforte, J. E. Ferrario, J. M. Gallo, and M. E. Avale. 2018. 'Modulation of Tau Isoforms Imbalance Precludes Tau Pathology and Cognitive Decline in a Mouse Model of Tauopathy', *Cell Rep*, 23: 709-15.
- Espinoza, M., R. de Silva, D. W. Dickson, and P. Davies. 2008. 'Differential incorporation of tau isoforms in Alzheimer's disease', *J Alzheimers Dis*, 14: 1-16.
- Falke, E., J. Nissanov, T. W. Mitchell, D. A. Bennett, J. Q. Trojanowski, and S. E. Arnold. 2003. 'Subicular dendritic arborization in Alzheimer's disease correlates with neurofibrillary tangle density', *Am J Pathol*, 163: 1615-21.
- Farias, G. A., J. P. Munoz, J. Garrido, and R. B. Maccioni. 2002. 'Tubulin, actin, and tau protein interactions and the study of their macromolecular assemblies', *J Cell Biochem*, 85: 315-24.
- Ferrer, I. 2018. 'Oligodendroglipathy in neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates: The forgotten partner', *Prog Neurobiol*, 169: 24-54.
- Floyd, S. R., E. B. Porro, V. I. Slepnev, G. C. Ochoa, L. H. Tsai, and P. De Camilli. 2001. 'Amphiphysin 1 binds the cyclin-dependent kinase (cdk) 5 regulatory subunit p35 and is phosphorylated by cdk5 and cdc2', *J Biol Chem*, 276: 8104-10.
- Folker, E. S., B. M. Baker, and H. V. Goodson. 2005. 'Interactions between CLIP-170, tubulin, and microtubules: implications for the mechanism of Clip-170 plus-end tracking behavior', *Mol Biol Cell*, 16: 5373-84.
- Fugier, C., A. F. Klein, C. Hammer, S. Vassilopoulos, Y. Ivarsson, A. Toussaint, V. Tosch, A. Vignaud, A. Ferry, N. Messaddeq, Y. Kokunai, R. Tsuburaya, P. de la Grange, D. Dembele, V. Francois, G. Precigout, C. Boulade-Ladame, M. C. Hummel, A. Lopez de Munain, N. Sergeant, A. Laquerriere, C. Thibault, F. Deryckere, D. Auboeuf, L. Garcia, P. Zimmermann, B. Udd, B. Schoser, M. P. Takahashi, I. Nishino, G. Bassez, J. Laporte, D. Furling, and N. Charlet-Berguerand. 2011. 'Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy', *Nat Med*, 17: 720-5.
- Gatz, M., C. A. Reynolds, L. Fratiglioni, B. Johansson, J. A. Mortimer, S. Berg, A. Fiske, and N. L. Pedersen. 2006. 'Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease', *Arch Gen Psychiatry*, 63: 168-74.
- Geiszler, P. C., M. R. Barron, and M. C. Pardon. 2016. 'Impaired burrowing is the most prominent behavioral deficit of aging htau mice', *Neuroscience*, 329: 98-111.
- Giffard, B., B. Desgranges, F. Nore-Mary, C. Lalevee, V. de la Sayette, F. Pasquier, and F. Eustache. 2001. 'The nature of semantic memory deficits in Alzheimer's disease: new insights from hyperpriming effects', *Brain*, 124: 1522-32.
- Gil, L., C. Federico, F. Pinedo, F. Bruno, A. B. Rebolledo, J. J. Montoya, I. M. Olazabal, I. Ferrer, and S. Saccone. 2017. 'Aging dependent effect of nuclear tau', *Brain Res*, 1677: 129-37.

- Gil, V., O. Nicolas, A. Mingorance, J. M. Urena, B. L. Tang, T. Hirata, J. Saez-Valero, I. Ferrer, E. Soriano, and J. A. del Rio. 2006. 'Nogo-A expression in the human hippocampus in normal aging and in Alzheimer disease', *J Neuropathol Exp Neurol*, 65: 433-44.
- Glatz, D. C., D. Rujescu, Y. Tang, F. J. Berendt, A. M. Hartmann, F. Faltraco, C. Rosenberg, C. Hulette, K. Jellinger, H. Hampel, P. Riederer, H. J. Moller, A. Andreadis, K. Henkel, and S. Stamm. 2006. 'The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA2-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease', *J Neurochem*, 96: 635-44.
- Glennon, E. B., I. J. Whitehouse, J. S. Miners, P. G. Kehoe, S. Love, K. A. Kellett, and N. M. Hooper. 2013. 'BIN1 is decreased in sporadic but not familial Alzheimer's disease or in aging', *PLoS One*, 8: e78806.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, and R. A. Crowther. 1992. 'Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 1983-7.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, M. C. Potier, J. Ulrich, and R. A. Crowther. 1989. 'Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain', *EMBO J*, 8: 393-9.
- Goedert, M., C. M. Wischik, R. A. Crowther, J. E. Walker, and A. Klug. 1988. 'Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 4051-5.
- Gomes, I., S. Sierra, and L. A. Devi. 2016. 'Detection of Receptor Heteromerization Using In Situ Proximity Ligation Assay', *Curr Protoc Pharmacol*, 75: 2.16.1-2.16.31.
- Gotz, J., D. Xia, G. Leinenga, Y. L. Chew, and H. Nicholas. 2013. 'What Renders TAU Toxic', *Front Neurol*, 4: 72.
- Gout, I., R. Dhand, I. D. Hiles, M. J. Fry, G. Panayotou, P. Das, O. Truong, N. F. Totty, J. Hsuan, G. W. Booker, and et al. 1993. 'The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains', *Cell*, 75: 25-36.
- Goyal, U., and C. Blackstone. 2013. 'Untangling the web: mechanisms underlying ER network formation', *Biochim Biophys Acta*, 1833: 2492-8.
- GrandPre, T., F. Nakamura, T. Vartanian, and S. M. Strittmatter. 2000. 'Identification of the Nogo inhibitor of axon regeneration as a Reticulon protein', *Nature*, 403: 439-44.
- Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski, and L. I. Binder. 1986. 'Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 4913-7.
- Gutierrez, H., V. A. Hale, X. Dolcet, and A. Davies. 2005. 'NF-kappaB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS', *Development*, 132: 1713-26.
- Haines, J. L. 2018. 'Alzheimer Disease: Perspectives from Epidemiology and Genetics', *J Law Med Ethics*, 46: 694-98.
- Hardy, J., and D. J. Selkoe. 2002. 'The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics', *Science*, 297: 353-6.
- Hatch, R. J., Y. Wei, D. Xia, and J. Gotz. 2017. 'Hyperphosphorylated tau causes reduced hippocampal CA1 excitability by relocating the axon initial segment', *Acta Neuropathol*, 133: 717-30.
- He, H. J., X. S. Wang, R. Pan, D. L. Wang, M. N. Liu, and R. Q. He. 2009. 'The proline-rich domain of tau plays a role in interactions with actin', *BMC Cell Biol*, 10: 81.
- Head, E., D. Powell, B. T. Gold, and F. A. Schmitt. 2012. 'Alzheimer's Disease in Down Syndrome', *Eur J Neurodegener Dis*, 1: 353-64.
- Heidary, G., and M. E. Fortini. 2001. 'Identification and characterization of the Drosophila tau homolog', *Mech Dev*, 108: 171-8.
- Higuchi, M., B. Zhang, M. S. Forman, Y. Yoshiyama, J. Q. Trojanowski, and V. M. Lee. 2005. 'Axonal degeneration induced by targeted expression of mutant human tau in oligodendrocytes of transgenic mice that model glial tauopathies', *J Neurosci*, 25: 9434-43.

- Hirokawa, N., T. Funakoshi, R. Sato-Harada, and Y. Kanai. 1996. 'Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons', *J Cell Biol*, 132: 667-79.
- Hirono, N., E. Mori, Y. Ikejiri, T. Imamura, T. Shimomura, M. Ikeda, H. Yamashita, Y. Takatsuki, A. Tokimasa, and A. Yamadori. 1997. 'Procedural memory in patients with mild Alzheimer's disease', *Dement Geriatr Cogn Disord*, 8: 210-6.
- Holler, C. J., P. R. Davis, T. L. Beckett, T. L. Platt, R. L. Webb, E. Head, and M. P. Murphy. 2014. 'Bridging integrator 1 (BIN1) protein expression increases in the Alzheimer's disease brain and correlates with neurofibrillary tangle pathology', *J Alzheimers Dis*, 42: 1221-7.
- Hollingworth, P., D. Harold, R. Sims, A. Gerrish, J. C. Lambert, M. M. Carrasquillo, R. Abraham, M. L. Hamshere, J. S. Pahwa, V. Moskvina, K. Dowzell, N. Jones, A. Stretton, C. Thomas, A. Richards, D. Ivanov, C. Widdowson, J. Chapman, S. Lovestone, J. Powell, P. Proitsi, M. K. Lupton, C. Brayne, D. C. Rubinsztein, M. Gill, B. Lawlor, A. Lynch, K. S. Brown, P. A. Passmore, D. Craig, B. McGuinness, S. Todd, C. Holmes, D. Mann, A. D. Smith, H. Beaumont, D. Warden, G. Wilcock, S. Love, P. G. Kehoe, N. M. Hooper, E. R. Vardy, J. Hardy, S. Mead, N. C. Fox, M. Rossor, J. Collinge, W. Maier, F. Jessen, E. Ruther, B. Schurmann, R. Heun, H. Kolsch, H. van den Bussche, I. Heuser, J. Kornhuber, J. Wiltfang, M. Dichgans, L. Frolich, H. Hampel, J. Gallacher, M. Hull, D. Rujescu, I. Giegling, A. M. Goate, J. S. Kauwe, C. Cruchaga, P. Nowotny, J. C. Morris, K. Mayo, K. Sleegers, K. Bettens, S. Engelborghs, P. P. De Deyn, C. Van Broeckhoven, G. Livingston, N. J. Bass, H. Gurling, A. McQuillin, R. Gwilliam, P. Deloukas, A. Al-Chalabi, C. E. Shaw, M. Tsolaki, A. B. Singleton, R. Guerreiro, T. W. Muhleisen, M. M. Nothen, S. Moebus, K. H. Jockel, N. Klopp, H. E. Wichmann, V. S. Pankratz, S. B. Sando, J. O. Aasly, M. Barcikowska, Z. K. Wszolek, D. W. Dickson, N. R. Graff-Radford, R. C. Petersen, C. M. van Duijn, M. M. Breteler, M. A. Ikram, A. L. DeStefano, A. L. Fitzpatrick, O. Lopez, L. J. Launer, S. Seshadri, C. Berr, D. Campion, J. Epelbaum, J. F. Dartigues, C. Tzourio, A. Alperovitch, M. Lathrop, T. M. Feulner, P. Friedrich, C. Riehle, M. Krawczak, S. Schreiber, M. Mayhaus, S. Nicolhaus, S. Wagenpfeil, S. Steinberg, H. Stefansson, K. Stefansson, J. Snaedal, S. Bjornsson, P. V. Jonsson, V. Chouraki, B. Genier-Boley, M. Hiltunen, H. Soininen, O. Combarros, D. Zelenika, M. Delepine, M. J. Bullido, F. Pasquier, I. Mateo, A. Frank-Garcia, E. Porcellini, O. Hanon, E. Coto, V. Alvarez, P. Bosco, G. Siciliano, M. Mancuso, F. Panza, V. Solfrizzi, B. Nacmias, S. Sorbi, P. Bossu, P. Piccardi, B. Arosio, G. Annoni, D. Seripa, A. Pilotto, E. Scarpini, D. Galimberti, A. Brice, D. Hannequin, F. Licastro, L. Jones, P. A. Holmans, T. Jonsson, M. Riemenschneider, K. Morgan, S. G. Younkin, M. J. Owen, M. O'Donovan, P. Amouyel, and J. Williams. 2011. 'Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease', *Nat Genet*, 43: 429-35.
- Holtzer, R., M. X. Tang, D. P. Devanand, S. M. Albert, D. J. Wegesin, K. Marder, K. Bell, M. Albert, J. Brandt, and Y. Stern. 2003. 'Psychopathological features in Alzheimer's disease: course and relationship with cognitive status', *J Am Geriatr Soc*, 51: 953-60.
- Hoozemans, J. J., E. S. van Haastert, D. A. Nijholt, A. J. Rozemuller, P. Eikelenboom, and W. Scheper. 2009. 'The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus', *Am J Pathol*, 174: 1241-51.
- Hoozemans, J. J., R. Veerhuis, E. S. Van Haastert, J. M. Rozemuller, F. Baas, P. Eikelenboom, and W. Scheper. 2005. 'The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathol*, 110: 165-72.
- Hostetler, E. D., A. M. Walji, Z. Zeng, P. Miller, I. Bennacef, C. Salinas, B. Connolly, L. Gantert, H. Haley, M. Holahan, M. Purcell, K. Riffel, T. G. Lohith, P. Coleman, A. Soriano, A. Ogawa, S. Xu, X. Zhang, E. Joshi, J. Della Rocca, D. Hesk, D. J. Schenk, and J. L. Evelhoch. 2016. 'Preclinical Characterization of 18F-MK-6240, a Promising PET Tracer for In Vivo Quantification of Human Neurofibrillary Tangles', *J Nucl Med*, 57: 1599-606.
- Hu, X. Y., S. Qin, Y. P. Lu, R. Ravid, D. F. Swaab, and J. N. Zhou. 2003. 'Decreased estrogen receptor-alpha expression in hippocampal neurons in relation to hyperphosphorylated tau in Alzheimer patients', *Acta Neuropathol*, 106: 213-20.



- Huber, A. B., O. Weinmann, C. Brosamle, T. Oertle, and M. E. Schwab. 2002. 'Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions', *J Neurosci*, 22: 3553-67.
- Huber, C. M., C. Yee, T. May, A. Dhanala, and C. S. Mitchell. 2018. 'Cognitive Decline in Preclinical Alzheimer's Disease: Amyloid-Beta versus Tauopathy', *J Alzheimers Dis*, 61: 265-81.
- Huntley, J. D., and R. J. Howard. 2010. 'Working memory in early Alzheimer's disease: a neuropsychological review', *Int J Geriatr Psychiatry*, 25: 121-32.
- Huser, S., G. Suri, P. Crottet, and M. Spiess. 2013. 'Interaction of amphiphysins with AP-1 clathrin adaptors at the membrane', *Biochem J*, 450: 73-83.
- Ingelsson, M., K. Ramasamy, I. Cantuti-Castelvetri, L. Skoglund, T. Matsui, J. Orne, H. Kowa, S. Raju, C. R. Vanderburg, J. C. Augustinack, R. de Silva, A. J. Lees, L. Lannfelt, J. H. Growdon, M. P. Frosch, D. G. Standaert, M. C. Irizarry, and B. T. Hyman. 2006. 'No alteration in tau exon 10 alternative splicing in tangle-bearing neurons of the Alzheimer's disease brain', *Acta Neuropathol*, 112: 439-49.
- Ittner, A., S. W. Chua, J. Bertz, A. Volkerling, J. van der Hoven, A. Gladbach, M. Przybyla, M. Bi, A. van Hummel, C. H. Stevens, S. Ippati, L. S. Suh, A. Macmillan, G. Sutherland, J. J. Kril, A. P. Silva, J. P. Mackay, A. Poljak, F. Delerue, Y. D. Ke, and L. M. Ittner. 2016. 'Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid-beta toxicity in Alzheimer's mice', *Science*, 354: 904-08.
- Iwatsubo, T., M. Hasegawa, and Y. Ihara. 1994. 'Neuronal and glial tau-positive inclusions in diverse neurologic diseases share common phosphorylation characteristics', *Acta Neuropathol*, 88: 129-36.
- Jack, C. R., Jr., H. J. Wiste, T. G. Lesnick, S. D. Weigand, D. S. Knopman, P. Vemuri, V. S. Pankratz, M. L. Senjem, J. L. Gunter, M. M. Mielke, V. J. Lowe, B. F. Boeve, and R. C. Petersen. 2013. 'Brain beta-amyloid load approaches a plateau', *Neurology*, 80: 890-6.
- Jahn, H. 2013. 'Memory loss in Alzheimer's disease', *Dialogues Clin Neurosci*, 15: 445-54.
- Johnson, E. C. B., E. B. Dammer, D. M. Duong, L. Yin, M. Thambisetty, J. C. Troncoso, J. J. Lah, A. I. Levey, and N. T. Seyfried. 2018. 'Deep proteomic network analysis of Alzheimer's disease brain reveals alterations in RNA binding proteins and RNA splicing associated with disease', *Mol Neurodegener*, 13: 52.
- Jones, M. W., and T. J. McHugh. 2011. 'Updating hippocampal representations: CA2 joins the circuit', *Trends Neurosci*, 34: 526-35.
- Jozsef, L., K. Tashiro, A. Kuo, E. J. Park, A. Skoura, S. Albinsson, F. Rivera-Molina, K. D. Harrison, Y. Iwakiri, D. Toomre, and W. C. Sessa. 2014. 'Reticulon 4 is necessary for endoplasmic reticulum tubulation, STIM1-Orai1 coupling, and store-operated calcium entry', *J Biol Chem*, 289: 9380-95.
- Jul, P., C. Volbracht, I. E. de Jong, L. Helboe, A. B. Elvang, and J. T. Pedersen. 2016. 'Hyperactivity with Agitative-Like Behavior in a Mouse Tauopathy Model', *J Alzheimers Dis*, 49: 783-95.
- Jun, G., C. A. Ibrahim-Verbaas, M. Vronskaya, J. C. Lambert, J. Chung, A. C. Naj, B. W. Kunkle, L. S. Wang, J. C. Bis, C. Bellenguez, D. Harold, K. L. Lunetta, A. L. Destefano, B. Grenier-Boley, R. Sims, G. W. Beecham, A. V. Smith, V. Chouraki, K. L. Hamilton-Nelson, M. A. Ikram, N. Fievet, N. Denning, E. R. Martin, H. Schmidt, Y. Kamatani, M. L. Dunstan, O. Valladares, A. R. Laza, D. Zelenika, A. Ramirez, T. M. Foroud, S. H. Choi, A. Boland, T. Becker, W. A. Kukull, S. J. van der Lee, F. Pasquier, C. Cruchaga, D. Beekly, A. L. Fitzpatrick, O. Hanon, M. Gill, R. Barber, V. Gudnason, D. Campion, S. Love, D. A. Bennett, N. Amin, C. Berr, M. Tsolaki, J. D. Buxbaum, O. L. Lopez, V. Deramecourt, N. C. Fox, L. B. Cantwell, L. Tarraga, C. Dufouil, J. Hardy, P. K. Crane, G. Eiriksdottir, D. Hannequin, R. Clarke, D. Evans, T. H. Mosley, Jr., L. Letenneur, C. Brayne, W. Maier, P. De Jager, V. Emilsson, J. F. Dartigues, H. Hampel, M. I. Kamboh, R. F. de Bruijn, C. Tzourio, P. Pastor, E. B. Larson, J. I. Rotter, M. C. O'Donovan, T. J. Montine, M. A. Nalls, S. Mead, E. M. Reiman, P. V. Jonsson, C. Holmes, P. H. St George-Hyslop, M. Boada, P. Passmore, J. R. Wendland, R. Schmidt, K. Morgan, A. R. Winslow, J. F. Powell, M. Carasquillo, S. G. Younkin, J. Jakobsdottir, J. S. Kauwe, K. C. Wilhelmsen, D. Rujescu, M. M. Nothen, A. Hofman, L. Jones, Igap Consortium, J. L. Haines, B. M. Psaty, C. Van Broeckhoven, P. Holmans, L. J. Launer, R.

- Mayeux, M. Lathrop, A. M. Goate, V. Escott-Price, S. Seshadri, M. A. Pericak-Vance, P. Amouyel, J. Williams, C. M. van Duijn, G. D. Schellenberg, and L. A. Farrer. 2016. 'A novel Alzheimer disease locus located near the gene encoding tau protein', *Mol Psychiatry*, 21: 108-17.
- Kaech, S., and G. Banker. 2006. 'Culturing hippocampal neurons', *Nat Protoc*, 1: 2406-15.
- Kaltschmidt, B., C. Kaltschmidt, T. G. Hofmann, S. P. Hehner, W. Droge, and M. L. Schmitz. 2000. 'The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus', *Eur J Biochem*, 267: 3828-35.
- Kamagata, E., T. Kudo, R. Kimura, H. Tanimukai, T. Morihara, M. G. Sadik, K. Kamino, and M. Takeda. 2009. 'Decrease of dynamin 2 levels in late-onset Alzheimer's disease alters Abeta metabolism', *Biochem Biophys Res Commun*, 379: 691-5.
- Karnezis, T., W. Mandemakers, J. L. McQualter, B. Zheng, P. P. Ho, K. A. Jordan, B. M. Murray, B. Barres, M. Tessier-Lavigne, and C. C. Bernard. 2004. 'The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination', *Nat Neurosci*, 7: 736-44.
- Keene, C. S., J. Bladon, S. McKenzie, C. D. Liu, J. O'Keefe, and H. Eichenbaum. 2016. 'Complementary Functional Organization of Neuronal Activity Patterns in the Perirhinal, Lateral Entorhinal, and Medial Entorhinal Cortices', *J Neurosci*, 36: 3660-75.
- Kempf, M., A. Clement, A. Faissner, G. Lee, and R. Brandt. 1996. 'Tau binds to the distal axon early in development of polarity in a microtubule- and microfilament-dependent manner', *J Neurosci*, 16: 5583-92.
- Kessels, M. M., and B. Qualmann. 2015. 'Different functional modes of BAR domain proteins in formation and plasticity of mammalian postsynapses', *J Cell Sci*, 128: 3177-85.
- Kim, J., J. M. Basak, and D. M. Holtzman. 2009. 'The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease', *Neuron*, 63: 287-303.
- Kirchhoff, M., A. M. Bisgaard, M. Duno, F. J. Hansen, and M. Schwartz. 2007. 'A 17q21.31 microduplication, reciprocal to the newly described 17q21.31 microdeletion, in a girl with severe psychomotor developmental delay and dysmorphic craniofacial features', *Eur J Med Genet*, 50: 256-63.
- Kiseleva, E., K. N. Morozova, G. K. Voeltz, T. D. Allen, and M. W. Goldberg. 2007. 'Reticulon 4a/NogoA locates to regions of high membrane curvature and may have a role in nuclear envelope growth', *J Struct Biol*, 160: 224-35.
- Klur, S., C. Muller, A. Pereira de Vasconcelos, T. Ballard, J. Lopez, R. Galani, U. Certa, and J. C. Cassel. 2009. 'Hippocampal-dependent spatial memory functions might be lateralized in rats: An approach combining gene expression profiling and reversible inactivation', *Hippocampus*, 19: 800-16.
- Knibb, J. A., C. M. Kipps, and J. R. Hodges. 2006. 'Frontotemporal dementia', *Curr Opin Neurol*, 19: 565-71.
- Knierim, J. J. 2015. 'The hippocampus', *Curr Biol*, 25: R1116-21.
- Koo, Y. J., S. J. Kim, S. H. Jeon, S. R. Kim, U. G. Kang, J. B. Park, and Y. S. Kim. 2002. 'Electroconvulsive shock increases the phosphorylation of amphiphysin II in the rat cerebellum', *Neurosci Lett*, 330: 135-8.
- Koolen, D. A., L. E. Vissers, R. Pfundt, N. de Leeuw, S. J. Knight, R. Regan, R. F. Kooy, E. Reyniers, C. Romano, M. Fichera, A. Schinzel, A. Baumer, B. M. Anderlid, J. Schoumans, N. V. Knoers, A. G. van Kessel, E. A. Sistermans, J. A. Veltman, H. G. Brunner, and B. B. de Vries. 2006. 'A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism', *Nat Genet*, 38: 999-1001.
- Lai, C. K., and D. G. Arthur. 2003. 'Wandering behaviour in people with dementia', *J Adv Nurs*, 44: 173-82.
- Lambert, J. C., and P. Amouyel. 2010. 'Deciphering genetic susceptibility to frontotemporal lobar dementia', *Nat Genet*, 42: 189-90.
- Lambert, J. C., S. Heath, G. Even, D. Campion, K. Sleegers, M. Hiltunen, O. Combarros, D. Zelenika, M. J. Bullido, B. Tavernier, L. Letenneur, K. Bettens, C. Berr, F. Pasquier, N. Fievet, P. Barberger-Gateau, S. Engelborghs, P. De Deyn, I. Mateo, A. Franck, S. Helisalmi, E. Porcellini, O. Hanon,

- M. M. de Pancorbo, C. Lendon, C. Dufouil, C. Jaillard, T. Leveillard, V. Alvarez, P. Bosco, M. Mancuso, F. Panza, B. Nacmias, P. Bossu, P. Piccardi, G. Annoni, D. Seripa, D. Galimberti, D. Hannequin, F. Licastro, H. Soininen, K. Ritchie, H. Blanche, J. F. Dartigues, C. Tzourio, I. Gut, C. Van Broeckhoven, A. Alperovitch, M. Lathrop, and P. Amouyel. 2009. 'Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease', *Nat Genet*, 41: 1094-9.
- Lambert, J. C., C. A. Ibrahim-Verbaas, D. Harold, A. C. Naj, R. Sims, C. Bellenguez, A. L. DeStafano, J. C. Bis, G. W. Beecham, B. Grenier-Boley, G. Russo, T. A. Thornton-Wells, N. Jones, A. V. Smith, V. Chouraki, C. Thomas, M. A. Ikram, D. Zelenika, B. N. Vardarajan, Y. Kamatani, C. F. Lin, A. Gerrish, H. Schmidt, B. Kunkle, M. L. Dunstan, A. Ruiz, M. T. Bihoreau, S. H. Choi, C. Reitz, F. Pasquier, C. Cruchaga, D. Craig, N. Amin, C. Berr, O. L. Lopez, P. L. De Jager, V. Deramecourt, J. A. Johnston, D. Evans, S. Lovestone, L. Letenneur, F. J. Moron, D. C. Rubinsztein, G. Eiriksdottir, K. Sleegers, A. M. Goate, N. Fievet, M. W. Huentelman, M. Gill, K. Brown, M. I. Kamboh, L. Keller, P. Barberger-Gateau, B. McGuinness, E. B. Larson, R. Green, A. J. Myers, C. Dufouil, S. Todd, D. Wallon, S. Love, E. Rogaeva, J. Gallacher, P. St George-Hyslop, J. Clarimon, A. Lleo, A. Bayer, D. W. Tsuang, L. Yu, M. Tsolaki, P. Bossu, G. Spalletta, P. Proitsi, J. Collinge, S. Sorbi, F. Sanchez-Garcia, N. C. Fox, J. Hardy, M. C. Deniz Naranjo, P. Bosco, R. Clarke, C. Brayne, D. Galimberti, M. Mancuso, F. Matthews, S. Moebus, P. Mecocci, M. Del Zompo, W. Maier, H. Hampel, A. Pilotto, M. Bullido, F. Panza, P. Caffarra, B. Nacmias, J. R. Gilbert, M. Mayhaus, L. Lannefelt, H. Hakonarson, S. Pichler, M. M. Carrasquillo, M. Ingelsson, D. Beekly, V. Alvarez, F. Zou, O. Valladares, S. G. Younkin, E. Coto, K. L. Hamilton-Nelson, W. Gu, C. Razquin, P. Pastor, I. Mateo, M. J. Owen, K. M. Faber, P. V. Jonsson, O. Combarros, M. C. O'Donovan, L. B. Cantwell, H. Soininen, D. Blacker, S. Mead, T. H. Mosley, Jr., D. A. Bennett, T. B. Harris, L. Fratiglioni, C. Holmes, R. F. de Bruijn, P. Passmore, T. J. Montine, K. Bettens, J. I. Rotter, A. Brice, K. Morgan, T. M. Foroud, W. A. Kukull, D. Hannequin, J. F. Powell, M. A. Nalls, K. Ritchie, K. L. Lunetta, J. S. Kauwe, E. Boerwinkle, M. Riemenschneider, M. Boada, M. Hiltunen, E. R. Martin, R. Schmidt, D. Rujescu, L. S. Wang, J. F. Dartigues, R. Mayeux, C. Tzourio, A. Hofman, M. M. Nothen, C. Graff, B. M. Psaty, L. Jones, J. L. Haines, P. A. Holmans, M. Lathrop, M. A. Pericak-Vance, L. J. Launer, L. A. Farrer, C. M. van Duijn, C. Van Broeckhoven, V. Moskvina, S. Seshadri, J. Williams, G. D. Schellenberg, and P. Amouyel. 2013. 'Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease', *Nat Genet*, 45: 1452-8.
- Le Guennec, K., O. Quenez, G. Nicolas, D. Wallon, S. Rousseau, A. C. Richard, J. Alexander, P. Paschou, C. Charbonnier, C. Bellenguez, B. Grenier-Boley, D. Lechner, M. T. Bihoreau, R. Olaso, A. Boland, V. Meyer, J. F. Deleuze, P. Amouyel, H. M. Munter, G. Bourque, M. Lathrop, T. Frebourg, R. Redon, L. Letenneur, J. F. Dartigues, O. Martinaud, O. Kalev, S. Mehrabian, L. Traykov, T. Strobel, I. Le Ber, P. Caroppo, S. Epelbaum, T. Jonveaux, F. Pasquier, A. Rollin-Sillaire, E. Genin, L. Guyant-Marechal, G. G. Kovacs, J. C. Lambert, D. Hannequin, D. Campion, and A. Rovelet-Lecrux. 2017. '17q21.31 duplication causes prominent tau-related dementia with increased MAPT expression', *Mol Psychiatry*, 22: 1119-25.
- Leighton, P. L., and W. T. Allison. 2016. 'Protein Misfolding in Prion and Prion-Like Diseases: Reconsidering a Required Role for Protein Loss-of-Function', *J Alzheimers Dis*, 54: 3-29.
- Leprince, C., F. Romero, D. Cussac, B. Vayssiere, R. Berger, A. Tavitian, and J. H. Camonis. 1997. 'A new member of the amphiphysin family connecting endocytosis and signal transduction pathways', *J Biol Chem*, 272: 15101-5.
- Leventis, P. A., B. M. Chow, B. A. Stewart, B. Iyengar, A. R. Campos, and G. L. Boulianne. 2001. 'Drosophila Amphiphysin is a post-synaptic protein required for normal locomotion but not endocytosis', *Traffic*, 2: 839-50.
- Li, J. Q., J. T. Yu, T. Jiang, and L. Tan. 2015. 'Endoplasmic reticulum dysfunction in Alzheimer's disease', *Mol Neurobiol*, 51: 383-95.
- Li, X., Y. Kumar, H. Zempel, E. M. Mandelkow, J. Biernat, and E. Mandelkow. 2011. 'Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration', *EMBO J*, 30: 4825-37.

- Lindwall, G., and R. D. Cole. 1984. 'Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly', *J Biol Chem*, 259: 5301-5.
- Liu, C. W., G. Lee, and D. G. Jay. 1999. 'Tau is required for neurite outgrowth and growth cone motility of chick sensory neurons', *Cell Motil Cytoskeleton*, 43: 232-42.
- Lloret, A., M. C. Badia, N. J. Mora, A. Ortega, F. V. Pallardo, M. D. Alonso, H. Atamna, and J. Vina. 2008. 'Gender and age-dependent differences in the mitochondrial apoptogenic pathway in Alzheimer's disease', *Free Radic Biol Med*, 44: 2019-25.
- Long, K., C. Mohan, J. Anderl, K. Huryn-Selvar, H. Liu, K. Su, M. Santos, M. Hsu, L. Armstrong, and J. Ma. 2015. 'Analysis of autophagosome formation using lentiviral biosensors for live fluorescent cellular imaging', *Methods Mol Biol*, 1219: 157-69.
- Long, X., L. Zhang, W. Liao, C. Jiang, B. Qiu, and Initiative Alzheimer's Disease Neuroimaging. 2013. 'Distinct laterality alterations distinguish mild cognitive impairment and Alzheimer's disease from healthy aging: statistical parametric mapping with high resolution MRI', *Hum Brain Mapp*, 34: 3400-10.
- Loomis, P. A., T. H. Howard, R. P. Castleberry, and L. I. Binder. 1990. 'Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 8422-6.
- Loureiro, M., L. Lecourtier, M. Engeln, J. Lopez, B. Cosquer, K. Geiger, C. Kelche, J. C. Cassel, and A. Pereira de Vasconcelos. 2012. 'The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory', *Brain Struct Funct*, 217: 93-106.
- Lyketsos, C. G., M. C. Carrillo, J. M. Ryan, A. S. Khachaturian, P. Trzepacz, J. Amatniek, J. Cedarbaum, R. Brashear, and D. S. Miller. 2011. 'Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease', *Alzheimers Dement*, 7: 532-9.
- Malhotra, J. D., and R. J. Kaufman. 2007. 'The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response', *Semin Cell Dev Biol*, 18: 716-31.
- Malki, I., F. X. Cantrelle, Y. Sottejeau, G. Lippens, J. C. Lambert, and I. Landrieu. 2017. 'Regulation of the interaction between the neuronal BIN1 isoform 1 and Tau proteins - role of the SH3 domain', *Febs j*, 284: 3218-29.
- Mandelkow, E. M., and E. Mandelkow. 2012. 'Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2: a006247.
- Mao, N. C., E. Steingrimsson, J. DuHadaway, W. Wasserman, J. C. Ruiz, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, and G. C. Prendergast. 1999. 'The murine Bin1 gene functions early in myogenesis and defines a new region of synteny between mouse chromosome 18 and human chromosome 2', *Genomics*, 56: 51-8.
- Martinez-Canabal, A. 2014. 'Reconsidering hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease', *Front Neurosci*, 8: 147.
- Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald, and K. Beyreuther. 1985. 'Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 4245-9.
- McHugh, T. J., M. W. Jones, J. J. Quinn, N. Balthasar, R. Coppari, J. K. Elmquist, B. B. Lowell, M. S. Fanselow, M. A. Wilson, and S. Tonegawa. 2007. 'Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network', *Science*, 317: 94-9.
- McKenzie, A. T., S. Moyon, M. Wang, I. Katsyv, W. M. Song, X. Zhou, E. B. Dammer, D. M. Duong, J. Aaker, Y. Zhao, N. Beckmann, P. Wang, J. Zhu, J. J. Lah, N. T. Seyfried, A. I. Levey, P. Katsel, V. Haroutunian, E. E. Schadt, B. Popko, P. Casaccia, and B. Zhang. 2017. 'Multiscale network modeling of oligodendrocytes reveals molecular components of myelin dysregulation in Alzheimer's disease', *Mol Neurodegener*, 12: 82.
- McMillan, P., E. Korvatska, P. Poorkaj, Z. Evstafjeva, L. Robinson, L. Greenup, J. Leverenz, G. D. Schellenberg, and I. D'Souza. 2008. 'Tau isoform regulation is region- and cell-specific in mouse brain', *J Comp Neurol*, 511: 788-803.
- Meffert, M. K., J. M. Chang, B. J. Wiltgen, M. S. Fanselow, and D. Baltimore. 2003. 'NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior', *Nat Neurosci*, 6: 1072-8.

- Meunier, B., M. Quaranta, L. Daviet, A. Hatzoglou, and C. Leprince. 2009. 'The membrane-tubulating potential of amphiphysin 2/BIN1 is dependent on the microtubule-binding cytoplasmic linker protein 170 (CLIP-170)', *Eur J Cell Biol*, 88: 91-102.
- Micheva, K. D., B. K. Kay, and P. S. McPherson. 1997. 'Synaptojanin forms two separate complexes in the nerve terminal. Interactions with endophilin and amphiphysin', *J Biol Chem*, 272: 27239-45.
- Mielke, M. M., N. A. Kozauer, K. C. Chan, M. George, J. Toroney, M. Zerrate, K. Bandeen-Roche, M. C. Wang, P. Vanzijl, J. J. Pekar, S. Mori, C. G. Lyketsos, and M. Albert. 2009. 'Regionally-specific diffusion tensor imaging in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease', *Neuroimage*, 46: 47-55.
- Mietelska-Porowska, A., U. Wasik, M. Goras, A. Filipek, and G. Niewiadomska. 2014. 'Tau protein modifications and interactions: their role in function and dysfunction', *Int J Mol Sci*, 15: 4671-713.
- Miyagawa, T., I. Ebinuma, Y. Morohashi, Y. Hori, M. Young Chang, H. Hattori, T. Maehara, S. Yokoshima, T. Fukuyama, S. Tsuji, T. Iwatsubo, G. C. Prendergast, and T. Tomita. 2016. 'BIN1 regulates BACE1 intracellular trafficking and amyloid-beta production', *Hum Mol Genet*, 25: 2948-58.
- Mogenson, G. J., D. L. Jones, and C. Y. Yim. 1980. 'From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system', *Prog Neurobiol*, 14: 69-97.
- Montagner, Caroline. 2007. 'Approche biophysique de l'étude de l'insertion du domaine de translocation de la toxine botulique dans les membranes', *Thèse en biologie structurale et nanobiologie*.
- Morici, J. F., P. Bekinschtein, and N. V. Weisstaub. 2015. 'Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents', *Behav Brain Res*, 292: 241-51.
- Morishima-Kawashima, M., M. Hasegawa, K. Takio, M. Suzuki, K. Titani, and Y. Ihara. 1993. 'Ubiquitin is conjugated with amino-terminally processed tau in paired helical filaments', *Neuron*, 10: 1151-60.
- Morita, T., and K. Sobue. 2009. 'Specification of neuronal polarity regulated by local translation of CRMP2 and Tau via the mTOR-p70S6K pathway', *J Biol Chem*, 284: 27734-45.
- Morris, R. G., E. Anderson, G. S. Lynch, and M. Baudry. 1986. 'Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5', *Nature*, 319: 774-6.
- Moscovitch, M., R. Cabeza, G. Winocur, and L. Nadel. 2016. 'Episodic Memory and Beyond: The Hippocampus and Neocortex in Transformation', *Annu Rev Psychol*, 67: 105-34.
- Moser, D. A., G. E. Doucet, A. Ing, D. Dima, G. Schumann, R. M. Bilder, and S. Frangou. 2017. 'An integrated brain-behavior model for working memory', *Mol Psychiatry*.
- Muller, A. J., J. F. Baker, J. B. DuHadaway, K. Ge, G. Farmer, P. S. Donover, R. Meade, C. Reid, R. Grzanna, A. H. Roach, N. Shah, A. P. Soler, and G. C. Prendergast. 2003. 'Targeted disruption of the murine Bin1/Amphiphysin II gene does not disable endocytosis but results in embryonic cardiomyopathy with aberrant myofibril formation', *Mol Cell Biol*, 23: 4295-306.
- Mundigl, O., G. C. Ochoa, C. David, V. I. Slepnev, A. Kabanov, and P. De Camilli. 1998. 'Amphiphysin I antisense oligonucleotides inhibit neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons', *J Neurosci*, 18: 93-103.
- Munn, A. L., B. J. Stevenson, M. I. Geli, and H. Riezman. 1995. 'end5, end6, and end7: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*', *Mol Biol Cell*, 6: 1721-42.
- Natunen, T., A. R. Parrado, S. Helisalmi, J. P. Pursiheimo, T. Sarajarvi, P. Makinen, K. M. Kurkinen, K. Mullin, I. Alafuzoff, A. Haapasalo, L. Bertram, H. Soininen, R. E. Tanzi, and M. Hiltunen. 2013. 'Elucidation of the BACE1 regulating factor GGA3 in Alzheimer's disease', *J Alzheimers Dis*, 37: 217-32.
- Nelson, J. F., and L. S. Felicio. 1990. 'Hormonal influences on reproductive aging in mice', *Ann N Y Acad Sci*, 592: 8-12; discussion 44-51.

- Nelson, J. F., L. S. Felicio, P. K. Randall, C. Sims, and C. E. Finch. 1982. 'A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology', *Biol Reprod*, 27: 327-39.
- Nelson, J. F., K. R. Latham, and C. E. Finch. 1975. 'Plasma testosterone levels in C57BL/6J male mice: effects of age and disease', *Acta Endocrinol (Copenh)*, 80: 744-52.
- Nelson, P. T., I. Alafuzoff, E. H. Bigio, C. Bouras, H. Braak, N. J. Cairns, R. J. Castellani, B. J. Crain, P. Davies, K. Del Tredici, C. Duyckaerts, M. P. Frosch, V. Haroutunian, P. R. Hof, C. M. Hulette, B. T. Hyman, T. Iwatsubo, K. A. Jellinger, G. A. Jicha, E. Kovari, W. A. Kukull, J. B. Leverenz, S. Love, I. R. Mackenzie, D. M. Mann, E. Masliah, A. C. McKee, T. J. Montine, J. C. Morris, J. A. Schneider, J. A. Sonnen, D. R. Thal, J. Q. Trojanowski, J. C. Troncoso, T. Wisniewski, R. L. Woltjer, and T. G. Beach. 2012. 'Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature', *J Neuropathol Exp Neurol*, 71: 362-81.
- Nicot, A. S., A. Toussaint, V. Tosch, C. Kretz, C. Wallgren-Pettersson, E. Iwarsson, H. Kingston, J. M. Garnier, V. Biancalana, A. Oldfors, J. L. Mandel, and J. Laporte. 2007. 'Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy', *Nat Genet*, 39: 1134-9.
- Nowrangi, M. A., and P. B. Rosenberg. 2015. 'The fornix in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease', *Front Aging Neurosci*, 7: 1.
- O'Brien, R. J., and P. C. Wong. 2011. 'Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease', *Annu Rev Neurosci*, 34: 185-204.
- O'Keefe, J., and J. Dostrovsky. 1971. 'The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat', *Brain Res*, 34: 171-5.
- O'Neill, J., T. Senior, and J. Csicsvari. 2006. 'Place-selective firing of CA1 pyramidal cells during sharp wave/ripple network patterns in exploratory behavior', *Neuron*, 49: 143-55.
- Oertle, T., and M. E. Schwab. 2003. 'Nogo and its paRTNers', *Trends Cell Biol*, 13: 187-94.
- Oertle, T., M. E. van der Haar, C. E. Bandtlow, A. Robeva, P. Burfeind, A. Buss, A. B. Huber, M. Simonen, L. Schnell, C. Brosamle, K. Kaupmann, R. Vallon, and M. E. Schwab. 2003. 'Nogo-A inhibits neurite outgrowth and cell spreading with three discrete regions', *J Neurosci*, 23: 5393-406.
- Olarte-Sanchez, C. M., E. Amin, E. C. Warburton, and J. P. Aggleton. 2015. 'Perirhinal cortex lesions impair tests of object recognition memory but spare novelty detection', *Eur J Neurosci*, 42: 3117-27.
- Ossola, B., C. Zhao, A. Compston, S. Pluchino, R. J. Franklin, and M. G. Spillantini. 2016. 'Neuronal expression of pathological tau accelerates oligodendrocyte progenitor cell differentiation', *Glia*, 64: 457-71.
- Pascoal, T. A., M. Shin, M. S. Kang, M. Chamoun, D. Chartrand, S. Mathotaarachchi, I. Bennacef, J. Therriault, K. P. Ng, R. Hopewell, R. Bouhachi, H. H. Hsiao, A. L. Benedet, J. P. Soucy, G. Massarweh, S. Gauthier, and P. Rosa-Neto. 2018. 'In vivo quantification of neurofibrillary tangles with [(18)F]MK-6240', *Alzheimers Res Ther*, 10: 74.
- Pause, B. M., A. Zlomuzica, K. Kinugawa, J. Mariani, R. Pietrowsky, and E. Dere. 2013. 'Perspectives on episodic-like and episodic memory', *Front Behav Neurosci*, 7: 33.
- Pavlova, A., C. Y. Cheng, M. Kinnebrew, J. Lew, F. W. Dahlquist, and S. Han. 2016. 'Protein structural and surface water rearrangement constitute major events in the earliest aggregation stages of tau', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: E127-36.
- Pernet, V., S. Joly, F. Christ, L. Dimou, and M. E. Schwab. 2008. 'Nogo-A and myelin-associated glycoprotein differently regulate oligodendrocyte maturation and myelin formation', *J Neurosci*, 28: 7435-44.
- Petersen, R. C., G. E. Smith, S. C. Waring, R. J. Ivnik, E. G. Tangalos, and E. Kokmen. 1999. 'Mild cognitive impairment: clinical characterization and outcome', *Arch Neurol*, 56: 303-8.
- Picas, L., J. Viaud, K. Schauer, S. Vanni, K. Hnia, V. Fraissier, A. Roux, P. Bassereau, F. Gaits-Iacovoni, B. Payrastre, J. Laporte, J. B. Manneville, and B. Goud. 2014. 'BIN1/M-Amphiphysin2 induces clustering of phosphoinositides to recruit its downstream partner dynamin', *Nat Commun*, 5: 5647.

- Polydoro, M., C. M. Acker, K. Duff, P. E. Castillo, and P. Davies. 2009. 'Age-dependent impairment of cognitive and synaptic function in the htau mouse model of tau pathology', *J Neurosci*, 29: 10741-9.
- Poorkaj, P., A. Kas, I. D'Souza, Y. Zhou, Q. Pham, M. Stone, M. V. Olson, and G. D. Schellenberg. 2001. 'A genomic sequence analysis of the mouse and human microtubule-associated protein tau', *Mamm Genome*, 12: 700-12.
- Pot, C., M. Simonen, O. Weinmann, L. Schnell, F. Christ, S. Stoeckle, P. Berger, T. Rulicke, U. Suter, and M. E. Schwab. 2002. 'Nogo-A expressed in Schwann cells impairs axonal regeneration after peripheral nerve injury', *J Cell Biol*, 159: 29-35.
- Povellato, G., R. I. Tuxworth, D. P. Hanger, and G. Tear. 2014. 'Modification of the Drosophila model of in vivo Tau toxicity reveals protective phosphorylation by GSK3beta', *Biol Open*, 3: 1-11.
- Prince, M., R. Bryce, E. Albanese, A. Wimo, W. Ribeiro, and C. P. Ferri. 2013. 'The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis', *Alzheimers Dement*, 9: 63-75.e2.
- Prinjha, R., S. E. Moore, M. Vinson, S. Blake, R. Morrow, G. Christie, D. Michalovich, D. L. Simmons, and F. S. Walsh. 2000. 'Inhibitor of neurite outgrowth in humans', *Nature*, 403: 383-4.
- Prokic, I., B. S. Cowling, and J. Laporte. 2014. 'Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases', *J Mol Med (Berl)*, 92: 453-63.
- Qi, H., S. Prabakaran, F. X. Cantrelle, B. Chambraud, J. Gunawardena, G. Lippens, and I. Landrieu. 2016. 'Characterization of Neuronal Tau Protein as a Target of Extracellular Signal-regulated Kinase', *J Biol Chem*, 291: 7742-53.
- Raiker, S. J., H. Lee, K. T. Baldwin, Y. Duan, P. Shrager, and R. J. Giger. 2010. 'Oligodendrocyte-myelin glycoprotein and Nogo negatively regulate activity-dependent synaptic plasticity', *J Neurosci*, 30: 12432-45.
- Raj, B., and B. J. Blencowe. 2015. 'Alternative Splicing in the Mammalian Nervous System: Recent Insights into Mechanisms and Functional Roles', *Neuron*, 87: 14-27.
- Ramjaun, A. R., and P. S. McPherson. 1998. 'Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites', *J Neurochem*, 70: 2369-76.
- Ramjaun, A. R., K. D. Micheva, I. Bouchelet, and P. S. McPherson. 1997. 'Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform', *J Biol Chem*, 272: 16700-6.
- Ratray, I., E. Smith, R. Gale, K. Matsumoto, G. P. Bates, and M. Modo. 2013. 'Correlations of behavioral deficits with brain pathology assessed through longitudinal MRI and histopathology in the R6/2 mouse model of HD', *PLoS One*, 8: e60012.
- Ratray, I., E. J. Smith, W. R. Crum, T. A. Walker, R. Gale, G. P. Bates, and M. Modo. 2017. 'Correlations of Behavioral Deficits with Brain Pathology Assessed through Longitudinal MRI and Histopathology in the HdhQ150/Q150 Mouse Model of Huntington's Disease', *PLoS One*, 12: e0168556.
- Reider, A., and B. Wendland. 2011. 'Endocytic adaptors--social networking at the plasma membrane', *J Cell Sci*, 124: 1613-22.
- Reindl, M., S. Khantane, R. Ehling, K. Schanda, A. Lutterotti, C. Brinkhoff, T. Oertle, M. E. Schwab, F. Deisenhammer, T. Berger, and C. E. Bandtlow. 2003. 'Serum and cerebrospinal fluid antibodies to Nogo-A in patients with multiple sclerosis and acute neurological disorders', *J Neuroimmunol*, 145: 139-47.
- Ren, G., P. Vajjhala, J. S. Lee, B. Winsor, and A. L. Munn. 2006. 'The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy', *Microbiol Mol Biol Rev*, 70: 37-120.
- Richter-Landsberg, C. 2016. 'Protein aggregate formation in oligodendrocytes: tau and the cytoskeleton at the intersection of neuroprotection and neurodegeneration', *Biol Chem*, 397: 185-94.
- Ridge, P. G., K. B. Hoyt, K. Boehme, S. Mukherjee, P. K. Crane, J. L. Haines, R. Mayeux, L. A. Farrer, M. A. Pericak-Vance, G. D. Schellenberg, J. S. K. Kauwe, and Consortium Alzheimer's Disease

- Genetics. 2016. 'Assessment of the genetic variance of late-onset Alzheimer's disease', *Neurobiol Aging*, 41: 200 e13-00 e20.
- Ringman, J. M., J. O'Neill, D. Geschwind, L. Medina, L. G. Apostolova, Y. Rodriguez, B. Schaffer, A. Varpetian, B. Tseng, F. Ortiz, J. Fitten, J. L. Cummings, and G. Bartzokis. 2007. 'Diffusion tensor imaging in preclinical and presymptomatic carriers of familial Alzheimer's disease mutations', *Brain*, 130: 1767-76.
- Rossi, G., L. Dalpra, F. Crosti, S. Lissoni, F. L. Sciacca, M. Catania, G. Di Fede, M. Mangieri, G. Giaccone, D. Croci, and F. Tagliavini. 2008. 'A new function of microtubule-associated protein tau: involvement in chromosome stability', *Cell Cycle*, 7: 1788-94.
- Royer, B., K. Hnia, C. Gavriilidis, H. Tronchere, V. Tosch, and J. Laporte. 2013. 'The myotubularin-amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies', *EMBO Rep*, 14: 907-15.
- Sakamuro, D., K. J. Elliott, R. Wechsler-Reya, and G. C. Prendergast. 1996. 'BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor', *Nat Genet*, 14: 69-77.
- Saksela, K., and P. Permi. 2012. 'SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity?', *FEBS Lett*, 586: 2609-14.
- Salat, D. H., D. S. Tuch, A. J. van der Kouwe, D. N. Greve, V. Pappu, S. Y. Lee, N. D. Hevelone, A. K. Zaleta, J. H. Growdon, S. Corkin, B. Fischl, and H. D. Rosas. 2010. 'White matter pathology isolates the hippocampal formation in Alzheimer's disease', *Neurobiol Aging*, 31: 244-56.
- Santacruz, K., J. Lewis, T. Spires, J. Paulson, L. Kotilinek, M. Ingelsson, A. Guimaraes, M. DeTure, M. Ramsden, E. McGowan, C. Forster, M. Yue, J. Orne, C. Janus, A. Mariash, M. Kuskowski, B. Hyman, M. Hutton, and K. H. Ashe. 2005. 'Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function', *Science*, 309: 476-81.
- Schachter, A. S., and K. L. Davis. 2000. 'Alzheimer's Disease', *Curr Treat Options Neurol*, 2: 51-60.
- Schmidt, A. F., P. S. Kannan, C. A. Chougnet, S. C. Danzer, L. A. Miller, A. H. Jobe, and S. G. Kallapur. 2016. 'Intra-amniotic LPS causes acute neuroinflammation in preterm rhesus macaques', *J Neuroinflammation*, 13: 238.
- Schoch, K. M., S. L. DeVos, R. L. Miller, S. J. Chun, M. Norrbom, D. F. Wozniak, H. N. Dawson, C. F. Bennett, F. Rigo, and T. M. Miller. 2016. 'Increased 4R-Tau Induces Pathological Changes in a Human-Tau Mouse Model', *Neuron*, 90: 941-7.
- Schwarz, D. S., and M. D. Blower. 2016. 'The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling', *Cell Mol Life Sci*, 73: 79-94.
- Seiberlich, V., N. G. Bauer, L. Schwarz, C. Ffrench-Constant, O. Goldbaum, and C. Richter-Landsberg. 2015. 'Downregulation of the microtubule associated protein tau impairs process outgrowth and myelin basic protein mRNA transport in oligodendrocytes', *Glia*, 63: 1621-35.
- Sergeant, N., A. Bretteville, M. Hamdane, M. L. Caillet-Boudin, P. Grognet, S. Bombois, D. Blum, A. Delacourte, F. Pasquier, E. Vanmechelen, S. Schraen-Maschke, and L. Buee. 2008. 'Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders', *Expert Rev Proteomics*, 5: 207-24.
- Sergeant, N., A. Delacourte, and L. Buee. 2005. 'Tau protein as a differential biomarker of tauopathies', *Biochim Biophys Acta*, 1739: 179-97.
- Shalizi, A. K., and A. Bonni. 2005. 'brawn for brains: the role of MEF2 proteins in the developing nervous system', *Curr Top Dev Biol*, 69: 239-66.
- Sherwin, B. B. 2012. 'Estrogen and cognitive functioning in women: lessons we have learned', *Behav Neurosci*, 126: 123-7.
- Shibata, Y., G. K. Voeltz, and T. A. Rapoport. 2006. 'Rough sheets and smooth tubules', *Cell*, 126: 435-9.
- Shibata, Y., C. Voss, J. M. Rist, J. Hu, T. A. Rapoport, W. A. Prinz, and G. K. Voeltz. 2008. 'The reticulon and DP1/Yop1p proteins form immobile oligomers in the tubular endoplasmic reticulum', *J Biol Chem*, 283: 18892-904.
- Shpetner, H. S., J. S. Herskovits, and R. B. Vallee. 1996. 'A binding site for SH3 domains targets dynamin to coated pits', *J Biol Chem*, 271: 13-6.



- Shulman, J. M., P. Chipendo, L. B. Chibnik, C. Aubin, D. Tran, B. T. Keenan, P. L. Kramer, J. A. Schneider, D. A. Bennett, M. B. Feany, and P. L. De Jager. 2011. 'Functional screening of Alzheimer pathology genome-wide association signals in *Drosophila*', *Am J Hum Genet*, 88: 232-8.
- Shulman, J. M., S. Imboywa, N. Giagtzoglou, M. P. Powers, Y. Hu, D. Devenport, P. Chipendo, L. B. Chibnik, A. Diamond, N. Perrimon, N. H. Brown, P. L. De Jager, and M. B. Feany. 2014. 'Functional screening in *Drosophila* identifies Alzheimer's disease susceptibility genes and implicates Tau-mediated mechanisms', *Hum Mol Genet*, 23: 870-7.
- Sidiropoulos, P. N., M. Mieke, T. Bock, E. Tinelli, C. I. Oertli, R. Kuner, D. Meijer, B. Wollscheid, A. Niemann, and U. Suter. 2012. 'Dynamin 2 mutations in Charcot-Marie-Tooth neuropathy highlight the importance of clathrin-mediated endocytosis in myelination', *Brain*, 135: 1395-411.
- Simic, G., M. Babic Leko, S. Wray, C. Harrington, I. Delalle, N. Jovanov-Milosevic, D. Bazadona, L. Buee, R. de Silva, G. Di Giovanni, C. Wischik, and P. R. Hof. 2016. 'Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies', *Biomolecules*, 6: 6.
- Sims, R., S. J. van der Lee, A. C. Naj, C. Bellenguez, N. Badarinarayan, J. Jakobsdottir, B. W. Kunkle, A. Boland, R. Raybould, J. C. Bis, E. R. Martin, B. Grenier-Boley, S. Heilmann-Heimbach, V. Chouraki, A. B. Kuzma, K. Sleegers, M. Vronskaya, A. Ruiz, R. R. Graham, R. Olaso, P. Hoffmann, M. L. Grove, B. N. Vardarajan, M. Hiltunen, M. M. Nothen, C. C. White, K. L. Hamilton-Nelson, J. Epelbaum, W. Maier, S. H. Choi, G. W. Beecham, C. Dulary, S. Herms, A. V. Smith, C. C. Funk, C. Derbois, A. J. Forstner, S. Ahmad, H. Li, D. Bacq, D. Harold, C. L. Satizabal, O. Valladares, A. Squassina, R. Thomas, J. A. Brody, L. Qu, P. Sanchez-Juan, T. Morgan, F. J. Wolters, Y. Zhao, F. S. Garcia, N. Denning, M. Fornage, J. Malamon, M. C. D. Naranjo, E. Majounie, T. H. Mosley, B. Dombroski, D. Wallon, M. K. Lupton, J. Dupuis, P. Whitehead, L. Fratiglioni, C. Medway, X. Jian, S. Mukherjee, L. Keller, K. Brown, H. Lin, L. B. Cantwell, F. Panza, B. McGuinness, S. Moreno-Grau, J. D. Burgess, V. Solfrizzi, P. Proitsi, H. H. Adams, M. Allen, D. Seripa, P. Pastor, L. A. Cupples, N. D. Price, D. Hannequin, A. Frank-Garcia, D. Levy, P. Chakrabarty, P. Caffarra, I. Giegling, A. S. Beiser, V. Giedraitis, H. Hampel, M. E. Garcia, X. Wang, L. Lannfelt, P. Mecocci, G. Eiriksdottir, P. K. Crane, F. Pasquier, V. Boccardi, I. Henandez, R. C. Barber, M. Scherer, L. Tarraga, P. M. Adams, M. Leber, Y. Chen, M. S. Albert, S. Riedel-Heller, V. Emilsson, D. Beekly, A. Braae, R. Schmidt, D. Blacker, C. Masullo, H. Schmidt, R. S. Doody, G. Spalletta, W. T. Longstreth, Jr., T. J. Fairchild, P. Bossu, O. L. Lopez, M. P. Frosch, E. Sacchinelli, B. Ghetti, Q. Yang, R. M. Huebinger, F. Jessen, S. Li, M. I. Kamboh, J. Morris, O. Sotolongo-Grau, M. J. Katz, C. Corcoran, M. Dunstan, A. Braddel, C. Thomas, A. Meggy, R. Marshall, A. Gerrish, J. Chapman, M. Aguilar, S. Taylor, M. Hill, M. D. Fairen, A. Hodges, B. Vellas, H. Soininen, I. Kloszewska, M. Daniilidou, J. Uphill, Y. Patel, J. T. Hughes, J. Lord, J. Turton, A. M. Hartmann, R. Cecchetti, C. Fenoglio, M. Serpente, M. Arcaro, C. Caltagirone, M. D. Orfei, A. Ciaramella, S. Pichler, M. Mayhaus, W. Gu, A. Lleo, J. Fortea, R. Blesa, I. S. Barber, K. Brookes, C. Cupidi, R. G. Maletta, D. Carrell, S. Sorbi, S. Moebus, M. Urbano, A. Pilotto, J. Kornhuber, P. Bosco, S. Todd, D. Craig, J. Johnston, M. Gill, B. Lawlor, A. Lynch, N. C. Fox, J. Hardy, R. L. Albin, L. G. Apostolova, S. E. Arnold, S. Asthana, C. S. Atwood, C. T. Baldwin, L. L. Barnes, S. Barral, T. G. Beach, J. T. Becker, E. H. Bigio, T. D. Bird, B. F. Boeve, J. D. Bowen, A. Boxer, J. R. Burke, J. M. Burns, J. D. Buxbaum, N. J. Cairns, C. Cao, C. S. Carlson, C. M. Carlsson, R. M. Carney, M. M. Carrasquillo, S. L. Carroll, C. C. Diaz, H. C. Chui, D. G. Clark, D. H. Cribbs, E. A. Crocco, C. DeCarli, M. Dick, R. Duara, D. A. Evans, K. M. Faber, K. B. Fallon, D. W. Fardo, M. R. Farlow, S. Ferris, T. M. Foroud, D. R. Galasko, M. Gearing, D. H. Geschwind, J. R. Gilbert, N. R. Graff-Radford, R. C. Green, J. H. Growdon, R. L. Hamilton, L. E. Harrell, L. S. Honig, M. J. Huentelman, C. M. Hulette, B. T. Hyman, G. P. Jarvik, E. Abner, L. W. Jin, G. Jun, A. Karydas, J. A. Kaye, R. Kim, N. W. Kowall, J. H. Kramer, F. M. LaFerla, J. J. Lah, J. B. Leverenz, A. I. Levey, G. Li, A. P. Lieberman, K. L. Lunetta, C. G. Lyketsos, D. C. Marson, F. Martiniuk, D. C. Mash, E. Masliah, W. C. McCormick, S. M. McCurry, A. N. McDavid, A. C. McKee, M. Mesulam, B. L. Miller, C. A. Miller, J. W. Miller, J. C. Morris, J. R. Murrell, A. J. Myers, S. O'Bryant, J. M. Olichney, V. S. Pankratz, J. E. Parisi, H. L. Paulson, W.

- Perry, E. Peskind, A. Pierce, W. W. Poon, H. Potter, J. F. Quinn, A. Raj, M. Raskind, B. Reisberg, C. Reitz, J. M. Ringman, E. D. Roberson, E. Rogaeva, H. J. Rosen, R. N. Rosenberg, M. A. Sager, A. J. Saykin, J. A. Schneider, L. S. Schneider, W. W. Seeley, A. G. Smith, J. A. Sonnen, S. Spina, R. A. Stern, R. H. Swerdlow, R. E. Tanzi, T. A. Thornton-Wells, J. Q. Trojanowski, J. C. Troncoso, V. M. Van Deerlin, L. J. Van Eldik, H. V. Vinters, J. P. Vonsattel, S. Weintraub, K. A. Welsh-Bohmer, K. C. Wilhelmsen, J. Williamson, T. S. Wingo, R. L. Woltjer, C. B. Wright, C. E. Yu, L. Yu, F. Garzia, F. Golamaully, G. Septier, S. Engelborghs, R. Vandenberghe, P. P. De Deyn, C. M. Fernandez, Y. A. Benito, H. Thonberg, C. Forsell, L. Lilius, A. Kinhult-Stahlbom, L. Kilander, R. Brundin, L. Concari, S. Helisalmi, A. M. Koivisto, A. Haapasalo, V. Dermecourt, N. Fievet, O. Hanon, C. Dufouil, A. Brice, K. Ritchie, B. Dubois, J. J. Himali, C. D. Keene, J. Tschanz, A. L. Fitzpatrick, W. A. Kukull, M. Norton, T. Aspelund, E. B. Larson, R. Munger, J. I. Rotter, R. B. Lipton, M. J. Bullido, A. Hofman, T. J. Montine, E. Coto, E. Boerwinkle, R. C. Petersen, V. Alvarez, F. Rivadeneira, E. M. Reiman, M. Gallo, C. J. O'Donnell, J. S. Reisch, A. C. Bruni, D. R. Royall, M. Dichgans, M. Sano, D. Galimberti, P. St George-Hyslop, E. Scarpini, D. W. Tsuang, M. Mancuso, U. Bonuccelli, A. R. Winslow, A. Daniele, C. K. Wu, O. Peters, B. Nacmias, M. Riemenschneider, R. Heun, C. Brayne, D. C. Rubinsztein, J. Bras, R. Guerreiro, A. Al-Chalabi, C. E. Shaw, J. Collinge, D. Mann, M. Tsolaki, J. Clarimon, R. Sussams, S. Lovestone, M. C. O'Donovan, M. J. Owen, T. W. Behrens, S. Mead, A. M. Goate, A. G. Uitterlinden, C. Holmes, C. Cruchaga, M. Ingelsson, D. A. Bennett, J. Powell, T. E. Golde, C. Graff, P. L. De Jager, K. Morgan, N. Ertekin-Taner, O. Combarros, B. M. Psaty, P. Passmore, S. G. Younkin, C. Berr, V. Gudnason, D. Rujescu, D. W. Dickson, J. F. Dartigues, A. L. DeStefano, S. Ortega-Cubero, H. Hakonarson, D. Campion, M. Boada, J. K. Kauwe, L. A. Farrer, C. Van Broeckhoven, M. A. Ikram, L. Jones, J. L. Haines, C. Tzourio, L. J. Launer, V. Escott-Price, R. Mayeux, J. F. Deleuze, N. Amin, P. A. Holmans, M. A. Pericak-Vance, P. Amouyel, C. M. van Duijn, A. Ramirez, L. S. Wang, J. C. Lambert, S. Seshadri, J. Williams, and G. D. Schellenberg. 2017. 'Rare coding variants in *PLCG2*, *ABI3*, and *TREM2* implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease', *Nat Genet*, 49: 1373-84.
- Slepnev, V. I., G. C. Ochoa, M. H. Butler, D. Grabs, and P. De Camilli. 1998. 'Role of phosphorylation in regulation of the assembly of endocytic coat complexes', *Science*, 281: 821-4.
- Smith, T., J. Cross, F. Poland, F. Clay, A. Brookes, I. Maidment, B. Penhale, K. Laidlaw, and C. Fox. 2018. 'Systematic Review Investigating Multi-disciplinary Team Approaches to Screening and Early Diagnosis of Dementia in Primary Care - What are the Positive and Negative Effects and Who Should Deliver It?', *Curr Alzheimer Res*, 15: 5-17.
- Soderberg, O., K. J. Leuchowius, M. Gullberg, M. Jarvius, I. Weibrecht, L. G. Larsson, and U. Landegren. 2008. 'Characterizing proteins and their interactions in cells and tissues using the in situ proximity ligation assay', *Methods*, 45: 227-32.
- Sohn, P. D., T. E. Tracy, H. I. Son, Y. Zhou, R. E. Leite, B. L. Miller, W. W. Seeley, L. T. Grinberg, and L. Gan. 2016. 'Acetylated tau destabilizes the cytoskeleton in the axon initial segment and is mislocalized to the somatodendritic compartment', *Mol Neurodegener*, 11: 47.
- Sontag, E., V. Nunbhakdi-Craig, G. Lee, R. Brandt, C. Kamibayashi, J. Kuret, C. L. White, 3rd, M. C. Mumby, and G. S. Bloom. 1999. 'Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies', *J Biol Chem*, 274: 25490-8.
- Sorrells, S. F., M. F. Paredes, A. Cebrian-Silla, K. Sandoval, D. Qi, K. W. Kelley, D. James, S. Mayer, J. Chang, K. I. Auguste, E. F. Chang, A. J. Gutierrez, A. R. Kriegstein, G. W. Mathern, M. C. Oldham, E. J. Huang, J. M. Garcia-Verdugo, Z. Yang, and A. Alvarez-Buylla. 2018. 'Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults', *Nature*, 555: 377-81.
- Sottejeau, Y., A. Bretteville, F. X. Cantrelle, N. Malmanche, F. Demiaute, T. Mendes, C. Delay, H. Alves Dos Alves, A. Flaig, P. Davies, P. Dourlen, B. Dermaut, J. Laporte, P. Amouyel, G. Lippens, J. Chapuis, I. Landrieu, and J. C. Lambert. 2015. 'Tau phosphorylation regulates the interaction between BIN1's SH3 domain and Tau's proline-rich domain', *Acta Neuropathol Commun*, 3: 58.
- Sparks, A. B., N. G. Hoffman, S. J. McConnell, D. M. Fowlkes, and B. K. Kay. 1996. 'Cloning of ligand targets: systematic isolation of SH3 domain-containing proteins', *Nat Biotechnol*, 14: 741-4.

- Stefansson, H., A. Helgason, G. Thorleifsson, V. Steinthorsdottir, G. Masson, J. Barnard, A. Baker, A. Jonasdottir, A. Ingason, V. G. Gudnadottir, N. Desnica, A. Hicks, A. Gylfason, D. F. Gudbjartsson, G. M. Jonsdottir, J. Sainz, K. Agnarsson, B. Birgisdottir, S. Ghosh, A. Olafsdottir, J. B. Cazier, K. Kristjansson, M. L. Frigge, T. E. Thorgeirsson, J. R. Gulcher, A. Kong, and K. Stefansson. 2005. 'A common inversion under selection in Europeans', *Nat Genet*, 37: 129-37.
- Stern, Y. 2012. 'Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease', *Lancet Neurol*, 11: 1006-12.
- Strittmatter, W. J., A. M. Saunders, D. Schmechel, M. Pericak-Vance, J. Englund, G. S. Salvesen, and A. D. Roses. 1993. 'Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 1977-81.
- Sultan, A., F. Nessler, M. Violet, S. Begard, A. Loyens, S. Talahari, Z. Mansuroglu, D. Marzin, N. Sergeant, S. Humez, M. Colin, E. Bonnefoy, L. Buee, and M. C. Galas. 2011. 'Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection', *J Biol Chem*, 286: 4566-75.
- Swanberg, M. M., R. E. Tractenberg, R. Mohs, L. J. Thal, and J. L. Cummings. 2004. 'Executive dysfunction in Alzheimer disease', *Arch Neurol*, 61: 556-60.
- Tan, M. S., J. T. Yu, and L. Tan. 2013. 'Bridging integrator 1 (BIN1): form, function, and Alzheimer's disease', *Trends Mol Med*, 19: 594-603.
- Tardivel, M., S. Begard, L. Bousset, S. Dujardin, A. Coens, R. Melki, L. Buee, and M. Colin. 2016. 'Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to neuron transfer of pathological Tau protein assemblies', *Acta Neuropathol Commun*, 4: 117.
- Teipel, S. J., R. Stahl, O. Dietrich, S. O. Schoenberg, R. Perneczky, A. L. Bokde, M. F. Reiser, H. J. Moller, and H. Hampel. 2007. 'Multivariate network analysis of fiber tract integrity in Alzheimer's disease', *Neuroimage*, 34: 985-95.
- Toran-Allerand, C. D. 2005. 'Estrogen and the brain: beyond ER-alpha, ER-beta, and 17beta-estradiol', *Ann N Y Acad Sci*, 1052: 136-44.
- Tsien, J. Z., P. T. Huerta, and S. Tonegawa. 1996. 'The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory', *Cell*, 87: 1327-38.
- Tsukita, S., and H. Ishikawa. 1976. 'Three-dimensional distribution of smooth endoplasmic reticulum in myelinated axons', *J Electron Microsc (Tokyo)*, 25: 141-9.
- Tsutsui, K., Y. Maeda, K. Tsutsui, S. Seki, and A. Tokunaga. 1997. 'cDNA cloning of a novel amphiphysin isoform and tissue-specific expression of its multiple splice variants', *Biochem Biophys Res Commun*, 236: 178-83.
- Tucker, K. L., M. Meyer, and Y. A. Barde. 2001. 'Neurotrophins are required for nerve growth during development', *Nat Neurosci*, 4: 29-37.
- Valdes, V., J. I. Valenzuela, D. A. Salas, M. Jauregui-Bravo, C. Otero, C. Thiede, C. F. Schmidt, and A. Couve. 2012. 'Endoplasmic reticulum sorting and kinesin-1 command the targeting of axonal GABAB receptors', *PLoS One*, 7: e44168.
- Van Cauter, T., J. Camon, A. Alvernhe, C. Elduayen, F. Sargolini, and E. Save. 2013. 'Distinct roles of medial and lateral entorhinal cortex in spatial cognition', *Cereb Cortex*, 23: 451-9.
- van Hummel, A., M. Bi, S. Ippati, J. van der Hoven, A. Volkerling, W. S. Lee, D. C. Tan, A. Bongers, A. Ittner, Y. D. Ke, and L. M. Ittner. 2016. 'No Overt Deficits in Aged Tau-Deficient C57Bl/6.Mapttm1(EGFP)Kit GFP Knockin Mice', *PLoS One*, 11: e0163236.
- Vina, J., and A. Lloret. 2010. 'Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide', *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2: S527-33.
- Voeltz, G. K., W. A. Prinz, Y. Shibata, J. M. Rist, and T. A. Rapoport. 2006. 'A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum', *Cell*, 124: 573-86.
- Vorhees, C. V., and M. T. Williams. 2014. 'Assessing spatial learning and memory in rodents', *ILAR J*, 55: 310-32.
- Wagner, J., S. Krauss, S. Shi, S. Ryazanov, J. Steffen, C. Miklitz, A. Leonov, A. Kleinknecht, B. Goricke, J. H. Weishaupt, D. Weckbecker, A. M. Reiner, W. Zinth, J. Levin, D. Ehninger, S. Remy, H. A. Kretschmar, C. Griesinger, A. Giese, and M. Fuhrmann. 2015. 'Reducing tau aggregates with

- anle138b delays disease progression in a mouse model of tauopathies', *Acta Neuropathol*, 130: 619-31.
- Wang, H. F., Y. Wan, X. K. Hao, L. Cao, X. C. Zhu, T. Jiang, M. S. Tan, L. Tan, D. Q. Zhang, L. Tan, J. T. Yu, and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. 2016. 'Bridging Integrator 1 (BIN1) Genotypes Mediate Alzheimer's Disease Risk by Altering Neuronal Degeneration', *J Alzheimers Dis*, 52: 179-90.
- Wang, X., S. J. Chun, H. Treloar, T. Vartanian, C. A. Greer, and S. M. Strittmatter. 2002. 'Localization of Nogo-A and Nogo-66 receptor proteins at sites of axon-myelin and synaptic contact', *J Neurosci*, 22: 5505-15.
- Wang, X., K. Smith, M. Pearson, A. Hughes, M. L. Cosden, J. Marcus, J. F. Hess, M. J. Savage, T. Rosahl, S. M. Smith, J. B. Schachter, and J. M. Uslaner. 2018. 'Early intervention of tau pathology prevents behavioral changes in the rTg4510 mouse model of tauopathy', *PLoS One*, 13: e0195486.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner. 1975. 'A protein factor essential for microtubule assembly', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72: 1858-62.
- Weinger, J. G., P. Davies, C. M. Acker, C. F. Brosnan, V. Tshiperson, A. Bayewitz, and B. Shafit-Zagardo. 2012. 'Mice devoid of Tau have increased susceptibility to neuronal damage in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis', *J Neuropathol Exp Neurol*, 71: 422-33.
- Welburn, J., and J. Endicott. 2005. 'Methods for preparation of proteins and protein complexes that regulate the eukaryotic cell cycle for structural studies', *Methods Mol Biol*, 296: 219-35.
- Werner, C., M. Pauli, S. Doose, A. Weishaupt, H. Haselmann, B. Grunewald, M. Sauer, M. Heckmann, K. V. Toyka, E. Asan, C. Sommer, and C. Geis. 2016. 'Human autoantibodies to amphiphysin induce defective presynaptic vesicle dynamics and composition', *Brain*, 139: 365-79.
- Whittington, R. A., A. Bretteville, M. F. Dickler, and E. Planel. 2013. 'Anesthesia and tau pathology', *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 47: 147-55.
- Wilcock, G. K., and M. M. Esiri. 1982. 'Plaques, tangles and dementia. A quantitative study', *J Neurol Sci*, 56: 343-56.
- Wischik, C. M., C. R. Harrington, and J. M. Storey. 2014. 'Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease', *Biochem Pharmacol*, 88: 529-39.
- Wolfe, M. S. 2009. 'Tau mutations in neurodegenerative diseases', *J Biol Chem*, 284: 6021-5.
- Xiong, Y. S., F. F. Liu, D. Liu, H. Z. Huang, N. Wei, L. Tan, J. G. Chen, H. Y. Man, C. X. Gong, Y. Lu, J. Z. Wang, and L. Q. Zhu. 2015. 'Opposite effects of two estrogen receptors on tau phosphorylation through disparate effects on the miR-218/PTPA pathway', *Aging Cell*, 14: 867-77.
- Yan, J., X. B. Sun, H. Q. Wang, H. Zhao, X. Y. Zhao, Y. X. Xu, J. C. Guo, and C. Q. Zhu. 2010. 'Chronic restraint stress alters the expression and distribution of phosphorylated tau and MAP2 in cortex and hippocampus of rat brain', *Brain Res*, 1347: 132-41.
- Yang, C., X. Guo, G. H. Wang, H. L. Wang, Z. C. Liu, H. Liu, Z. X. Zhu, and Y. Li. 2014. 'Changes in tau phosphorylation levels in the hippocampus and frontal cortex following chronic stress', *Braz J Med Biol Res*, 47: 237-44.
- Yetman, M. J., S. W. Fowler, and J. L. Jankowsky. 2016. 'Humanized Tau Mice with Regionalized Amyloid Exhibit Behavioral Deficits but No Pathological Interaction', *PLoS One*, 11: e0153724.
- Yogev, S., and K. Shen. 2017. 'Establishing Neuronal Polarity with Environmental and Intrinsic Mechanisms', *Neuron*, 96: 638-50.
- Yu, C. H., G. S. Song, J. Y. Yhee, J. H. Kim, K. S. Im, W. G. Nho, J. H. Lee, and J. H. Sur. 2011. 'Histopathological and immunohistochemical comparison of the brain of human patients with Alzheimer's disease and the brain of aged dogs with cognitive dysfunction', *J Comp Pathol*, 145: 45-58.
- Yu, H., J. K. Chen, S. Feng, D. C. Dalgarno, A. W. Brauer, and S. L. Schreiber. 1994. 'Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains', *Cell*, 76: 933-45.
- Zagrebel'sky, M., R. Schweigreiter, C. E. Bandtlow, M. E. Schwab, and M. Korte. 2010. 'Nogo-A stabilizes the architecture of hippocampal neurons', *J Neurosci*, 30: 13220-34.

- Zempel, H., F. J. A. Dennissen, Y. Kumar, J. Luedtke, J. Biernat, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 2017. 'Axodendritic sorting and pathological missorting of Tau are isoform-specific and determined by axon initial segment architecture', *J Biol Chem*, 292: 12192-207.
- Zempel, H., and E. Mandelkow. 2014. 'Lost after translation: missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease', *Trends Neurosci*, 37: 721-32.
- Zhang, X., J. T. Yu, J. Li, C. Wang, L. Tan, B. Liu, and T. Jiang. 2015. 'Bridging Integrator 1 (BIN1) Genotype Effects on Working Memory, Hippocampal Volume, and Functional Connectivity in Young Healthy Individuals', *Neuropsychopharmacology*, 40: 1794-803.
- Zhao, X., D. Wang, X. Liu, L. Liu, Z. Song, T. Zhu, G. Adams, X. Gao, R. Tian, Y. Huang, R. Chen, F. Wang, D. Liu, X. Yu, Y. Chen, Z. Chen, M. Teng, X. Ding, and X. Yao. 2013. 'Phosphorylation of the Bin, Amphiphysin, and RSV161/167 (BAR) domain of ACAP4 regulates membrane tubulation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 11023-8.
- Zhou, L., J. McInnes, K. Wierda, M. Holt, A. G. Herrmann, R. J. Jackson, Y. C. Wang, J. Swerts, J. Beyens, K. Miskiewicz, S. Vilain, I. Dewachter, D. Moechars, B. De Strooper, T. L. Spires-Jones, J. De Wit, and P. Verstreken. 2017. 'Tau association with synaptic vesicles causes presynaptic dysfunction', *Nat Commun*, 8: 15295.
- Zhou, Y., J. Shi, D. Chu, W. Hu, Z. Guan, C. X. Gong, K. Iqbal, and F. Liu. 2018. 'Relevance of Phosphorylation and Truncation of Tau to the Etiopathogenesis of Alzheimer's Disease', *Front Aging Neurosci*, 10: 27.
- Zurek, N., L. Sparks, and G. Voeltz. 2011. 'Reticulon short hairpin transmembrane domains are used to shape ER tubules', *Traffic*, 12: 28-41.

Maxime Steno Sartori

## Etude *in vivo* de l'impact de la surexpression du gène *BIN1* dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer

### Résumé

La maladie d'Alzheimer à forme tardive, exempte de mutations, représente près de 99% des 850 000 cas répertoriés en France. Hormis l'âge, des facteurs génétiques comme *BIN1* apparaissent déterminant dans l'établissement de l'amyloïdopathie et de la tauopathie, marqueurs constitutifs de cette maladie. Le travail de thèse est basé sur l'étude d'une surexpression du gène humain de *BIN1* et de son impact dans un contexte murin de tauopathie. La surexpression seule de *BIN1* entraîne des défauts mnésiques à court terme associés à des anomalies cellulaires et moléculaires au niveau de la voie temporo-hippocampique. Ces altérations sont exacerbées par la combinaison de la souris *TgBIN1* avec le modèle de tauopathie, à la fois chez les mâles et les femelles. Pour autant il apparaît que la surexpression de *BIN1* préserve la mémoire spatiale indépendamment de l'âge et du sexe. L'hippocampe apparaît en grande partie préservé des inclusions intracellulaires de Tau et la myéline des fibres axonales est retrouvée intacte. Ces éléments mettent en évidence que *BIN1* est un acteur important dans l'établissement de la tauopathie et que son activité neuro-protectrice peut être médiée par un complexe moléculaire direct impliquant à la fois Tau et RNT4-A/Nogo-A.

Mots clés : *BIN1*, Tau, RNT4-A/Nogo-A, mémoire, neurodégénérescence, démyélinisation, reticulum

### Abstract

Late Onset Alzheimer Disease represents more than 99% of total Alzheimer cases and it is not caused by genetic mutations. Among risk factors such as age, genetic compounds as *BIN1* appear to be determinant for the pathological process establishment. This study aims to determine the *BIN1* overexpression effect in mice and in a tauopathy context. In this study, *BIN1* overexpression alone caused short term memory impairments linked with the cellular and molecular abnormalities. These disorders are exacerbated by a combination of *TgBIN1* mice with a tauopathy model, both in males and females. Surprisingly, *BIN1* overexpression rescued long term and spatial memory regarding the age and sex. Hippocampus appeared to be preserved from intracellular Tau inclusions. Moreover, fornix myelin is found intact. These elements highlighted *BIN1* which is a key gene in tauopathy establishment. *BIN1* neuroprotective activity is mediated by direct molecular interactions both with Tau and RNT4-A/Nogo-A.

Key words : , Tau, RNT4-A/Nogo-A, memory, neurodegeneration, demyelination, reticulum