



HAL
open science

Régulation de la phagocytose microgliale de l'amyloïde- β par le VEGF

Priscille de Gea

► **To cite this version:**

Priscille de Gea. Régulation de la phagocytose microgliale de l'amyloïde- β par le VEGF. Neurobiologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2023. Français. NNT : 2023LYO10163 . tel-04227988v2

HAL Id: tel-04227988

<https://hal.science/tel-04227988v2>

Submitted on 18 Jun 2024

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

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

Université Claude Bernard  Lyon 1

**THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale N°476
Neurosciences et Cognition (NSCo)**

Discipline : Neurobiologie Cellulaire

Soutenue publiquement le 28/09/2023, par :
Priscille de Gea

**Régulation de la phagocytose microgliale de
l'amyloïde- β par le VEGF**

Devant le jury composé de :

Bemelmans, Alexis-Pierre DR CEA, Université Paris Saclay
Hirbec, Hélène CR CNRS, Université de Montpellier
Delarasse, Cécile CR INSERM, Sorbonne Université
Marignier, Romain PUPH, Université Claude Bernard Lyon 1
Meyronet, David PUPH, Université Claude Bernard Lyon 1

Rapporteur
Rapporteuse
Examinatrice
Examineur
Président

Meissirel, Claire CR INSERM, Université Claude Bernard Lyon 1

Directrice de thèse

Laboratoire d'accueil

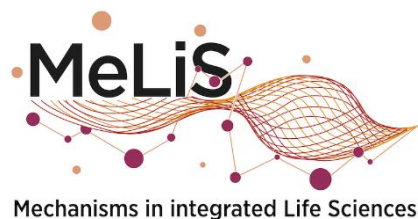
Laboratoire Mécanismes en Sciences Intégratives du Vivant (MeLIS)

Institut NeuroMyoGène (INMG)

INSERM U1314
CNRS UMR5284

Université Claude Bernard Lyon 1

Faculté de Médecine Rockefeller
8 avenue Rockefeller
69008 Lyon



Régulation de la phagocytose microgliale de l'amyloïde- β par le VEGF

La maladie d'Alzheimer (MA) est la première cause de démence dans le monde et se caractérise par l'accumulation du peptide amyloïde- β ($A\beta$) dans le cerveau, qui s'agrège et forme des plaques amyloïdes. Les mécanismes à l'origine de la maladie sont encore mal compris, en particulier pour les formes sporadiques (90% des cas), qui ne présentent pas de transmission héréditaire dominante d'une mutation. Grâce aux études pan-génomiques, des facteurs de risque ont été identifiés, correspondant en majorité à des gènes exprimés par les cellules microgliales. Les microglies sont les cellules immunitaires résidentes du système nerveux central qui contribuent au maintien de l'homéostasie neuronale en contexte physiologique et pathologique. Dans la MA, ces cellules sont stimulées par de nombreux signaux de danger, dont l' $A\beta$, et participent à son élimination ou à sa rétention au niveau des plaques amyloïdes. Avec la progression de la pathologie, l'activation des microglies devient chronique et leur fonction est altérée.

Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) est un facteur de croissance vasculaire séquestré dans les plaques amyloïdes, qui favorise le recrutement des microglies vers les dépôts d' $A\beta$. Il régule aussi l'activité des α -sécrétases impliquées dans le clivage de récepteurs clefs de l' $A\beta$ exprimés par les microglies.

L'objectif principal de cette thèse a été de caractériser l'effet du VEGF sur les microglies, à la fois sur la phagocytose de l' $A\beta$ mais aussi sur les mécanismes et les voies mises en jeu par le facteur de croissance. Nos résultats révèlent que le VEGF augmente spécifiquement la phagocytose microgliale des espèces les plus toxiques, les oligomères d' $A\beta$ *in vitro*. Cet effet s'accompagne d'une modulation de l'activité des α -sécrétases et d'une augmentation du clivage du récepteur microglial à l' $A\beta$, TREM2. L'ensemble des résultats recueillis a permis d'élaborer un modèle des mécanismes mis en jeu par les cellules microgliales pour coordonner leur réponse à l' $A\beta$, grâce au VEGF.

Mots clefs :

Microglie, maladie d'Alzheimer, VEGF, $A\beta$, TREM2, phagocytose, α -sécrétases

Regulation of amyloid- β microglial phagocytosis by VEGF

Alzheimer's Disease (AD) is the leading cause of dementia worldwide, characterized by the accumulation of amyloid- β (A β) peptide in the brain, which aggregates to form amyloid plaques. The disease mechanisms are poorly understood, especially in the sporadic form, which represents 90% of cases and does not show any dominant hereditary transmission of mutations. Recent pangenomic studies uncovered genetic risk factors, most of which correspond to genes expressed by microglial cells. Microglia are the resident immune cells of the central nervous system that help maintaining neuronal homeostasis in health and disease. During the course of AD, microglia are stimulated by numerous danger signals, such as A β , and participate in its elimination or retention within amyloid plaques. With disease progression, microglial cells become chronically activated and inefficient.

The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) which is sequestered in amyloid plaques, promotes microglial recruitment toward A β deposits. Moreover, VEGF is known to regulate α -secretases involved in the cleavage of key microglial A β receptors.

The main aim of this thesis has been to characterize VEGF effect on microglia, by firstly monitoring A β phagocytosis, and then by determining underlying mechanisms. We demonstrated that VEGF specifically increases microglial phagocytosis of A β oligomers. This effect is associated to VEGF-dependent changes in α -secretase activity and to the increased cleavage of the key A β receptor TREM2. Altogether, these results have been synthesized in a mechanistic model of microglial cell response to A β , thanks to VEGF.

Key words:

Microglia, Alzheimer's disease, VEGF, A β , TREM2, phagocytosis, α -secretases

Remerciements

Je remercie Dr Alexis Bemelmans, Dr Hélène Hirbec, Dr Cécile Delarasse, Pr Romain Marignier et Pr David Meyronet d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de participer à la discussion lors de la soutenance. Merci aussi à Romain Marignier et Etienne Audinat pour avoir constitué mon comité de suivi de thèse, qui nous a permis de faire progresser ce projet.

Merci    Céline Malleval et Paul Salin pour leur aide en statistiques en master et lors de la thèse. Merci    Michèle Weiss et Ga  tan Juban pour leur formation et conseils pour toute la cytométrie en flux. Merci    Denis Ressnikoff et Bruno Chapuis pour leur expertise à la plateforme du CIQLE.

Merci    Jérôme Honnorat de m'avoir accueillie dans son équipe. Merci à toute l'équipe Synatac, en particulier, Nelly pour les conseils purée de panais, Véro pour les pâtisseries et les cerises, Olivier pour avoir été le fan #1 des N9, Fabrice pour les rigolades au tournant d'un couloir, Do pour le soutien émotionnel en bioch, et Naura pour avoir eu l'extrême patience de former bébé-Priscille aux cultures (puis pour tous les débats bouquins/ciné sous les hottes). Merci aussi aux stagiaires de l'équipe, pour le bout de chemin passé ensemble, notamment Ludivine, Mathilde, Michel, Noelly et Vincent !

Merci énormément à toi Claire, pour ta bienveillance et ton dynamisme. Merci de m'avoir donné l'occasion de commencer et de finir cette aventure de 3 années intenses. Tu as su mettre de côté tous mes grognements et autres ronchonnages pour nous permettre de continuer à avancer. Merci !

Je remercie les membres YRIN et autres copinous du labo, qui ont rendu bien des moments funs (et surtout merci d'avoir accepté mes memes). Merci à tou.s.tes ceux qui ont participé au montage du Green Lab.

Merci à l'équipe pédagogique de l'IUT Génie Bio, en particulier à Carole Bougault et Cécile Gonzalez pour m'avoir guidée chaque année, toujours légèrement perdue au milieu de cette biochimie. C'était une belle expérience, et un plaisir de parler assiduité, homog  n  sation et correction de copies avec vous !

Merci à la Team JC qui a su maintenir ce lien indispensable, vraiment merci à vous pour ces bouffées d'air (oui, même à Noir et Table). Vous êtes des pépites les ami.e.s. Notamment merci Sozerko de m'avoir sortie dans Lyon, et check   100000 fois dans les couloirs ! Merci    Mathilde, d'avoir transgressé l'interdit pour se retrouver à 1,08km pendant 62min lors des

temps difficiles (et par la suite de manière totalement légale), comment vas-tu ?? Coucou les ami.e.s de la FEEUF et membres encore actifs ! Merci pour ces moments de pause, et très hâte de la prochaine danse de l'ours ensemble. Merci aux camarades de manifs, on a passé un sacré bout de temps à être pas content.e.s cette année ! Merci au club de lecture, les aprèm/soirées débat autour de chai latte et cheesecake étaient exquis !

Merci à ma famille, qui n'a jamais rien compris à ce que je faisais, mais qui a toujours su me lâcher un pouce quand c'était nécessaire. En particulier merci à Alicia, mon petit lapin, pour toutes ces vidéos de chat/chien/chèvre/lapin/abricots qui remontaient le moral.

V'la les filles du labo. Merci à Elodie d'avoir été là en début de thèse, de m'avoir lancée (projetée ?) dans l'aventure Yrin, et pour la paillasse. Merci pour ces moments partagés Clémentine, et surtout d'avoir accepté de tourner les scènes les plus cheloues des vidéos de thèse. Mélisse, pour les discussions passionnées France Inter, Arte et éco-anxiété, que du plaisir (lol). Kassandre, parce que c'était turbo drôle toutes ces aventures, et merci de manger à 11h50. Mélanie, merci pour nos discussions du matin/midi/aprèm, les blagues douteuses, et d'avoir (presque) jamais refusé une pause-café nécessaire. Merci Pauline pour tes conseils et ton expertise qui m'a fait découvrir le monde merveilleux des WB (grrrrr), pour toutes ces heures de débats politico-féministes, pour les journées coupes organo (même quand tu trempes ta spatule et casses toutes les tranches que je viens de trier), gros gros bisous.

Et puis cette thèse, sans ma co-thésarde Sarah ça n'aurait pas été la même histoire. Merci pour ton aide sur bien des manifs, ton soutien quotidien à base de thé, gâteaux et paroles réconfortantes, d'avoir continué de m'écouter parler de choses pas hyper intéressantes à répétition, merci pour tout. Comme on dit, t'as été top moumoute !

Merci à celle à qui j'ai promis, il y a bien longtemps, d'aller aussi loin que je le pouvais.
A celle qui m'a donné la force.

Table des matières

Introduction	11
I. Les cellules microgliales	11
1. Origine, différenciation et colonisation du cerveau.....	11
2. Méninges : immunité et système d'échange	13
3. Fonction des microglies : du développement à l'âge adulte.....	15
4. Hétérogénéité topographique et dimorphisme sexuel	17
5. Les mécanismes d'internalisation.....	20
6. Réactivité et inflammation	22
II. Vascular Endothelial Growth Factor	24
1. Le VEGF et ses récepteurs	24
a. Le VEGF.....	24
b. Les récepteurs et corécepteurs du VEGF	27
c. Les voies de signalisation du VEGF.....	28
d. Régulation de l'expression et de l'activation des récepteurs	30
2. Le VEGF dans le système nerveux adulte, implication du VEGFR1	32
a. Expression du VEGF et VEGFR1 dans le SNC du développement à l'âge adulte.....	32
b. Modulation de l'expression en hypoxie	35
c. Effets fonctionnels du VEGF et de la voie VEGF-VEGFR1	36
3. VEGF et α -sécrétases	37
4. VEGF et microglie	39
III. La maladie d'Alzheimer	41
1. Epidémiologie, étiologie, aspects cliniques et diagnostiques	41
a. Epidémiologie et étiologie	41
b. Aspects cliniques et diagnostiques	43
c. Anatomopathologie.....	46
d. Biomarqueurs et nouvelle classification	50
2. Processus pathologique	51
a. Amyloïde.....	511
b. Tau	600
3. Hypothèses de la MA	64
a. Hypothèse cholinergique	64
b. Hypothèse neurovasculaire.....	64
c. Hypothèse Tau	65

d. Hypothèse de la cascade amyloïde	66
e. Hypothèse inflammatoire	67
4. Thérapeutique	69
IV. Microglie et maladie d'Alzheimer	71
1. Microglie dans la physiopathologie.....	71
a. Implication des microglies réactives dans la MA	71
b. Cellules immunes et diversité phénotypique	73
2. Accumulation d'A β et réponse microgliale	75
a. Voies d'élimination de l'A β	75
b. Signaux de danger et récepteurs microgliaux	76
c. Réponse microgliale	77
d. Dérégulation de la réponse	79
3. Récepteurs à l'A β et phagocytose microgliale	84
a. Différents récepteurs pour différentes espèces d'A β	84
b. TREM2	84
4. VEGF et maladie d'Alzheimer.....	92
a. Corrélation avec le stade clinique	92
b. VEGF et A β	93
c. Microglie et VEGF dans la MA	95
V. Objectifs de thèse	95
Résultats	96
Discussion	131
Conclusion	140
Références	141

Annexe : A novel peptide derived from vascular endothelial growth factor prevents amyloid beta aggregation and toxicity

Liste d'abréviations

A β _o /A β _f	Oligomères d'A β / Fibrilles d'A β
ADAM	A disintegrin and metalloproteases
APP	Amyloid Precursor Protein
BACE	beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BrdU	Bromodésoxyuridine
CA	Corne d'Amont
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSF1	Colony stimulating factor 1
DAM	Disease-associated microglia
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DNF	Dégénérescences Neurofibrillaires
EOAD	Early-onset Alzheimer's disease
GD	Gyrus Denté
GWAS	Genome-wide association study
HBD	Heparin-binding domain
HIF	Hypoxia-induced factor
HRE	Hypoxia-response element
HSPG	Heparan sulfate protéoglycanes
iPSC	Cellules souches pluripotentes induites
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KO	Knock-out
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LOAD	Late-onset Alzheimer's disease
LTD	Long-term depression
LTP	Long-term potentiation
MA (sMA/fMA)	Maladie d'Alzheimer (sporadique/familiale)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPT	Microtubule-associated protein Tau
MCI	Mild Cognitive Impairment
MMSE	Mini Mental State Examination
NRP	Neuropiline
PhosSer	Phosphatidyl Sérine
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PLC γ	Phospholipase C γ
PSEN	Préséniline
SNC	Système Nerveux Central
TEP	Tomographie par émission de positrons
ThS	Thioflavine S
TREM2	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
WT	Wild-type

Introduction

I. Les cellules microgliales

1. Origine, différenciation et colonisation du cerveau

Dans le système nerveux central (SNC) on retrouve des cellules neuronales et des cellules gliales. Il est estimé que le ratio Glie/Neurone est de 1,4 et est nécessaire pour que la glie exerce ses nombreuses fonctions (Pelvig et al., 2008). Les cellules gliales sont principalement composées de trois types cellulaires : les oligodendrocytes, les astrocytes et la microglie ; qui représentent respectivement 75%, 20% et 5% des cellules gliales. Les microglies sont les macrophages résidents du SNC. Contrairement aux autres cellules du SNC elles ne sont pas originaires du tube neural, mais du sac vitellin où se développe la lignée myéloïde. Au stade embryonnaire murin E8 apparaissent les premiers précurseurs des microglies, les *Erythro-Myeloid Progenitor* (EMP), identifiés CD45-cKit+, qui vont donner naissance aux populations A1 (CD45+cKit-CX3CR1-) et A2 (CD45+cKit-CX3CR1+) au stade E9 (Figure 1) (Kierdorf et al., 2013). Leur entrée dans le tube neural se fait lors de l'hématopoïèse primitive dès E8,5 (Ginhoux et al., 2010; Kierdorf et al., 2013). En réponse à des stimuli environnementaux spécifiques à la lignée myéloïde ou microgliale, les cellules vont maturer en microglie et proliférer. Chez l'embryon humain, les microglies sont retrouvées dans le télencéphale et le diencephale dès 4,5 semaines de gestation, ce qui correspond à la fermeture du tube neural (Menassa and Gomez-Nicola, 2018).

Chez la souris, l'entrée décrite à E9 des précurseurs microgliaux a lieu avant la mise en place de la barrière hémato-encéphalique (BHE), mais nécessiterait la présence d'un réseau vasculaire fonctionnel (Ginhoux et al., 2010). En effet, plusieurs travaux ont montré que la

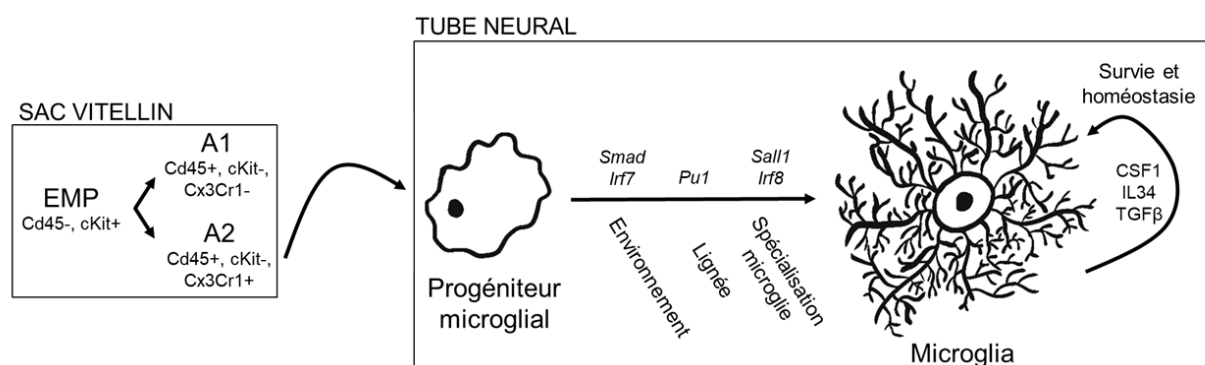


Figure 1- Origine et différenciation des microglies au cours du développement murin

Entrée des précurseur microgliaux dans le tube neural. EMP Erythro-Myeloid Progenitor Cells, A1 et A2 (Progéniteurs microgliaux CX3Cr1+cKit-CD45lo). Différenciation des progéniteurs microgliaux par influence de facteurs génétiques et environnementaux conduisant à la spécification des microglies ; puis survie des microglies grâce à des facteurs cytokiniques.

vascularisation était nécessaire pour la colonisation des microglies dans le parenchyme, avec une première démonstration par Ginhoux et al., où un défaut de la circulation sanguine sur le modèle murin *Nxc1*^{-/-} bloque l'entrée des précurseurs microgliaux (Ginhoux et al., 2010; Hattori, 2022). D'autres études suggèrent qu'il ne s'agit pas de la seule voie d'entrée des futures microglies ; elle pourrait se faire après E9 à partir de la périphérie en passant par les méninges ou les ventricules à E12,5 et E15,5 (Swinnen et al., 2013). Chez l'embryon humain, l'équipe de Pierre Gressens établit trois voies d'entrée des précurseurs dans le cortex cérébral à des stades développementaux précoces : les méninges, le plexus choroïde et les ventricules (Verney et al., 2010). Une entrée dans le diencephale et télencéphale à 4,5 semaines de gestation par le plexus choroïde et les méninges est décrite, puis à 8 semaines de gestation un passage des cellules via les ventricules et les méninges (Verney et al., 2010).

L'identité microgliale va émerger graduellement au cours du développement embryonnaire, par étapes successives, sous l'influence d'un programme développemental et de signaux du microenvironnement. Ceci permettra la maturation des cellules pour qu'elles puissent assurer leurs diverses fonctions (Matcovitch-Natan et al., 2016). Parmi les facteurs développementaux des microglies chez la souris, certains sont communs à tous les macrophages tissulaires (*Pu.1*) et d'autres sont spécifiques et indispensables à la différenciation des microglies, notamment les facteurs de transcription *Sall1*, *Irf8* et *Mafb* (Figure 1) (Buttgereit et al. 2016 ; Kierdorf et al. 2013 ; Matcovitch-Natan et al. 2016). D'autres facteurs cytokiniques sont absolument nécessaires à la survie des microglies et au maintien d'un état homéostatique : CSF1/CSF1R (*Colony Stimulating Factor*), IL34 et TGFβ (Ginhoux et al. 2010 ; Butovsky et al. 2014). Chez le fœtus humain, une récente étude de l'expression génique des microglies en single-cell RNA-seq a mis en évidence un profil transcriptomique caractéristique de l'exécution des fonctions cellulaires générales de prolifération, différenciation et morphogénèse aux stades précoces (Kracht et al., 2020). Plus tardivement on retrouve l'expression de gènes impliqués dans la spécification des microglies comme le facteur de transcription *Pu.1*.

La diffusion puis la prolifération dans le SNC de ces premières microglies différenciées s'effectue selon un processus de distribution spatiotemporel finement régulé (Figure 2). Il a été mis en évidence sur des coupes embryonnaires de cortex de souris que les microglies prolifèrent de manière très importante à E11,5, puis le taux de cellules prolifératives diminue entre E12,5 et E15,5 passant d'environ 40% à 20% (Swinnen et al., 2013). Cette même étude a regardé au cours du temps des coupes corticales entre E12,5 et E17,5 et a observé que la migration des cellules et leur distribution dans les différentes couches corticales sont les plus importantes à E12,5 et E14,5 (Figure 2) (Swinnen et al., 2013). Elles s'organisent dans les

différentes régions du SNC en répondant à des signaux chimioattractifs notamment CXCL12, CX3CL1 ou la fibronectine, qui diffèrent selon le stade développemental (Hattori, 2022). De plus, elles expriment les métalloprotéinases MMP8 et MMP9 qui remodelent la matrice extracellulaire et favorisent leur entrée dans le cerveau à E9,5, puis des récepteurs comme CX3CR1, CSF1R et VEGFR1 en postnatal (Kierdorf et al. 2013 ; Hoshiko et al. 2012 ; Lelli et al. 2013). La distribution des microglies se fait de manière assez homogène entre les régions corticales, et ce chez la majorité des mammifères (Dos Santos et al., 2020).

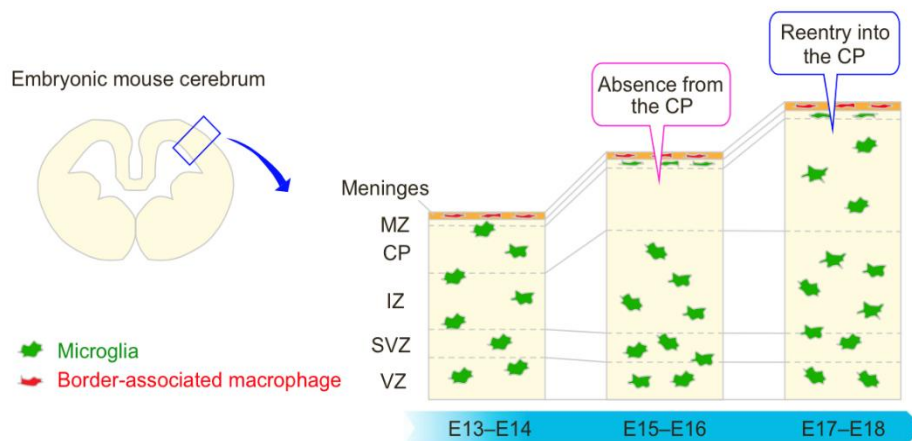


Figure 2 – Colonisation du cortex murin par les microglies

La microglie est distribuée dans le cortex après l'entrée des précurseurs microgliaux. Il y a ensuite une réorganisation des cellules avec des proliférations et migrations entre E13 et E18 qui vont conduire tout de même à une distribution dans les différentes régions des microglies. CP : cortical plate, IZ : intermediate zone, MZ : marginal zone, SVZ : subventricular zone, VZ : ventricular zone. *Source : Hattori 2022, d'après Swinnen et al. 2013*

2. Méninges : immunité et système d'échange

Le SNC a longtemps été considéré comme un tissu immunoprivilégié, c'est-à-dire protégé des risques immuns présents en périphérie, notamment grâce à un système de barrières assuré par la barrière hémato-encéphalique (BHE) et par les méninges. Il est également dépourvu d'un système de drainage lymphatique classique, qui pourrait assurer une surveillance immune, et exprime faiblement les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité. Les méninges s'organisent en différentes couches de protection avec la dure-mère près du crâne, l'arachnoïde et la pie-mère qui borde le parenchyme cérébral. Non seulement les méninges assurent une protection physique entre le cerveau et le crâne, mais elles sont aussi une zone dans laquelle se met en place une immunité très importante. Une étude chez la souris a récemment caractérisé les populations immunes retrouvées dans les différents couches des méninges en condition physiologique, avec la présence de macrophages, de cellules dendritiques, de mastocytes, de neutrophiles et de lymphocytes (B,

T et lymphocytes innés) (Van Hove et al., 2019). Les macrophages des méninges représentent la population immune la plus abondante au sein du SNC et montrent une grande hétérogénéité de profils transcriptomiques, qui reflète la multiplicité de leurs fonctions (Van Hove et al., 2019). Il a longtemps été considéré que ces macrophages des méninges dérivait des monocytes circulants du sang et de la moelle épinière. Il est désormais suggéré que ces macrophages s'installent dans les méninges à des stades développementaux semblables à ceux des microglies dans le SNC, tout en ayant une spécification tissulaire bien différente (Goldmann et al., 2016). Ils pourraient intervenir dans l'homéostasie des méninges, l'élimination des débris et la protection contre les infections.

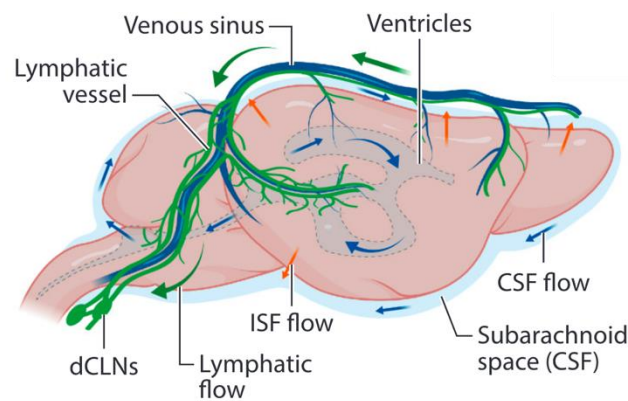


Figure 3 – Organisation générale des systèmes sanguin, lymphatique, liquide céphalo-rachidien et liquide interstitiel.

Les différents systèmes circulatoires permettent d'apporter et d'éliminer des éléments dans toutes les zones du cerveau. Le LCR (flèches bleues) produit dans les ventricules peut rejoindre l'espace sous-arachnoïdien ; zone où le flux glymphatique (flèches rouges) échange avec le LCR. Les systèmes sanguins (vaisseau bleu) et lymphatiques (vert) irriguent l'ensemble du SNC et échangent avec le parenchyme et les autres flux. Liquide interstitiel (ISF), LCR (CSF), Nœud lymphatique cérébral dCLNs.
Source : Alves de Lima et al. 2020

Il existe trois systèmes circulatoires communiquant avec le cerveau : le système sanguin, le système lymphatique et le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Figure 3). Des zones d'échanges protégées entre le parenchyme et les systèmes circulatoires sont permis grâce à la barrière hémato-encéphalique, la barrière méningo-encéphalique et la barrière hémato-céphalo-rachidienne (Alves de Lima et al., 2020). La composition cellulaire de ces barrières est très différente, autorisant divers types d'échanges. Ces systèmes circulatoires permettent de fournir au SNC de nombreux éléments pour son fonctionnement, en particulier énergétiques (principalement du glucose) via le sang ; mais aussi d'éliminer d'autres substances du parenchyme, par exemple des protéines dans le LCR ou des facteurs inflammatoires, voir des antigènes dans la lymphe. Par ces zones d'entrée et de sortie restreintes de molécules, le cerveau reste connecté au reste du corps y compris de manière immune. En effet, les vaisseaux lymphatiques retrouvés au niveau des méninges sont

capables de communiquer avec le LCR de l'espace subarachnoïdien et le liquide interstitiel du parenchyme, et les antigènes cérébraux sont drainés jusqu'aux ganglions lymphatiques cérébraux. Les cellules immunes des méninges présentent par la suite ces antigènes à des lymphocytes T qui ont été activés dans les ganglions lymphatiques (Aspelund et al., 2015).

Un nouveau système circulatoire a été caractérisé en 2012 : le système glymphatique. Dans ce système lymphatique, le drainage lymphatique est assuré par la glie (Iliff et al., 2012). Le système glymphatique permet tout comme le sang, l'apport de certains nutriments dans le parenchyme, mais aussi l'élimination de métabolites et autres déchets (Louveau et al., 2017). Ce système connecte les circulations du LCR et du liquide interstitiel qui vont transiter via les astrocytes et le transporteur aquaporine-4 (AQP4). L'eau et les composés du LCR présents dans la zone péri-artérielle vont passer dans le parenchyme via les astrocytes, rencontrer l'ISF et les éléments de ces deux flux vont ensuite aller dans la zone péri-veineuse et être amenés en périphérie vers les nœuds lymphatiques.

Les méninges et les différents systèmes circulatoires représentent un support, une protection et une zone d'échange avec la périphérie. En condition physiologique, les cellules immunes des méninges ont une fonction essentielle de surveillance immune alors que les microglies, les cellules immunes du parenchyme cérébral, sont en interaction constante avec les neurones et répondent aux changements de l'activité cérébrale en assurant des fonctions régulatrices protectives du parenchyme.

3. Fonction des microglies : du développement à l'âge adulte

La fonction des microglies n'est pas uniquement liée à leur caractère immunitaire. Et en plus de protéger le SNC en contexte pathologique (traumatique, dégénérescence ou infectieux), elles vont assurer de nombreux rôles lors de l'embryogénèse mais aussi à la naissance et à l'âge adulte (Figure 4). Leur impact sur les neurones et l'activité du réseau neuronal commence à être caractérisé. Seulement quelques fonctions des microglies seront évoquées ici (Cserép et al., 2021). Au cours du développement du SNC, les cellules produites en excès vont être enrôlées dans un processus de mort cellulaire programmée (ou apoptose) qui va cibler les cellules précurseurs surnuméraires (Cunningham et al., 2013). La présence de nombreuses cellules apoptotiques représente un signal attractant pour les microglies, que ce soit au cours du développement ou chez l'adulte. Par exemple dans la zone sous-ventriculaire de souris adultes, des microglies, en conditions physiologiques, phagocytent les débris apoptotiques (Sierra et al., 2010). Par ailleurs, les microglies participent activement à

la régulation de la population des cellules précurseurs au cours du développement indépendamment d'un processus de mort cellulaire. Il a notamment été montré, sur un modèle prénatal de primate non humain, que les microglies rejoignent les zones corticales dans lesquelles les neurones prolifèrent le plus, et participent à la phagocytose des précurseurs neuronaux Trb2+ et Pax6+, régulant ainsi la neurogénèse embryonnaire (Cunningham et al., 2013).

A la naissance chez la souris, les microglies sont en interaction avec les synapses et sont capables d'élaguer sélectivement celles dont l'activité est trop faible, dans le but de consolider les circuits neuronaux les plus efficaces. Cette suppression synaptique est dépendante du système du complément avec les protéines C1q et C3 à la synapse et CR3 à la membrane microgliale (Schafer et al., 2012). Inversement, les microglies peuvent favoriser la formation de nouvelles synapses au contact des dendrites, dans le cortex somatosensoriel de jeunes souris, (Miyamoto et al., 2016). Les multiples fonctions des microglies au cours du développement du SNC soulignent leur rôle essentiel dans la formation des connexions nerveuses et l'émergence des réseaux neuronaux.

Cette interaction entre la microglie et les neurones en condition physiologique peut être modulée par l'activité neuronale. Ainsi, chez la larve transgénique de poisson zèbre, l'imagerie confocale *in vivo* de la microglie et des neurones rendus fluorescents a montré que les prolongements microgliaux sont attirés par les neurones qui présentent l'activité spontanée la plus élevée. Inversement, le contact entre une microglie et un neurone en condition physiologique entraîne la réduction d'activité, évoquée ou spontanée, du neurone ciblé (Li et al., 2012). Chez la souris adulte vigile, les contacts entre microglies et épines dendritiques des neurones des cortex somatosensoriel et moteur ont des conséquences sur le niveau d'activité

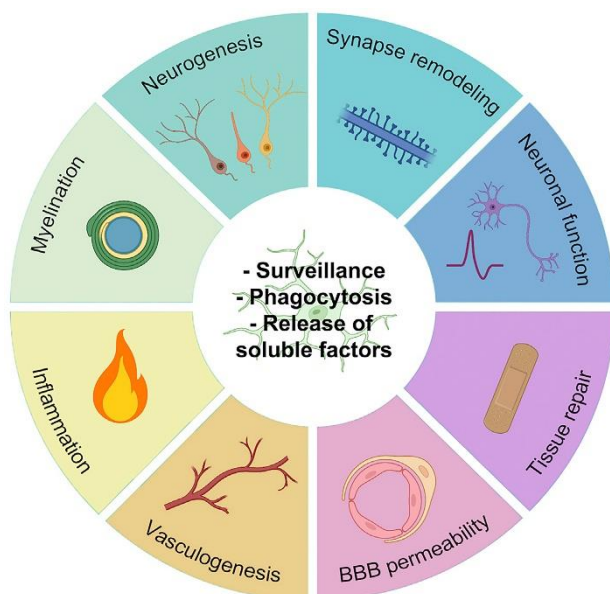


Figure 4 – Différentes fonctions de la microglie.

Résumé des nombreuses fonctions assurées par la microglie dans le SNC, en conditions physiologiques et pathologiques
 Source : Paolicelli et al. 2022

des synapses et leur synchronicité (Akiyoshi et al., 2018). Il a récemment été mis en évidence que l'interaction entre les microglies et les épines dendritiques dépend de l'activité neuronale dans le cortex sensoriel, et est modulée par les états de vigilance, résultant en des changements de la morpho-dynamique microgliale via la voie CX3CR1 (Hristovska et al., 2022). Par ailleurs, lors de l'apprentissage, le remodelage des épines dendritiques participe à la mémorisation de la performance (Bailey and Kandel, 1993). Ce remodelage dendritique est médié par les microglies, comme montré dans un modèle murin dont la déplétion des microglies est inductible sous le contrôle du promoteur CX3CR1. Les souris privées de microglies présentent ainsi des processus de formation et d'élimination des épines altérés après différents tests de mémoire comme le conditionnement de peur et la reconnaissance d'un nouvel objet (Parkhurst et al., 2013). L'étude a aussi mis en évidence que les microglies participent à cette plasticité synaptique lors de l'apprentissage via la libération de BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*).

La communication entre la microglie et les neurones passe par des interactions directes avec contact membranaire, par exemple par la voie de la fractalkine CX3CR1-CX3CL1 ou par des récepteurs purinergiques (P2X4, P2Y12) et adénosine (Cserép et al., 2021; Hristovska et al., 2022). Des facteurs solubles peuvent aussi être impliqués, comme le BDNF, l'interleukine-10 (IL10), l'IL1 β ou le TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*) (Parkhurst et al., 2013; Cserép et al., 2021).

Les microglies ont une morphologie très ramifiée dans leur état homéostatique en conditions physiologiques, et vont utiliser leurs prolongements pour scanner leur environnement et réguler les changements d'activité neuronale en exerçant un contrôle de cette activité. Ces fonctions variées de la microglie chez l'adulte s'inscrivent dans un écosystème de communications complexes dans le SNC et permettent d'assurer non seulement une surveillance du parenchyme (Nimmerjahn et al., 2005), mais aussi un contrôle homéostatique et éventuellement répondre en cas d'atteinte pathologique (Figure 4).

4. Hétérogénéité topographique et dimorphisme sexuel

Les microglies sont distribuées dans l'ensemble du parenchyme, mais elles présentent une grande hétérogénéité selon les régions du cerveau. Leurs profils transcriptomiques ont d'abord été caractérisés chez la souris grâce à des analyses par puces à ADN, qui ont montré des différences régionales majeures dans le striatum, le cortex, le cervelet et l'hippocampe (Grabert et al., 2016). Les différences les plus importantes concernent des gènes impliqués dans le métabolisme (oxydoréduction, glycolyse, chaîne respiratoire mitochondriale) et

l'immuno-surveillance (reconnaissance et dégradation de pathogènes, présentation d'anticorps). Chez l'humain.e, il a récemment été montré des différences régionales entre microglies en cytométrie de masse CyTOF, ainsi que des profils d'expression protéiques distincts entre microglies et cellules immunes périphériques (en provenance du LCR et du sang), avec l'expression de P2Y12 et TMEM119 uniquement dans les microglies (Böttcher et al., 2019).

Il est aussi connu que le vieillissement ou des atteintes pathologiques altèrent les profils transcriptomiques des microglies chez la souris (Grabert et al., 2016; Keren-Shaul et al., 2017). Le vieillissement induit une diminution des capacités d'immuno-surveillance des microglies, dont le niveau, le type et la temporalité de l'atteinte varie selon la région (Grabert et al., 2016). L'étude a mis en évidence une altération du profil transcriptomique lors du vieillissement chez des souris entre 4 mois et 22 mois, avec plus de 80% des gènes immuns dont le transcriptome était modifié, contre seulement 25% pour les gènes liés au bio-énergétisme. De plus, lors du vieillissement les régions du cervelet, cortex, striatum et hippocampe sont affectées de manière différente. Les microglies de l'hippocampe sont celles qui semblent les plus altérées, avec une réduction de l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion et la motilité, dans les mécanismes d'endocytose, phagocytose et réorganisation du cytosquelette, mais aussi dans la détection, l'internalisation et la présentation antigénique. Les auteurs suggèrent que ce vieillissement spécifique de la microglie dans l'hippocampe serait une forme de désengagement dans la surveillance du parenchyme (Grabert et al., 2016). Cette étude a été confirmée par d'autres travaux qui ont caractérisé l'hétérogénéité spatiale et temporelle des microglies (Masuda et al., 2019). Leur approche transcriptomique (single-cell ARN-seq, hybridation *in situ*), protéomique (immunomarquages), et *in silico* (modélisation) a mis en évidence la grande diversité des microglies en conditions développementales, adulte physiologique et pathologique.

L'expression par la microglie d'un panel de récepteurs membranaires, qui est appelé « *sensome* », lui permet de scanner et de répondre à son environnement. Nous venons de voir que les niveaux d'expression de récepteurs immuns (activateurs ou inhibiteurs) sont très différents selon la région et l'âge considéré, ce qui participe à l'hétérogénéité de réponses des cellules.

Dans tout le parenchyme, les microglies sont en équilibre constant entre prolifération et apoptose ce qui va maintenir leur nombre total stable chez la souris et l'humain.e (Askew et al., 2017). Après injection de bromodésoxyuridine (BrdU) dans le cortex de souris jeunes et âgées, le nombre de cellules BrdU+ Iba1+ a été mesuré au niveau de l'hippocampe, du thalamus et du bulbe olfactif. L'étude rapporte qu'en moyenne 0,69% des microglies sont

prolifératives, avec le plus fort taux de prolifération retrouvé dans le gyrus denté avec environ 1%. Chez l'humain.e, 2% des microglies ont été identifiées comme prolifératives par un double marquage Ki67+ Iba1+, sans différence entre matière blanche et matière grise, ni entre individus jeunes (20-35 ans) et âgés (58-79 ans). Enfin, cette forte prolifération est compensée par une entrée en apoptose spontanée des microglies. Une altération de cette voie, soit par suppression des protéine pro-apoptotique (PUMA, BIM) soit par surexpression de protéine anti-apoptotique Bcl2, chez des souris transgéniques dérégule le nombre total de microglies dans toutes les régions corticales étudiées. Cet équilibre entre division et mort par apoptose participe tout au long de la vie au renouvellement des cellules ainsi qu'à leur organisation spatiale.

Lors du vieillissement, des atteintes de la fonction, du nombre et de l'organisation des microglies apparaissent (Harry, 2013). En effet, chez des souris âgées, il a été observé une augmentation du nombre de microglies, mais avec une distribution hétérogène dans les différentes régions, suggérant une dérégulation de la balance division/apoptose. Chez la souris, le rat et l'humain.e, des changements morpho-dynamiques ont été décrits, avec des microglies moins ramifiées et moins motiles ; mais aussi avec des altérations d'expressions protéiques (diminution de CX3CR1, augmentation de CMH-II, CD11b et CD14), ce qui reflèterait un « *priming* » des cellules, c'est-à-dire un état de plus grande sensibilité aux signaux d'activation (Harry, 2013). Enfin, les fonctions microgliales sont impactées, avec une diminution de la neuroprotection en faveur d'une augmentation de la neurotoxicité, ainsi qu'une mise en place retardée de phagocytose avec défaut de dégradation (Yanguas-Casás et al., 2020). Il existe deux principales hypothèses pour expliquer ces mécanismes : (1) les microglies sont réactives et sensibles à des dangers en continu ou (2) les cellules deviennent dystrophiques et sénescents à cause d'un stress oxydatif maintenu, ou de l'augmentation d'éléments toxiques à dégrader lors du vieillissement.

Il est aussi connu que la morphologie, le nombre et certaines fonctions des microglies diffèrent selon le sexe des individus (Han et al., 2021). Ces différences apparaissent au cours du développement, sous influence de la testostérone ou de la progestérone et l'œstradiol. Elles vont moduler la morphologie, la réactivité et le nombre de microglies, et ce de manière différente selon l'âge et la région considérée. Il est aussi reporté un dimorphisme sexuel dans l'expression de certaines protéines (ex : *NFκB regulated genes*, CMH-II, IL10), qui peuvent expliquer les différences fonctionnelles, notamment en terme de capacité de phagocytose avec plus de cellules phagocytaires chez des rates en comparaison aux rats 3 jours après la naissance (P3) (Nelson et al., 2017; Han et al., 2021). Il est aujourd'hui suggéré que ces différences liées au sexe seraient à l'origine d'un biais d'incidence des maladies neurodéveloppementales qui affectent plus d'individus de sexe masculin, tandis que des

maladies neuro-inflammatoires ou neurodégénératives touchent plus d'individus de sexe féminin (Han et al., 2021).

5. Les mécanismes d'internalisation

En tant que macrophages résidents spécialisés, les microglies sont des cellules phagocytaires professionnelles. Une de leur fonction principale est de scanner leur environnement, de détecter d'éventuels signaux de dangers et de débarrasser le parenchyme des débris cellulaires, des agents pathogènes ou des molécules et agrégats potentiellement toxiques. Les microglies sont capables d'utiliser plusieurs mécanismes d'internalisation, séparés en voies phagocytaires et non phagocytaires (Stern et al., 2012) (Figure 5).

Les voies non phagocytaires d'endocytose sont dites clathrine-dépendante ou cavéoline-dépendante selon la protéine impliquée dans la fermeture de l'inclusion membranaire qui forme la vésicule d'endocytose. Ces voies d'internalisation sont aussi médiées par des récepteurs, mais ne va concerner que des particules d'une plus petite taille comme des petits complexes immuns et agrégats d'IgG, et n'implique pas de polymérisation de l'actine. La pinocytose concerne l'entrée de petites molécules solubles dans la cellule, tandis que la macropinocytose concerne l'entrée de grosses particules avec une déformation de l'actine mais dont la voie n'est pas médiée par des récepteurs.

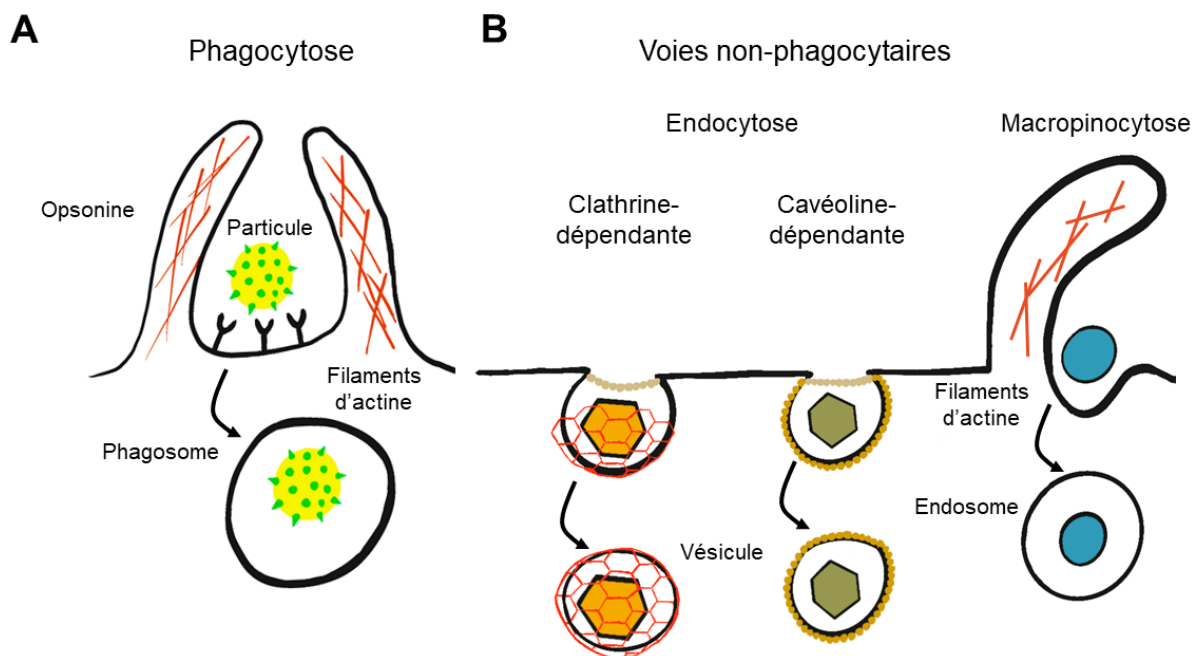


Figure 5 – Voies d'internalisation

A. Phagocytose médiée par des récepteurs. **B.** Processus d'internalisation par voie non phagocytaire. L'internalisation médiée par les cavéolines et clathrines sont des mécanismes d'endocytose, avec une déformation de la membrane sans modification de l'actine, qui sont médiées par des récepteurs. La macropinocytose concerne l'internalisation de grosses particules inertes, sans intervention de récepteurs, mais avec une polymérisation des filaments d'actine. *Adapté de Stern et al. 2012*

La phagocytose est un processus d'internalisation principalement effectué par les cellules dites professionnelles (macrophages, monocytes, cellules dendritiques et neutrophiles), tandis que d'autres voies d'internalisation par endocytose sont possibles pour de très nombreuses cellules chez les mammifères (Hillaireau and Couvreur, 2009). La phagocytose concerne l'internalisation d'éléments de grande taille qui ont été opsonisées, c'est-à-dire recouvertes de molécules telles que le facteur C3 ou d'IgG qui vont faciliter leur reconnaissance comme élément à phagocyter (Tse et al., 2003; Hillaireau and Couvreur, 2009).

La phagocytose se déroule en différentes phases : rencontre avec l'élément à internaliser (signal « *find-me* »), reconnaissance de l'élément et induction de l'internalisation (signaux « *eat-me* » et « *don't eat-me* »), trafic intracellulaire du phagosome puis fusion du phagosome avec les lysosomes en phagolysosome et enfin dégradation et digestion de l'élément (Sierra et al., 2013).

La première étape implique des signaux chemo-attractants comme des purines (ATP, UTP) se liant aux récepteurs P2Y6, ou Cx3Cl1 exprimé par des neurones se liant au récepteur CX3CR1 microglial (Sierra et al., 2013). Ces signaux « *find-me* » donnent un signal d'alerte aux microglies voisines qui indique un stress cellulaire. La détection de ces signaux peut se traduire par un changement morphologique des microglies avec une rétraction des prolongements jusqu'à l'adoption en conditions extrêmes d'une morphologie amiboïde en contexte pathologique ; mais en contexte plus physiologique (développemental ou chez l'adulte sain.e), des microglies ramifiées sont aussi capables de phagocytose en envoyant un prolongement vers la cible.

Dans une seconde étape, la reconnaissance spécifique de l'élément à éliminer dépend de signaux « *eat-me* » qui sont exposés à sa surface, comme la phosphatidylsérine dans le cas d'une cellule apoptotique par exemple. On peut classer ces signaux selon la nature du danger auquel ils sont associés, par exemple des PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*), DAMPs (*Damage-Associated Molecular Pattern*) ou des ACAMPs (*Apoptotic Cell - Associated Cellular Pattern*). Ces motifs moléculaires et cellulaires sont reconnus par les microglies qui expriment une grande diversité de récepteurs notamment des récepteurs dits éboueurs (ou récepteurs *scavenger*), de nombreux récepteurs de la superfamille des immunoglobulines et des récepteurs aux intégrines (Figure 6A) (Sierra et al., 2013). Les microglies sont capables de reconnaître et phagocyter, par exemple, des synapses lors du développement, des débris cellulaires ou de la myéline, des protéines toxiques (amyloïde- β A β , α -synucléine). Si nous prenons l'exemple de phagocytose de neurones apoptotiques, il est connu que des cellules rentrant en apoptose ne présentent plus d'acide sialique à la membrane, ce qui rend accessible le signal « *eat-me* » neuronal C1 reconnu par le récepteur microglial CR3 (Meesmann et al., 2010; Linnartz et al., 2012). Un régulateur « *don't eat-me* »

de cette phagocytose neuronale est le récepteur Siglec-11, qui reconnaît l'acide sialique et empêche une phagocytose neuronale excessive (Wang and Neumann, 2010). Dans des cas où l'élément à phagocyter ne possède pas de signal « *eat-me* », il peut y avoir un processus d'opsonisation, permettant *in fine* de déclencher la déformation de la membrane plasmique par l'actine et former le phagosome (Hillaireau and Couvreur, 2009).

La dernière étape de phagocytose consiste en la dégradation de l'élément internalisé. Le phagosome fusionne avec un lysosome et devient un phagolysosome, ce qui va entraîner l'acidification de la vésicule ($\text{pH} < 5$) et la dégradation l'élément par des hydrolases (Figure 6B). Les conséquences de ce processus de phagocytose seront (1) libération d'espèces réactive d'oxygène (« *respiratory burst* »), (2) la présentation antigénique dans le cas de la phagocytose d'un pathogène, et (3) la sécrétion de facteurs inflammatoires.

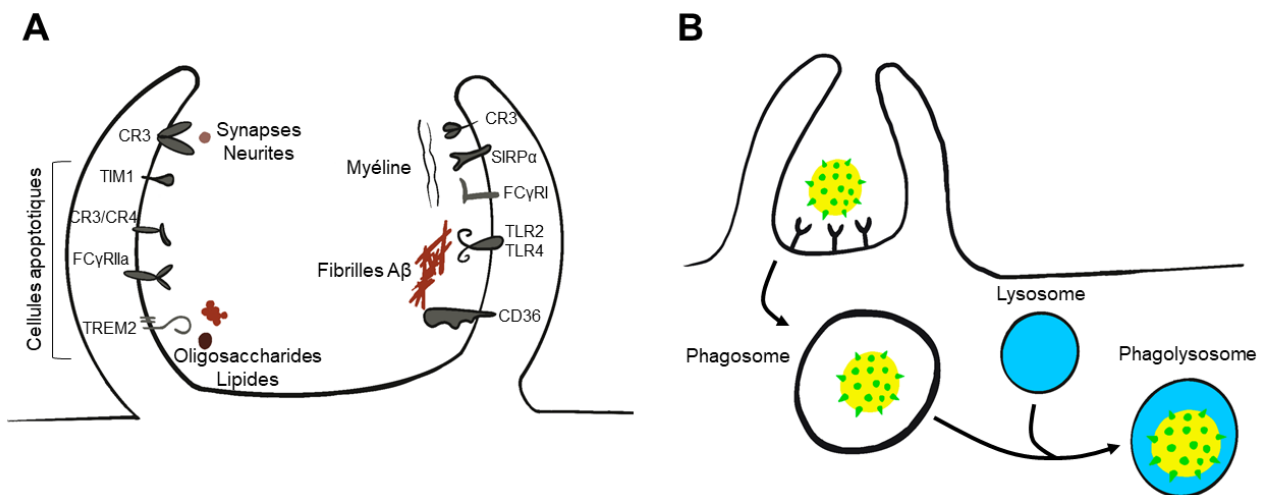


Figure 6 – Phagocytose des microglies.

A. Exemples de récepteurs et corps à phagocyter. **B.** Processus d'internalisation du phagosome, puis formation du phagolysosome et dégradation du contenu par entrée de protons conduisant à son acidification. *Inspiré de : Sierra et al . 2013, Hillaireau et Couvreur 2009*

6. Réactivité et inflammation

Les microglies surveillent dynamiquement le parenchyme, en envoyant leurs prolongements au contact des autres cellules (Nimmerjahn et al., 2005). Les microglies vont rester dans cet état de surveillance, maintenu notamment par des facteurs neuronaux (neurotransmetteurs, neurotrophines, CX3CL1) ou provenant des astrocytes (TGFβ2, IL34/CSF-1, cholestérol), jusqu'à ce qu'elles rencontrent un signal de danger qui les « activerait » (Harry, 2013; Bohlen et al., 2017). Il a longtemps été considéré que, de manière semblable aux macrophages périphériques, les microglies présentent deux principaux états d'activation : pro-inflammatoire M1 et anti-inflammatoire M2 (Harry, 2013). Ces états ont été définis *in vitro*, selon le type d'agent activateur appliqué (M1 : pathogène ou interféron-γ, M2 : IL-4), et résulteraient en différents panels de facteurs sécrétés (cytokines, chimiokines)

(Boche et al., 2013). Les microglies activées, M1 comme M2, perdent leur morphologie ramifiée, pour adopter une morphologie amiboïde, avec un gonflement du soma et la perte de prolongements (Boche et al., 2013).

Cependant, la pertinence d'utiliser cette dichotomie M1/M2 est depuis longtemps débattue, les microglies *in vivo* possèdent des mécanismes de réaction en contextes pathologiques bien différents des macrophages, dont la transition d'état passe par les lymphocytes-T (Th1/2). Par ailleurs, le fait d'instaurer cette classification binaire pour des cellules à grande hétérogénéité ne serait pas adaptée et compromettrait même leur étude (Ransohoff, 2016). La diversité régionale des microglies, leur dimorphisme sexuel, leurs changements lors du vieillissement ou de contextes pathologiques, conduit donc aussi à une grande diversité de profils microgliaux que l'on peut considérer comme un continuum entre pro et anti-inflammatoire (Boche et al., 2013). Certaines études ont tout de même cherché à caractériser des sous-populations de microglies, présentant des particularités structurales ou transcriptomiques propre à des contextes non-physiologiques comme la « *dark microglia* » décrits dans des modèles murins de stress et de vieillissement, présentant des signes de grand stress oxydatif ; ou encore les DAM (*Disease-Associated Microglia*) identifiées comme un sous-type de cellules microgliales phagocytaires dans la maladie d'Alzheimer (Bisht et al., 2016; Keren-Shaul et al., 2017).

Très récemment, une revue coécrite par une centaine de chercheuses et chercheurs experts dans l'étude de la microglie, du stade embryonnaire au vieillissement et en conditions physiologiques ou pathologiques, remettait en perspective notre manière de nommer les microglies (Paolicelli et al., 2022). Le papier demande à arrêter l'utilisation des termes de microglie M1 et M2, mais aussi le terme de microglie « quiescente » caractérisant les microglies en condition physiologique, car il n'est pas adapté pour des cellules aussi dynamiques (Figure 7).

De manière générale, il en ressort qu'essayer de mettre une étiquette sur le « type » de microglie n'est pas souhaitable, qu'il s'agisse par le profil cytokinique ou par le profil transcriptomique. Décrire les niveaux d'expression des transcrits ou des protéines, ou encore décrire l'effet fonctionnel observé, sans conclure sur le contexte « pro ou anti-inflammatoire » permettra une meilleure appréhension des connaissances du domaine. De cette manière, nous ne détaillerons pas les nombreuses études enfermant les microglies dans un état d'activation ou un autre.

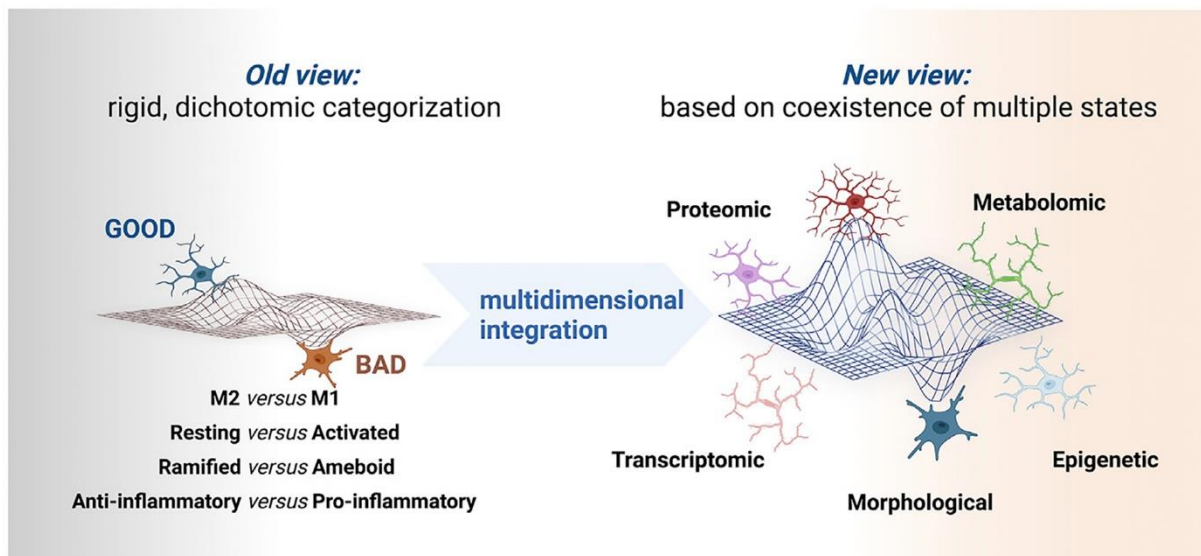


Figure 7– Catégorisation des microglies passées et actuelles.

Les recherches passées sur les microglies ont cherché à caractériser de manière dichotomique les cellules selon leur état d'activation, leur profil inflammatoire, leur morphologie. Mais simplifier une cellule à une vue binaire ne permet pas de refléter la grande complexité de ces cellules. Aujourd'hui, il est nécessaire de reconceptualiser notre manière de classer les microglies, en considérant plusieurs facteurs (morphologique, épigénétique et autres -omics), pour refléter au mieux l'hétérogénéité phénotypique de ces cellules. *Source : Paolicelli et al. 2022*

II. Vascular Endothelial Growth Factor

1. Le VEGF et ses récepteurs

a. Le VEGF

Chez les mammifères, il existe sept protéines dans la famille des VEGFs dont les VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C VEGF-D, ainsi que les PlGF1 (*Placental Growth Factor*) et 2 et l'EG-VEGF (*Endocrine Gland VEGF*). Ils peuvent se lier à trois récepteurs à activité tyrosine kinase : VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3 ainsi qu'à des corécepteurs de la famille des neuropilines (NRP1 et NRP2), et à des héparanes sulfate protéoglycanes (HSPG). Par souci de concision, nous nous focaliserons sur le VEGF-A, nommé à présent VEGF, dont les principaux travaux en neurobiologie ont été décrits dans plusieurs revues (Ruiz de Almodovar et al., 2009; Wittko-Schneider et al., 2013). Le VEGF ou facteur de croissance de l'endothélium vasculaire est le membre fondateur de cette famille et a été initialement découvert comme un facteur de perméabilité vasculaire (Senger et al., 1983). Par la suite, il a montré des implications dans la vasculogénèse et l'angiogénèse, révélant l'importance d'une fine régulation de son expression pour la survie et un développement physiologique (Carmeliet et al., 1996). En effet, une étude a mis en évidence sur des cellules souches embryonnaires murines VEGF^{+/+} ou VEGF^{-/-}, avec un développement vasculaire dès E8,5 respectivement

anormal et désorganisé ou quasi-inexistant. La suppression d'un allèle codant pour le VEGF induit une mort embryonnaire, montrant que la fonction du VEGF lors du développement requiert une dose minimale du facteur. Une expression du VEGF diminuée de 40% par suppression chez la souris d'une région régulatrice de la transcription, entraîne 60% de mort avant ou à la naissance, et chez les 40% restants des troubles neuromusculaires ainsi qu'une croissance réduite (Oosthuysen et al., 2001). De ces travaux, il a été conclu que le VEGF est important dans la vasculogenèse, l'angiogenèse et l'arborisation vasculaire par formation d'interconnexions.

Il s'agit d'une protéine ayant trois principaux domaines : une partie hydrophobe, une partie assurant la liaison à ses récepteurs et potentiellement un domaine de liaison aux héparines (HBD) (Figure 8). Le VEGF subit un épissage alternatif qui conduit à des isoformes de 121 à 206 acides aminés chez l'humain, 120 à 205 acides aminés chez la souris, qui contiennent toutes les régions permettant la liaison aux récepteurs VEGFR1 et R2 ainsi que l'un des domaines de liaison à NRP1.

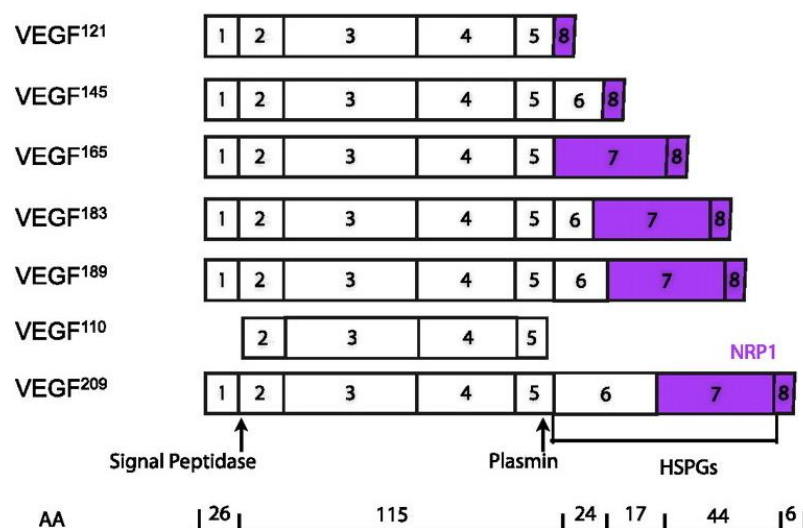


Figure 8 -Isoformes du VEGF

Les numéros correspondent aux différents exons réarrangés lors de l'épissage alternatif et la maturation dans le réticulum endoplasmique. Les exons 1 et 2 codent la région hydrophobe, les exons 3 et 4 le domaine de liaison aux récepteurs (VEGFR1/2/3), les exons 6 et 7 sont les domaines HBD pour la liaison aux héparines et HSPG ; les exons 7 et 8 (violet) permettent la liaison au récepteur Neuropilin 1 (NRP1). Source : Ruiz de Almodovar et al. 2009.

Ces isoformes diffèrent par la présence ou l'absence de domaines HBD (Figure 9) qui déterminent leur capacité à lier les héparanes sulfates des protéoglycanes (HSPG) de la matrice extracellulaire entourant la cellule sécrétrice (Robinson and Stringer, 2001). La présence ou non d'HBD va moduler leur capacité de diffusion du VEGF, de celui diffusant librement (VEGF₁₂₁) au moins diffusible (VEGF₁₈₉), et conduire à leur répartition en gradient (Figure 9). En effet, une première étude a observé une altération du réseau vasculaire du tube neural d'embryons de souris (de E9,5 à E13,5) n'exprimant que le VEGF₁₂₀ (Ruhrberg et al.,

2002). Chez ces souris, les cellules endothéliales venaient agrandir les vaisseaux préexistants, sans créer de nouveaux branchements vasculaires. Les auteurs ont ensuite répété l'expérience, avec cette fois-ci l'expression uniquement du VEGF₁₈₈, et ont observé au contraire de nombreux petits vaisseaux, sans élargissement des vaisseaux déjà formés. Enfin, un modèle hétérozygote VEGF_{120/188} présentait un phénotype semblable aux embryons WT. On en comprend donc que le VEGF₁₂₀ va rester à proximité des cellules sécrétrices et entraîner leur prolifération, tandis que le VEGF₁₈₈ va se trouver à distance et stimuler l'élongation des vaisseaux et leur arborisation. Le gradient de distribution des isoformes du VEGF est donc indispensable à la mise en place d'un système vasculaire fonctionnel, conditionnant à la fois la taille des vaisseaux ainsi que leurs niveaux de ramification.

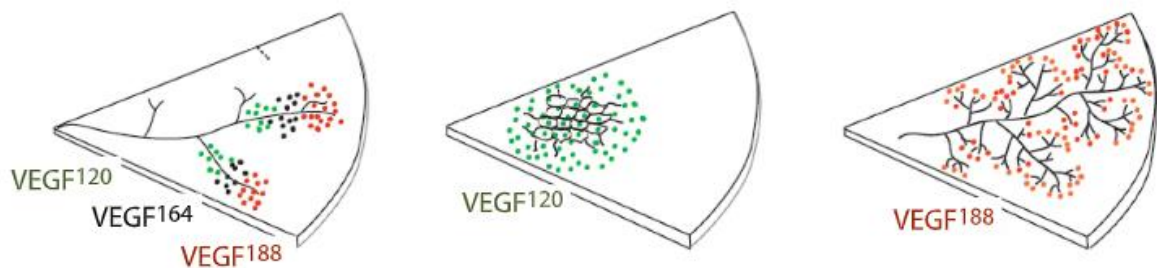


Figure 9 – Distribution des isoformes du VEGF et rôle dans l'angiogenèse.

Les isoformes du VEGF se distribuent selon un gradient à partir de la cellule sécrétrice, avec une diffusion importante du VEGF₁₂₀, partielle pour le VEGF₁₆₅ et faible pour le VEGF₁₈₈ qui restera dans la matrice extra-cellulaire proche. Chez des souris n'exprimant que le VEGF₁₂₀, les cellules endothéliales forment de des vaisseaux avec un lumen de taille importante et rectilignes, avec peu de branchements formés. Chez des souris n'exprimant que le VEGF₁₈₈, il y a de très nombreux petits vaisseaux avec un lumen diminué. *Source : Ruiz de Almodovar et al. 2009.*

Des travaux ont mis en évidence l'existence d'autres variants du VEGF, ayant une partie C-terminale différente et conduisant aux formes appelées VEGF_{xxx}b (Woolard et al., 2004). Cette étude a identifié les isoformes 121b, 145b, 165b et 189b, exprimés en proportions variables par des cellules endothéliales ; mais retrouvés très faiblement dans les tumeurs malignes par rapport aux bénignes. De cette observation, l'équipe a cherché à déterminer si ces isoformes VEGF_{xxx}b avaient des propriétés et mécanismes propres. Sur différentes lignées cellulaires humaines (endothéliales : HUVEC, HMVEC ; ou CHO transfectées VEGFR2), il a été montré que le VEGF₁₆₅b est (1) en compétition avec VEGF₁₆₅ pour la liaison du VEGFR2, (2) diminue l'activation de la voie du VEGFR2 (autophosphorylation, MAPK, AKT) et (3) diminue l'angiogenèse. Quelques travaux ont depuis étudié le VEGF₁₆₅b, principalement pour son rôle anti-angiogénique, mais la grande majorité des papiers s'est focalisé sur les voies et mécanismes du VEGF₁₆₅.

b. Les récepteurs et corécepteurs du VEGF

Le VEGF est capable de se lier aux récepteurs VEGFR1 et VEGFR2. Ces récepteurs sont indispensables au développement du système vasculaire car leur perte d'expression est létale. Le modèle murin VEGFR1-KO a mis en évidence la nécessité du récepteur VEGFR1 dans le développement et la survie des embryons, puisque celui-ci a un rôle régulateur des cellules endothéliales lors de la formation du système vasculaire (Fong et al., 1995). Les VEGFR1 (aussi appelé FLT1) et VEGFR2 (KDR chez l'humain.e ou FLK1 chez la souris) sont composés d'un domaine extracellulaire avec sept domaines d'homologie aux immunoglobulines (Ig-like), d'une partie transmembranaire, et de deux domaines à activité tyrosine kinase intracellulaires (Koch et al., 2011) (Figure 10A). Les VEGFR1 et VEGFR2 peuvent s'homo-dimériser ou s'hétéro-dimériser entre eux par leur domaine Ig-like 4 à 7 suite à une stimulation par le VEGF, et la formation de ces dimères est un prérequis à leur activation (Huang et al., 2001). Ces dimères peuvent également s'associer à des corécepteurs comme les neuropilines 1 (NRP1) et 2 (NRP2) ou les HSPG qui les stabilisent.

Les NRP1 et NRP2 sont des protéines transmembranaires, sans domaine tyrosine kinase, identifiés initialement comme récepteurs des Sémaphorines de classe 3 (SEMA3) (Wild et al., 2012). Ils possèdent aussi un domaine de liaison au VEGF, sur lequel le facteur se fixe avec une grande affinité. Cette fixation va augmenter la signalisation VEGFR2. Cependant, il a été montré que NRP1 et VEGFR1 entrent en compétition pour la liaison au VEGF₁₆₅, et donc que le corécepteur NRP1 n'augmente pas la signalisation du VEGFR1 mais plutôt la régulerait (Fuh et al., 2000). Les HSPG sont aussi des corécepteurs majeurs des VEGFR, puisque leur chaîne héparane sulfate peut se lier avec les HBD du VEGF (Koch et al., 2011). Les HSPG augmentent l'amplitude et la durée de la signalisation du VEGFR2, mais leur lien avec l'activation du VEGFR1 n'est pas encore établi (Koch et al., 2011). Il a tout de même été montré *in vitro* que le VEGFR1 interagit directement avec l'héparine, et par extension avec les HSPG, tandis que le VEGFR2 n'est capable de lier l'héparine qu'après une stimulation au VEGF (Teran and Nugent, 2015). L'association de ces complexes de récepteurs permet de réguler leur activation, en stabilisant ou compétitant avec le VEGF, et les voies de signalisation induites.

Le VEGF se lie aux domaines Ig-like 2 et 3 des VEGFR1 et 2 et son affinité de liaison au VEGFR1 ($K_D = 16 \text{ pM}$) est bien plus forte qu'au VEGFR2 ($K_D = 760 \text{ pM}$), mais induit une autophosphorylation et donc l'activation de VEGFR1 à des niveaux minimes en comparaison du VEGFR2 (Waltenberger et al., 1994). C'est pourquoi le VEGFR2 est considéré comme le médiateur principal du VEGF, mais aussi car l'absence du domaine intracellulaire de VEGFR1

chez la souris n'induit pas d'altération de l'angiogenèse (Hiratsuka et al., 1998). Il est suggéré que le VEGFR1 agirait comme un leurre en séquestrant le VEGF et en atténuant la signalisation du VEGFR2, comme le montre la prolifération excessive des cellules endothéliales des embryons sans VEGFR1 (Fong et al., 1995).

c. Les voies de signalisation du VEGF

Les VEGFR ont des capacités de liaison et des affinités différentes pour les formes de VEGF (Figure 10A). Le VEGF (VEGF-A) est capable de se lier au VEGFR1, VEGFR2 mais aussi à l'hétérodimère VEGFR1/2. Les VEGF-B et PlGF sont uniquement capables de se lier au VEGFR1 ; tandis que les VEGF-C et VEGF-D peuvent activer le VEGFR2. L'activation des récepteurs par le VEGF implique leur dimérisation, l'autophosphorylation des résidus tyrosyls des domaines intracellulaires, puis le recrutement de protéines kinases via leur domaine Src homology 2 (SH2). Ces différentes étapes mettent en jeu des cascades de signalisation spécifiques en aval. Il est important de rappeler que la capacité d'autophosphorylation du domaine intracellulaire de VEGFR1 est beaucoup plus faible que celle de VEGFR2 (Waltenberger et al. 1994 ; Huang et al. 2001).

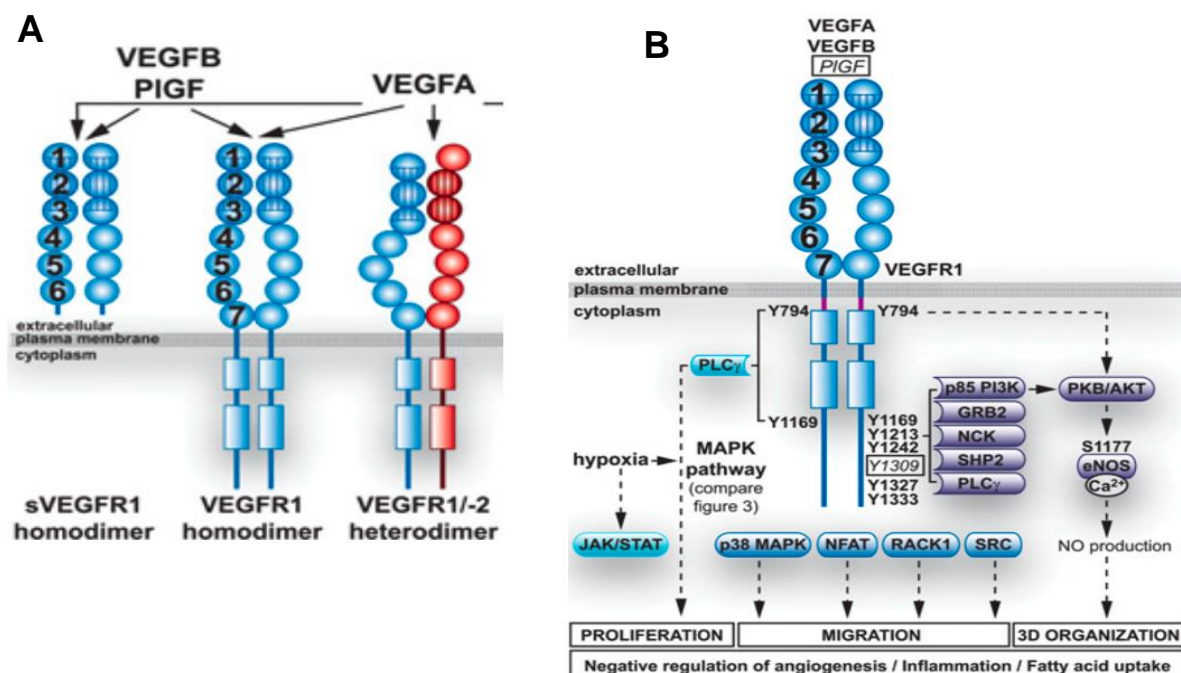


Figure 10 - Ligands et signalisation du VEGFR1.

A. Le VEGFR1 est capable de s'homo-dimériser, ou de s'hétéro-dimériser avec le VEGFR2. Les deux formes peuvent lier différents VEGF, notamment le VEGF-A. **B.** La fixation d'un ligand au VEGFR1 induit la phosphorylation des résidus tyrosines ; qui à leur tour vont déclencher plusieurs voies, dont principalement MAPK et AKT. Ces voies ont été identifiées sur des cellules endothéliales et induisent prolifération et migration. *Source : Koch et al. 2011.*

Pour cette raison, l'activation du VEGFR2 a été grandement étudié (Koch et al., 2011). Les principaux résidus tyrosines qui vont être phosphorylés suite à la stimulation du récepteur sont : Y951, Y1054, Y1059, Y1175 et Y1214. Tyr1054 et Tyr1059 sont importants pour l'activation du récepteur, et pour induire les autophosphorylations des autres résidus. La phosphorylation de Y951 est capable de recruter la protéine SRC, qui va par la suite moduler la migration des cellules endothéliales. Quant au résidu Tyr1175, sa phosphorylation conduit à l'activation de deux voies : Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/ Protéine kinase B (PKB ou AKT) et Phospholipase C γ (PLC γ)/ *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK), impliquées respectivement dans la survie et la prolifération des cellules endothéliales. Cependant, la vision selon laquelle le VEGFR1 servirait uniquement de régulateur du VEGFR2 est fortement contrebalancée par des effets notables de l'absence du VEGFR1 et/ou de sa signalisation (Fong et al., 1995; Hiratsuka et al., 1998).

Les sites de phosphorylations et les protéines se liant au VEGFR1 ont été identifiés par plusieurs équipes et sont résumés dans la figure 10B. Une stimulation au VEGF entraîne la phosphorylation des résidus tyrosines 1169, 1213, 1242, 1327 et 1333 (Sawano et al., 1997; Igarashi et al., 1998; Ito et al., 1998). Le résidu Y1309 a été trouvé comme étant phosphorylé suite à une stimulation par le PIGF spécifiquement (Autiero et al., 2003).

Avec l'identification des résidus, il a été cherché quelles protéines possédant un domaine SH2 pouvaient se fixer aux domaines tyrosine kinase du VEGFR1 (Igarashi et al. 1998; Ito et al. 1998 ; Sawano et al. 1997). L'approche choisie dans ces travaux a été de générer des mutations des résidus tyrosines, et d'identifier les protéines capables d'interaction directe avec le domaine tyrosine kinase du VEGFR1 (Figure 10B). Parmi les protéines trouvées, certaines comme PLC γ , p85 (PI3K), NCK (*Non-catalytic kinase*), GRB2 (*Growth factor receptor bound protein 2*) et SHP2 (*Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2*) sont aussi impliquées dans les voies en aval du VEGFR2. La phosphorylation des résidus Y1169, Y1213 et Y1333 entraîne le recrutement de la PLC γ (Sawano et al., 1997; Igarashi et al., 1998; Ito et al., 1998). La phosphorylation Y1213 semble ensuite activer plusieurs voies, grâce au recrutement d'autres protéines de signalisation comme p85 PI3K, qui vont moduler les capacités migratoires de la cellule (Igarashi et al., 1998; Ito et al., 1998). D'autres voies activées ont été identifiées, sans déterminer les résidus phosphorylés ni les messagers cellulaires, avec par exemple l'induction de phosphorylations SRC via le VEGFR1 après une stimulation au VEGF sur cellules cancéreuses (Lesslie et al., 2006). Les autres ligands du VEGFR1 induisent des réponses différentes, comme le VEGF-B qui stimule la voie PI3K/AKT/mTOR dans le myoblaste, ou encore le PIGF (via la phosphorylation de Y1309) qui conduit à l'activation d'une voie AKT au sein des cellules endothéliales (Autiero et al., 2003; Ling et al., 2021). Contrairement au VEGFR2, le lien entre l'activation d'une voie du VEGFR1

particulière (PLC γ , PI3K, SRC, AKT) et une réponse biologique donnée est moins évident (Koch et al., 2011). Dans les cellules endothéliales, le recrutement de PLC γ par Y1169 conduirait à la prolifération cellulaire ; la voie PI3K/AKT/PKB serait responsable de la formation d'oxide nitrique (NO) conduisant au réarrangement 3D des cellules, tandis que l'activation des voies MAPK et SRC sont liées à la migration cellulaire, par des messagers intermédiaires inconnus (Figure 10B).

d. Régulation de l'expression et de l'activation des récepteurs

Il a été montré que l'expression du VEGF était notamment régulée dans des cas de diminution de l'apport en oxygène ou d'hypoxie. En réponse à cette diminution, des facteurs angiogéniques tels que le VEGF sont sécrétés pour compenser l'hypoxie (Ruiz de Almodovar et al., 2009). Cette régulation met en jeu un facteur de transcription induit par l'hypoxie (HIF), qui va stimuler la synthèse des ARN messagers (ARNm) du VEGF en s'associant à la séquence HRE (*Hypoxia Responsive Element*) du promoteur, en amont du gène *VEGF-A*. D'autres séquences du promoteur liant des facteurs de transcription de la famille Sp sont sensibles à de nombreux signaux comme des facteurs de croissance, des cytokines, des hormones ou un stress oxydatif. L'ensemble de ces signaux induit une augmentation de l'expression du VEGF (Pages and Pouyssegur, 2005). Enfin, les récepteurs au VEGF comme le VEGFR1, mais pas le VEGFR2, sont également régulés par l'hypoxie, en réponse au facteur HIF-1 α , qui va conduire à une augmentation de la production du récepteur (Gerber et al., 1997).

L'épissage alternatif de l'ARNm de VEGFR1 conduit à la production d'un fragment soluble sVEGFR1, qui exerce une régulation de l'activation des voies VEGFR1 et VEGFR2 (Kendall and Thomas, 1993). Cette protéine soluble possède les domaines Ig-like extracellulaires et une partie du domaine transmembranaire sans les domaines tyrosine kinase. Comme le VEGFR1, le sVEGFR1 exerce un contrôle négatif sur la voie du VEGFR2, et deux hypothèses permettent d'expliquer son mécanisme d'action : (1) soit le sVEGFR1 agit comme un leurre qui empêche la fixation du VEGF à son récepteur VEGFR2, ou (2) le sVEGFR1 s'hétéro-dimérise avec le VEGFR2 et limite ainsi sa signalisation (Wittko-Schneider et al., 2013). Plusieurs études considèrent donc que le sVEGFR1 agit comme un antagoniste du VEGF.

Certains groupes ont proposé que le sVEGFR1 pourrait être produit par un processus de clivage du récepteur membranaire. Un premier clivage proche de la partie transmembranaire libérerait le fragment N-terminal soluble (sVEGFR1) et serait effectué par des métalloprotéases dont la nature est débattue, impliquant probablement les ADAM10/17

(*A Disintegrin and Metalloproteases*) et MMP4 (*Matrix MetalloPeptidase*) (Rahimi et al., 2009; Raikwar et al., 2014, 2016, 2018; Han et al., 2015). Suite à ce clivage, le fragment restant C-terminal arrimé à la membrane pourrait être clivé par la γ -sécrétase, mais ce processus est aussi discuté (Rahimi et al., 2009; Cai et al., 2011; Raikwar et al., 2016). Ces différents groupes ont identifié des sites de clivage différents, qui nécessitent ou non l'activation du VEGFR1 pour initier son clivage (Cai et al., 2011; Han et al., 2015; Raikwar et al., 2016, 2018).

Pour déterminer si le contrôle négatif exercé par sVEGFR1 au cours de l'embryogenèse est suffisant ou si la présence du récepteur à la membrane est nécessaire, une forme tronquée de VEGFR1, sans les domaines transmembranaire et tyrosine kinase, a été produite chez la souris (VEGFR1-TM-TK^{-/-}). Cette modification génétique est responsable de la mort de 50% des souris au stade embryonnaire et suggère que la séquestration du VEGF à la membrane est indispensable à une signalisation adéquate de ce ligand au cours de l'embryogenèse (Hiratsuka et al., 2005).

Un autre mécanisme de régulation des voies du VEGFR1 et VEGFR2 consiste en l'internalisation de ces récepteurs suite à leur activation (Koch et al., 2011). L'importance de ce mécanisme a particulièrement été étudié sur le VEGFR2, où l'activation du récepteur entraîne son internalisation dépendante de la clathrine, puis, soit sa dégradation soit son ré-adressage à la membrane (Lampugnani et al., 2006; Koch et al., 2011). De manière intéressante, l'internalisation dans les vésicules d'endocytose fait partie intégrante de la régulation des signalisations par PLC γ et p44 MAPK (Lampugnani et al., 2006). Sur des cellules endothéliales, il a été montré qu'après une stimulation au VEGF, le VEGFR1 est retrouvé dans des vésicules d'endocytose (Kobayashi et al., 2004). Le mécanisme sous-jacent identifié est que le résidu tyrosine 1333 du VEGFR1 activé va lier les protéines c-Cbl et CD2AP qui vont entraîner l'internalisation du récepteur. Les auteurs suggèrent que l'implication de c-Cbl serait le signe d'une endocytose médiée par les clathrines, avant une dégradation protéolytique du récepteur.

Si l'on considère l'ensemble de ces études, on peut en déduire que l'expression du VEGFR1 à la membrane est nécessaire à l'ancrage du VEGF et au contrôle de la signalisation du VEGFR2 des cellules endothéliales. Il permet ainsi une régulation fine de la voie du VEGF qui est indispensable au développement du système vasculaire et à l'angiogenèse. De plus, des cellules comme les macrophages qui n'expriment que le VEGFR1 n'ont pas de possibilité de compensation par une activation du VEGFR2. Ainsi, l'absence du domaine intracellulaire de VEGFR1 chez la souris (VEGFR1-TK^{-/-}) perturbe la capacité de migration des macrophages qui est stimulée par le VEGF (Hiratsuka et al., 1998). L'intégrité de la voie de signalisation du VEGFR1 est donc requise pour médier l'effet du VEGF.

2. Le VEGF dans le système nerveux adulte, implication du VEGFR1

a. Expression du VEGF et VEGFR1 dans le SNC du développement à l'âge adulte

La voie de signalisation du VEGF classiquement mise en jeu dans les processus d'angiogenèse et de neurogenèse est celle du VEGF-VEGFR2 (Wittko-Schneider et al., 2013). Cependant, le VEGFR1 est également impliqué dans ces deux processus en conditions physiologiques ou pathologiques, au cours du développement et chez l'adulte.

Au cours du développement du SNC, le VEGF exerce à la fois un effet sur les vaisseaux sanguins en orchestrant leur formation et leur croissance, et sur les progéniteurs neuronaux en régulant leur migration et le guidage de leur axone. Son expression est responsable d'une intense prolifération des cellules endothéliales dans le plexus choroïde, mais aussi de la prolifération et la survie des progéniteurs neuronaux dans les zones germinales (Breier et al., 1992). A des stades développementaux plus tardifs, le VEGF ainsi que les VEGFR1 et VEGFR2 sont exprimés et libérés dans différentes régions comme le cortex, le cervelet, le gyrus denté et la région CA1 de l'hippocampe, avec une expression complémentaire des récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 (Licht et Keshet 2013 ; Yang et al. 2003 ; Ruiz de Almodovar et al. 2010). Le VEGF peut être exprimé par des neurones, des astrocytes ou des cellules endothéliales (Marti et Risau 1998 ; Maharaj et al. 2006).

Dans le cerveau adulte, un groupe a démontré que dès lors que le système vasculaire est formé, le VEGF n'est plus indispensable au maintien des vaisseaux (Licht et al., 2011). Cependant, dans cette étude le blocage du VEGF chez la souris adulte ne modifie pas la neurogenèse et la perfusion de l'hippocampe, mais mène à l'apparition de troubles mnésiques, démontrant les différentes fonctions assurées par le facteur. Son expression doit de cette manière être maintenue même à l'âge adulte. Les récents progrès dans la transcriptomique ont permis de classer les gènes exprimés en fonction des types cellulaires et des régions du cerveau. Un principe d'organisation régional commun est retrouvé chez la souris, le porc et l'humain.e, mais des variations d'expression importantes sont observées entre les espèces selon les structures du cerveau (Sjöstedt et al., 2020). L'expression des transcrits du VEGF a été caractérisée par hybridation *in situ*, et l'ARNm du VEGF a été retrouvé dans le cortex et l'hippocampe, mais aussi dans le bulbe olfactif et le plexus choroïde (Marti et Risau 1998 ; Schänzer et al. 2004).

En se basant sur les papiers répertoriés dans les bases de données issues de séquençage ARN de cerveau (brainrnaseq.org) de l'université de Stanford, il est possible d'avoir une idée plus précise des types cellulaires exprimant certaines formes du VEGF et le

VEGFR1, et du niveau d'expression en fonction du stade de développement chez la souris (Zhang et al., 2014; Bennett et al., 2016). Les transcrits du VEGF sont en grande majorité retrouvés dans les astrocytes, puis à des taux plus minimes dans des neurones et précurseurs des oligodendrocytes (Figure 11A) (Zhang et al., 2014). Dans les cellules myéloïdes, on peut noter une expression du VEGF qu'au stade embryonnaire (E17) mais à des niveaux extrêmement faibles (Figure 11B) (Bennett et al., 2016). Ces nouvelles données de transcriptomique confirment des données d'hybridation *in situ* plus anciennes et montrent que les principales cellules exprimant le VEGF dans le SNC murin adulte sont les astrocytes (Marti and Risau, 1998). Les neurones sont également capables d'exprimer le VEGF, mais à des niveaux bien plus faibles.

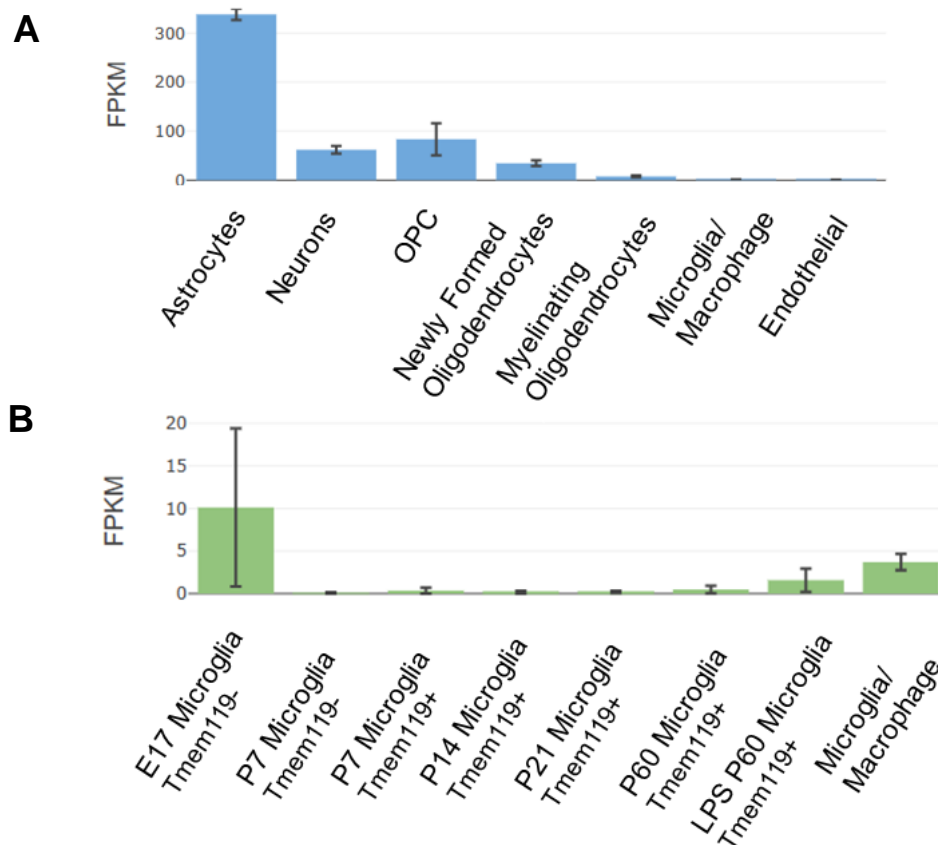


Figure 11 – Niveaux transcriptomiques du VEGF chez la souris.

A. Niveau des transcrits ARNm du VEGF-A chez la souris dans différents types cellulaires. Data de Yang et al. 2014. **B.** Niveau des transcrits ARNm du VEGF-A par les cellules myéloïdes chez la souris au cours du développement, ou en cas de stimulation au lipopolysaccharide (LPS). Data de Bennett et al. 2016. Exprimé en FPKM : fragments par kilobase de transcrits par million (fragments per kilobase million) et nTPM : transcrits par million normalisés (normalized transcripts per million). Source : Yang et al. 2014, Bennett et al. 2016, [Brain RNA-Seq \(brainrnaseq.org\)](http://brainrnaseq.org)

Chez l'humain.e, il est possible de se référer à l'Atlas des Protéines Humaines (proteinalas.org) pour obtenir le détail des expressions dans les différentes parties du SNC ainsi que les différents types cellulaires concernés (Sjöstedt et al., 2020). L'ARNm du VEGF est assez ubiquitaire dans le SNC, avec une expression prépondérante dans les ganglions de la base, l'hippocampe, le cortex cérébral et le cervelet (Figure 12A). Le VEGF est exprimé presque exclusivement par les astrocytes et les précurseurs oligodendrocytes, puis à des niveaux plus modestes par les neurones (excitateurs et inhibiteurs) (Figure 12B).

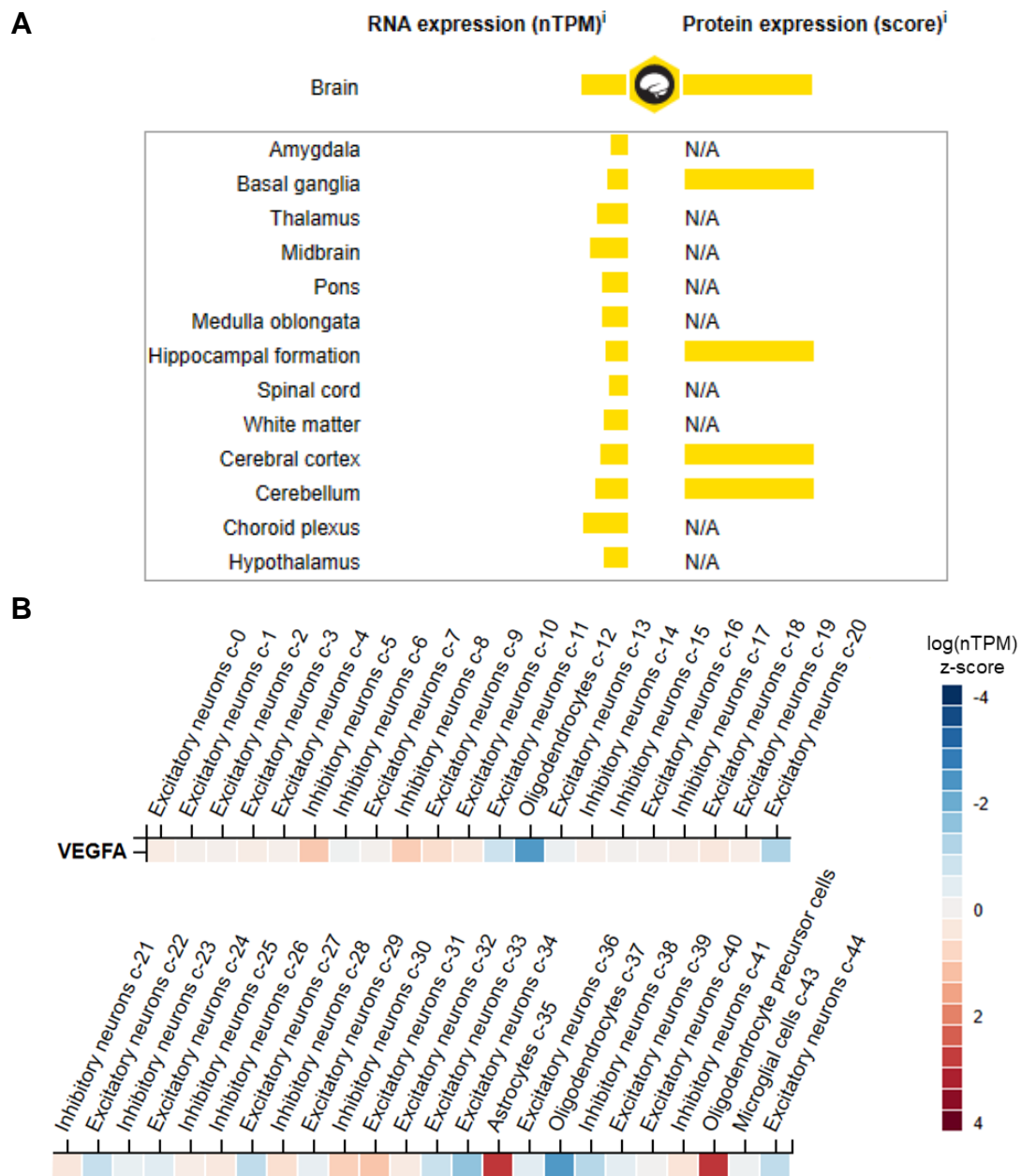


Figure 12 – Expression régionale et cellulaire du VEGF dans le SNC humain

A. Niveau des transcrits du VEGF-A dans les différentes régions du SNC humain, et niveau d'expression protéique déterminé à partir de marquages immunohistochimiques (score moyen). **B.** Analyse unicellulaire des niveaux d'ARNm du VEGF dans le SNC, représenté en Z-score ($\log(\text{nTPM})$ z-score). Exprimé nTPM : transcrits par million normalisés (normalized transcripts per million). Source : proteinalas.org

En complément des données transcriptomiques, il est nécessaire de valider l'expression du VEGF en détectant la protéine. D'autres travaux se sont appuyés sur le modèle de souris VEGF-LacZ, un système où le VEGF est associé au gène codant la β -galactosidase comme gène rapporteur, et après ajout de XGal révélant une couleur bleue aux sites d'expression du VEGF (Maharaj et al., 2006; Licht and Keshet, 2013). Chez les souris adultes, l'expression du VEGF a été observée dans le plexus choroïde, le bulbe olfactif, le cervelet, mais aussi dans la formation hippocampique (Gyrus Denté et CA1) et la zone sous-ventriculaire. L'expression du VEGF, notamment au niveau de l'hippocampe, a aussi été confirmée par marquage protéique par immunohistochimie et immunofluorescence sur des cerveaux de rat (Cao et al., 2004). Chez l'humain.e, uniquement les marquages immunohistochimiques du cortex, hippocampe, cervelet et ganglions de la base montraient la présence du VEGF, ce qui diffère donc beaucoup des résultats transcriptomiques (Figure 12A).

Le profil d'expression transcriptomique du VEGFR1 chez la souris montre que ce récepteur est très fortement exprimé par les cellules endothéliales et à des niveaux bien plus modestes par les microglies, chez l'embryon comme chez l'adulte (brainrnaseq.org) (Bennett et al., 2016). Chez l'humain.e, on observe une faible spécificité régionale car les transcrits du VEGFR1 sont présents dans l'ensemble des régions du cerveau analysées et exprimés très fortement par les microglies et les cellules endothéliales. Quelques types de neurones inhibiteurs l'expriment aussi faiblement. Son expression protéique est observée dans les neurones chez le rat à la naissance, uniquement dans le striatum, le cortex et hippocampe, puis diminue jusqu'à disparaître au 3^{ème} mois postnatal (Yang et al., 2003). Peu d'études se sont intéressées à la localisation du VEGFR1 dans le SNC humain en conditions physiologiques, cependant le récepteur a été retrouvé dans le cortex cérébral (Harris et al., 2018).

b. Modulation de l'expression en hypoxie

Comme nous l'avons vu précédemment, le facteur de transcription HIF1 est un régulateur essentiel de la transcription du VEGF et du VEGFR1 en condition hypoxique. Dans ce cas-ci, la production du VEGF est rapidement stimulée au niveau du gyrus denté (GD), par les cellules gliales et les neurones, comme l'expression du VEGFR1 (Marti and Risau, 1998). Cette induction de l'expression du VEGF via le facteur de transcription HIF1 est également observée dans l'hippocampe chez le rat lorsque l'environnement des animaux est enrichi ou lors de séances d'entraînement en piscine de Morris (Cao et al., 2004). La protéine HIF1 est en effet fortement induite dans le cerveau en réponse à un enrichissement de l'environnement (Rampon et al., 2000). Il a aussi été mis en évidence qu'en réponse à des antidépresseurs,

les taux de VEGF augmentent dans l'hippocampe chez le rat adulte et stimulent la neurogénèse. Ces effets fonctionnels mettent en jeu cette fois la voie du VEGFR2 et s'accompagnent d'un changement du comportement avec un effet antidépresseur (Warner-Schmidt and Duman, 2007). Ces études montrent que le VEGF dans le cerveau adulte est un médiateur clé à l'interface de différentes voies, où l'implication cellulaire de VEGFR1 dépendrait de l'induction et de la stabilité de HIF1, alors que celle de VEGFR2 interviendrait dans d'autres processus comme la neurogénèse.

c. Effets fonctionnels du VEGF et de la voie VEGF-VEGFR1

Des études de surexpression locale du VEGF par injection directe de la protéine ou transfert de vecteur viral *in vivo* ont pour la première fois mis en évidence son effet sur la neurogénèse adulte dans la zone sous-granulaire du GD (Cao et al., 2004). Cet effet du VEGF résulte d'un effet direct sur les précurseurs neuronaux, et dépend spécifiquement du VEGFR2 car son blocage par une forme dominant négative supprime l'effet. Une autre étude s'est focalisée sur l'action du VEGF dans la neurogénèse et la migration des nouvelles cellules du bulbe olfactif vers la zone sous-ventriculaire (Wittko et al., 2009). Le groupe a montré que le VEGFR1 exprimé par les cellules gliales régulait la prolifération et migration des progéniteurs, car l'absence de signalisation VEGFR1 (VEFR1-TK^{-/-}) altère cette régulation de la neurogénèse adulte. De manière intéressante, ces effets n'étaient pas retrouvés dans la neurogénèse hippocampique. La signalisation du VEGFR1 est donc un régulateur négatif local de la neurogénèse adulte.

Les travaux précédemment évoquée de Cao et collaborateurs ont suggéré pour la première fois un lien entre VEGF, neurogénèse, apprentissage et mémoire ; médiée par le VEGFR2 (Cao et al. 2004). Dans cette étude, la surexpression par vecteur viral du VEGF dans l'hippocampe de rat améliorerait les performances lors de tests de mémoire impliquant l'hippocampe (test d'évitement passif et piscine de Morris). Pour en comprendre les mécanismes sous-jacents, l'équipe a mesuré la transmission synaptique sur tranches hippocampique traitées ou non au VEGF, et a observé une augmentation des courants post-synaptiques excitateurs (EPSC) ainsi que de la facilitation *paired-pulse* (PPF) (De Rossi et al., 2016). Cet effet passe par le VEGFR2, car des tranches de souris n'exprimant plus VEGFR2, ou traitées avec un inhibiteur pharmacologique du VEGFR2, perdent la potentialisation à long terme (LTP) induite par le VEGF. Enfin, l'étude a confirmé l'implication du VEGF dans les processus mnésiques, puisqu'un blocage du VEGFR2 diminue la mémorisation du contexte dans un test de conditionnement de peur. Licht et al. ont montré sur modèle murin qu'une surexpression du VEGF dans l'hippocampe conduit à une augmentation de l'angiogenèse, de

la neurogénèse ainsi que de la mémoire par conditionnement de peur (Licht et al., 2011). Ils ont aussi mesuré une augmentation de la LTP par le VEGF dans le GD. Tous ces effets sont perdus lors de l'expression induite du sVEGFR1, utilisé comme bloqueur du VEGF, mais la voie impliquée n'a pas été identifiée.

L'altération de la voie du VEGF (par le VEGFR1 ou le VEGFR2) est observée dans plusieurs pathologies impliquant des troubles cognitifs. Dans un contexte neurodéveloppemental, un enfant résultant d'une grossesse pré-éclampsique, où les taux de sVEGFR1 plasmatique sont élevés, présente des troubles mnésiques qui pourraient être dus à une altération de la mise en place du système vasculaire et/ou de la transmission synaptique (Lara et al., 2018). De plus, des niveaux élevés du sVEGFR1 dans le plasma de patients schizophréniques sont associés à une aggravation des symptômes psychotiques, ainsi qu'à une diminution des volumes hippocampiques et parahippocampiques (Lizano et al., 2017). Ces études ont relevé l'intérêt du VEGF dans des conditions présentant une perte de plasticité synaptique et de mémoire.

3. VEGF et α -sécrétases

Nous avons précédemment présenté la régulation du VEGFR1 via son clivage par les ADAM10/17, libérant le sVEGFR1. Le VEGF est aussi capable d'influencer les mécanismes de protéolyse exercés par les ADAM.

La famille des ADAM est composée de protéines transmembranaires dont certaines ont une activité métalloprotéase, tandis que d'autres sont dites non-protéolytiques. Elles sont conservées au cours de l'évolution et exprimées de manière presque ubiquitaire dans divers organes. Leur fonction a été en particulier décrite au cours du développement où elles régulent la différenciation, la communication entre cellules et la signalisation intracellulaire (Hsia et al., 2019). Il y a actuellement 37 ADAM connues chez la souris et 22 chez l'humain, mais toutes n'ont pas été caractérisées.

Nous nous focaliserons sur deux protéases de cette famille, ADAM10 et ADAM17, qui sont les plus décrites dans le SNC (Hsia et al., 2019). ADAM10 et 17, aussi appelées α -sécrétases, sont exprimées de manière ubiquitaire dans le SNC, et sont impliquées dans un grand nombre de fonctions (Figure 13). ADAM10 joue par exemple un rôle dans le neurodéveloppement par son activité de clivage de la protéine NOTCH qui va moduler la neurogénèse ainsi que la migration neuronale (Hsia et al., 2019). Elle permet aussi la

formation et maintenance des synapses par sa régulation des protéines de liaison entre les éléments pré- et post-synaptiques. ADAM17 est responsable de la régulation de la voie du récepteur du facteur de croissance endothélial (EGFR) qui va notamment moduler le développement et la formation synaptique ; mais ADAM17 est aussi responsable du clivage de nombreuses molécules de signalisation (cytokines, facteurs de croissance, etc.) et de cette manière module aussi les mécanismes de neuroinflammation.

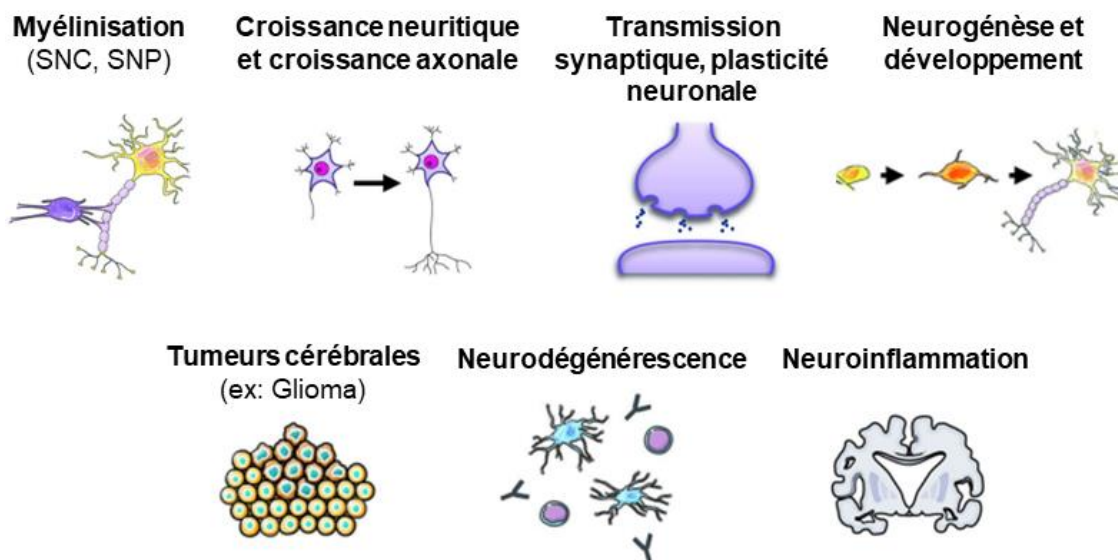


Figure 13 - Synthèse des fonctions des ADAM10 et ADAM17 dans le système nerveux central. Fonctions des ADAM10/17 dans le SNC des mammifères. Ces métalloprotéases sont impliquées dans des contextes physiologiques (développement, transmission synaptique) ainsi que pathologiques (tumeurs, neurodégénérescence, neuroinflammation).

Adapté de Hsia et al. 2019

Plusieurs travaux *in vitro* ont montré que le VEGF est un modulateur de l'expression et/ou de l'activité des ADAM10/17, sur cellules endothéliales (Majka et al., 2002; Donners et al., 2010; Maretzky et al., 2011a). Il augmente en effet l'expression des transcrits d'ADAM17 dans certaines lignées murines endothéliales (RMVECs) (Majka et al., 2002) et stimule la migration de cellules endothéliales humaines (les HUVECs) via l'action de ces métalloprotéases (Maretzky et al., 2011a). En cas d'inhibition des métalloprotéases, administrer aux cellules endothéliales le fragment HB-EGF, qui résulte du clivage d'ADAM17, permet de rétablir des capacités de migration semblables à celles induites par le VEGF (Maretzky et al., 2011a). Enfin, des travaux ont montré que le VEGF stimule l'expression des ADAM10 et 17 sur plusieurs modèles de cellules endothéliales, et augmente leur activité peptidolytique, ce qui permet le clivage du VEGFR2 en sVEGFR2, sa forme soluble (Donners et al., 2010).

Le VEGF est donc un régulateur positif des ADAM10 et 17, et ces protéases contrôlent en retour la fonction des récepteurs au VEGF par clivage de leur domaine extracellulaire. Ces

études ont été menées sur des cellules endothéliales qui expriment fortement VEGFR1 et VEGFR2, avec une signalisation préférentielle impliquant VEGFR2. Aucune étude ne s'est intéressée à ce jour au lien VEGF-ADAM10/17 dans un modèle cellulaire équipé uniquement du VEGFR1, comme la microglie par exemple, sur laquelle les effets pourraient être très différents.

4. VEGF et microglie

Comme pour de nombreuses autres protéines et voies de signalisation, l'intérêt de l'étude du lien entre le VEGF et les microglies provient d'observations faites dans un premier temps sur les macrophages périphériques. Les travaux précédemment évoqués de Hiratsuka et collaborateurs ont mis en évidence l'importance fonctionnelle du VEGFR1 dans la migration des macrophages en réponse au signal d'attraction du VEGF (Hiratsuka et al., 1998). Par la suite, une étude sur la lignée de macrophages RAW264.7 a montré que la sécrétion de VEGF en réponse à la baicaline, une molécule antioxydante de la famille des flavones, permet d'induire un changement de réactivité de ces cellules, qui adoptent alors une signature ou polarisation décrite comme de macrophage M2 (Lai et al., 2019). *A contrario*, une étude d'implantation de tumeurs (U251 et 9L) chez des souris immunodéficientes *scid* traitées avec un anti-VEGFR1/2/3 (Axitinib), a révélé une réduction de l'infiltration tumorale par les cellules immunes qui présentent une polarisation de macrophage M2 (Doloff and Waxman, 2012). L'ensemble de ces données suggère que le VEGF a la capacité de changer le statut d'activation et d'inflammation des macrophages, et pourrait donc aussi moduler celui des microglies.

L'effet du VEGF sur les fonctions microgliales a d'abord été caractérisé par des tests de prolifération (par incorporation d'³H-Thymidine) et de migration (chambres de Boyden) sur des microglies primaires de rat et sur la lignée microgliale murine BV2 (Forstreuter et al., 2002). Ces auteurs ont tout d'abord montré que les microglies expriment uniquement le récepteur VEGFR1, sans le VEGFR2, et qu'un traitement au VEGF stimule leur prolifération (microglies primaires et BV2) et leur migration (BV2).

Plus récemment, une interaction fine entre microglies et précurseurs neuronaux (*Neural Precursor Cells* NPC) a été mise en évidence *in vivo* chez la souris dans deux zones de neurogenèse : celle du GD et la SVZ (Mosher et al., 2012). Ces auteurs ont révélé qu'une source importante du VEGF au sein de ces régions provient des cellules progénitrices elles-mêmes (NPC) qui pourraient exercer un effet paracrine sur la microglie. Or les microglies voisines des NPC présentent un taux de prolifération important, identifié par le marquage BrdU, suggérant que le VEGF sécrété par les NPC peut réguler cet effet. Des tests *in vitro*

(microglies primaires murines et BV2) ont montré parallèlement que le milieu conditionné de NPC en culture est responsable d'une augmentation de la prolifération et de la migration des microglies, couplé à une augmentation de leurs capacités de phagocytose. Ces données ont été ensuite confirmées *in vivo*, où l'injection de milieu conditionné de NPC stimule la prolifération des microglies, alors qu'une privation du milieu en VEGF (par immunoprécipitation anti-VEGF ou par shVEGF) contrecarre cet effet.

Ce lien entre VEGF et microglie a été réexaminé dans le GD, mais aussi dans la région CA1 de l'hippocampe qui ne produit pas de cellules souches neurales (Kreisel et al., 2019). Dans un premier temps, l'utilisation de souris transgéniques sur-exprimant le VEGF dans les neurones a confirmé la forte production du VEGF à la fois dans le GD et la région CA1, avec une augmentation de la population de microglies uniquement dans le GD. Ces premiers résultats suggèrent une hétérogénéité régionale des microglies dont les récepteurs membranaires, formant le sensome, conduisent à des réponses locales très différentes. Ce groupe a aussi développé un modèle de souris transgénique où la surexpression du VEGF est inductible, avec un système On/Off sous le contrôle de la tétracycline. Ce modèle a permis de mettre en évidence que le VEGF induit une prolifération importante et rapide des microglies en 3 jours. Celles-ci vont en retour stimuler la neurogenèse dans le GD de l'hippocampe avec une augmentation des neuroblastes et des nouveaux neurones CldU+NeuN+.

Les résultats diffèrent quelque peu entre les travaux de 2002 énonçant que les microglies n'expriment que le VEGFR1, et ceux du groupe de Tamar Licht montrant en transcriptomique l'expression des deux récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 par les microglies (Forstreuter et al., 2002; Kreisel et al., 2019). Dans la première étude, il s'agissait de microglies mises en culture à partir de cortex de rat, tandis que dans la seconde les microglies ont été directement isolées à partir d'hippocampe de souris. Les différences d'expression et de réponse pourraient s'expliquer par l'espèce (rat et souris), le stade développemental (nouveau-né et adulte) ou la spécificité régionale (cortex et hippocampe).

Le VEGF a été grandement caractérisé entre 1990 et 2010, principalement sur l'aspect vasculaire et neuronal, avec une focalisation sur la voie du VEGFR2. Or, nous venons de voir que plusieurs études soulèvent le rôle du VEGFR1 dans des conditions physiologiques comme pathologiques. Nous avons aussi vu que la VEGF peut impacter les fonctions cognitives, et en particulier la mémoire. Il devient donc intéressant de regarder cette voie dans des contextes de maladies neurodégénératives avec des atteintes mnésiques.

III. La maladie d'Alzheimer

1. Epidémiologie, étiologie, aspects cliniques et diagnostiques

a. Epidémiologie et étiologie

La maladie d'Alzheimer (MA) est un trouble neurodégénératif qui est aujourd'hui la première cause de démence dans le monde. Avec l'allongement du temps de vie, l'incidence de cette maladie augmente drastiquement. Le vieillissement est aujourd'hui considéré comme le facteur de risque principal dans la MA. En 2015, les chiffres donnés par *Alzheimer Disease International* indiquent que plus de 46 millions de personnes étaient atteintes de la MA, avec une estimation de 1,2 million de Françaises et de Français (Carcaillon-Bentata, 2016; World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends, n.d.). L'incidence de la MA est plus importante chez les femmes, en particulier après 80 ans, et n'est pas seulement la conséquence de l'allongement de leur temps de vie par rapport à celui des hommes (World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends, n.d.). L'étude a aussi prédit l'évolution de l'incidence de la démence dans les années à venir, et les modèles estiment que le nombre de patient.e.s sera de plus de 75 millions en 2030 et plus de 131 millions en 2050, avec 68% des cas en 2050 dans des pays à moyen ou faible revenu. La situation actuelle et à venir nécessite donc de déployer des moyens importants pour l'accompagnement des personnes atteintes de MA et leur prise en charge hospitalière, mais aussi pour la recherche fondamentale et clinique.

On différencie deux grands types de MA : les formes familiales et les formes sporadiques, qui représentent respectivement 1% et 99% des cas observés (Long and Holtzman, 2019). La majorité des formes familiales (fMA) se développent avant 60 ans et sont définies comme maladie d'Alzheimer à apparition précoce ou *Early-Onset Alzheimer's Disease* (EOAD) ; tandis que dans les formes sporadiques (sMA), 95% des patient.e.s développent des troubles cognitifs après 65 ans (*Late-Onset Alzheimer's Disease* LOAD) (Long and Holtzman, 2019). Une revue comparant les EOAD et LOAD a pointé le fait qu'il s'agit de pathologies relativement distinctes, avec notamment des modifications dans les proportions de certains facteurs de risques ou comorbidités associées, ainsi que des différences dans les zones cérébrales et les types d'atteintes (Mendez, 2017). Les formes familiales sont dites autosomiques dominantes car des mutations touchant les gènes *APP*, *PSEN1* ou *PSEN2*, sont responsables du développement de la pathologie et sont transmises de manière héréditaire (Long and Holtzman, 2019). Or, seulement environ 15% des cas d'EOAD ont un historique de mutation autosomique dominante (Mendez, 2017). Autrement

dit, 85% de ces formes précoces sont donc des formes sporadiques, ou des formes dont la transmission héréditaire est atypique et ne se fait pas selon le modèle mendélien de mutations autosomiques dominantes. Le très grand nombre de personnes touchées par les sMA (LOAD comme EOAD) a inspiré de nombreuses études afin de mieux cerner les facteurs participant au développement de cette maladie multifactorielle, qu'ils soient d'ordre génétique ou environnemental.

Pour identifier ces facteurs, de nombreux criblages de facteurs de risque ont été réalisés ainsi que plusieurs méta-analyses génétiques (*Genome-Wide Association GWAS* et séquence génomique totale) (Karch and Goate, 2015; Kunkle et al., 2019). Aujourd'hui, une vingtaine de variants ont été identifiés comme facteurs de risque génétiques de la MA, affectant des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, le métabolisme de Tau et de l'A β , l'endocytose, ou encore l'immunité, et en particulier la réponse microgliale (Figure 14).

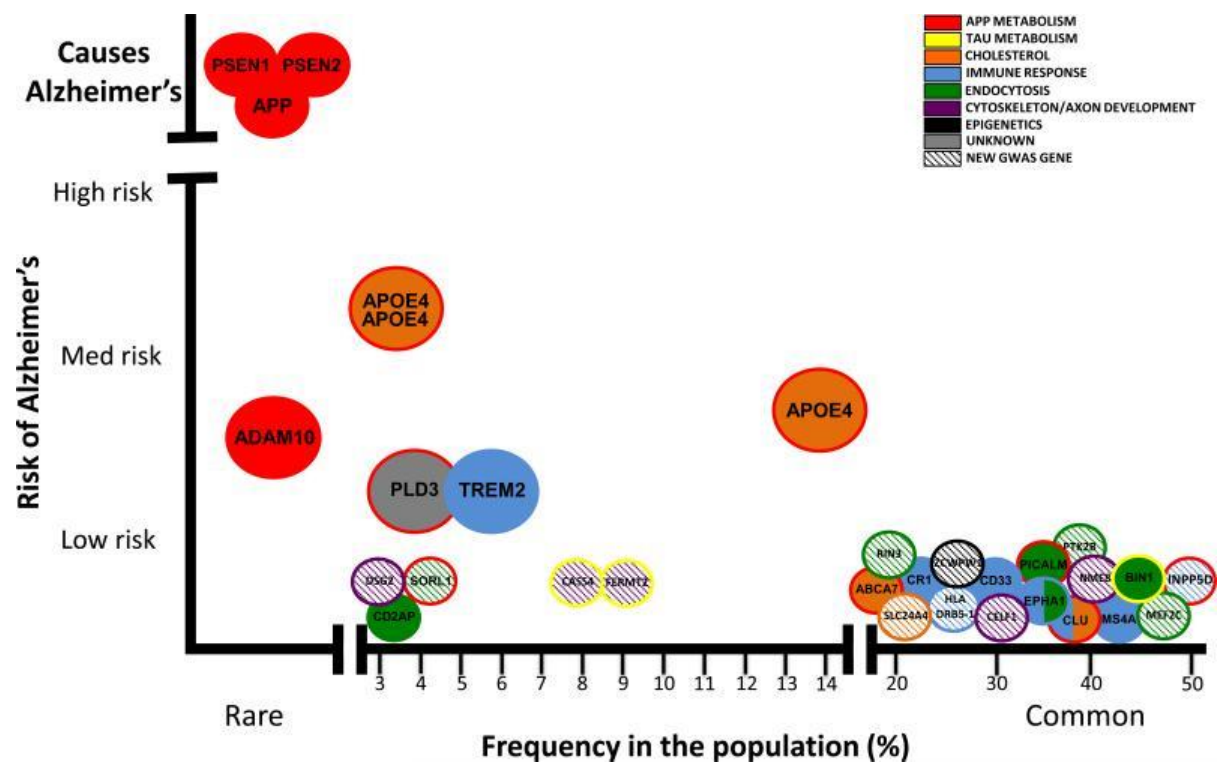


Figure 14 - Facteurs de risque génétiques identifiés : niveau de risque et fréquence dans la population. Variants génétiques identifiés chez des cas de LOAD. La couleur indique la fonction dans laquelle le gène concerné est impliqué. Source : Karch et Goate 2015.

Le facteur de risque génétique le plus important et le plus commun dans les LOAD est l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE* (*APOE- $\epsilon 4$*) qui code pour l'apolipoprotéine E, existant chez l'humain.e aussi sous les isoformes *APOE- $\epsilon 2$* et *APOE- $\epsilon 3$* . Leurs fréquences dans la population sont estimées à 77% pour *APOE- $\epsilon 3$* , 15% pour *APOE- $\epsilon 4$* et 8% pour *APOE- $\epsilon 2$* (Huang and Mahley, 2014). Cette lipoprotéine, principalement exprimée par les astrocytes

dans le SNC en condition physiologique, est responsable du transport de lipides et du cholestérol vers les neurones, ou encore de leur élimination vers le LCR. En 1993, une étude a montré que les personnes porteuses d'un ou deux allèle(s) *APOE-ε4* avaient respectivement entre 20 et 90% de risque en plus de développer une LOAD (Corder et al., 1993). Par la suite, les études GWAS ont confirmé qu'une copie de l'allèle *APOE-ε4* augmentait de 3,7 fois le risque de développer la MA, tandis que deux copies l'augmentent de 12 fois. Au contraire, l'allèle *APOE-ε2* est associé à une réduction du risque de 40% et serait donc un facteur protecteur de la MA (Serrano-Pozo et al., 2021). Encore aujourd'hui, aucun autre facteur de risque génétique identifié n'est aussi fortement corrélé au développement de la sMA que l'allèle *APOE-ε4*.

De nombreuses pathologies sont associées à la sMA, c'est-à-dire à son développement et/ou son évolution, et sont à l'origine de facteurs de risque potentiellement modifiables (Daviglius et al., 2010). Ces principaux facteurs de risque sont par exemple les risques cardiovasculaires (diabète, hypertension, obésité), ou l'état psychologique (dépression), mais il existe aussi des facteurs sociaux ou de santé (activité physique, éducation, activité mentale, tabac). Plusieurs méta-analyses ont permis de calculer le risque relatif de développer la MA en ayant un facteur de risque modifiable donné (Barnes and Yaffe, 2011). Ce risque est élevé pour chaque facteur précédemment évoqué, avec les risques relatifs les plus élevés pour la dépression et l'absence d'activité physique. Cependant, le facteur de risque principal reste l'âge (Guerreiro and Bras, 2015), car le risque de développer la sMA augmente avec le vieillissement. L'âge peut entraîner une dérégulation du système immunitaire qui ne parviendrait plus à maintenir l'homéostasie dans le SNC, puis impliquer des médiateurs moléculaires témoins d'une inflammation systémique et liés au déclin cognitif, comme par exemple la chimiokine CCL11 (Naj et al., 2014; Guerreiro and Bras, 2015; Lalli et al., 2015). La forme sporadique de la MA est donc multifactorielle : les facteurs de risque génétiques expliquent environ 70% des cas, et les 30% restants seraient dus aux facteurs sociaux et de santé (Bagaria et al., 2021).

b. Aspects cliniques et diagnostiques

Lorsque l'on parle de la MA, on désigne une pathologie progressive qui se manifeste par des troubles cognitifs, et en premier lieu mnésiques, puis plus tardivement par des troubles du langage, de la coordination et de la reconnaissance. Ces syndromes correspondent à la MA typique. Mais il existe aussi des formes atypiques, en particulier dans les EOAD, non amnésiques, qui peuvent présenter d'emblée des altérations du langage, de la vision ou de la

praxie (Mendez, 2017; Lane et al., 2018). Nous nous focaliserons ici sur les signes précliniques et cliniques des formes dites typiques.

Il est aujourd'hui admis que les processus physiopathologiques conduisant à la MA commencent bien avant les premières atteintes cognitives. Durant cette phase préclinique, et donc asymptomatique, les dépôts amyloïdes impliqués dans la pathogénèse commencent à s'accumuler 20 ans avant les premiers troubles cognitifs (Jack et al., 2013). Le stade préclinique peut évoluer ensuite en stade prodromique avec l'apparition de troubles cognitifs légers (*Mild Cognitive Impairment* MCI) ; une démence modérée apparaît ensuite avec une atteinte fonctionnelle importante, qui devient majeure au stade de la démence sévère (Vermunt et al., 2019). Des modèles prédictifs se sont notamment focalisés sur certains critères, comme l'âge, le sexe, et les variants du gène *APOE* pour caractériser l'évolution temporelle de ces trois stades (préclinique, prodromique et démence). Les prédictions de ces modèles montrent que ce serait la durée du stade préclinique qui diffère le plus selon l'âge et/ou de la présence du variant *APOE-ε4* chez les patient.e.s, tandis que les durées du stade prodromique et de la démence modérée sont relativement équivalents. Cette étude souligne donc l'importance de l'étude des stades précliniques précoces pour mieux comprendre les mécanismes pathophysiologiques responsables de l'apparition de la maladie.

Plusieurs éléments participent au diagnostic de la MA. Des tests cognitifs sont réalisés en première intention lors de l'examen clinique pour évaluer notamment les capacités de mémorisation. Par la suite, l'imagerie (structurale et fonctionnelle) permet d'observer les régions altérées, ainsi que le type d'altération. Enfin, la confirmation du diagnostic se fait aujourd'hui grâce à la mesure de certains biomarqueurs dans le LCR. Les critères définissant la MA doivent être reconsidérés et s'adapter régulièrement aux avancées techniques et de la compréhension de la pathologie. Le groupe de travail international (IWG) regroupant des médecins et chercheur.euse.s spécialistes de la MA proposent une démarche d'identification de la pathologie, qui est régulièrement republiée (Dubois et al., 2021).

Au stade prodromique, le MCI se traduit par l'apparition de troubles de la mémoire épisodique, une forme de mémoire à long terme d'événements personnels, avec un échec du rappel de l'information sans indice associé (Dubois et al., 2014). Il se manifeste aussi par certaines difficultés pour accomplir les tâches du quotidien, dues par exemple à des défauts de représentation topographique, ou à l'incapacité de réaliser plusieurs tâches en parallèle (Lane et al., 2018). Avec la progression de ces difficultés, une perte de confiance en soi des patient.e.s s'installe. Il a été estimé que cette phase prodromique dure 4 ans en moyenne, avant d'évoluer au stade de démence (Vermunt et al., 2019). La démence correspond à une amplification des troubles du MCI, avec une généralisation des atteintes cognitives qui

s'accompagne souvent de changements du comportement, ou encore d'atteintes motrices et d'hallucinations (Lane et al., 2018).

Pour la prise en charge des patient.e.s, il est important de distinguer et de caractériser les différents troubles cognitifs. Historiquement, le corps médical s'est appuyé sur des tests neuropsychologiques comme le test du MMSE (*Mini Mental State Examination*) qui permet d'attribuer un score de performance cognitive après l'évaluation de l'orientation (temporelle et spatiale), l'apprentissage et le rappel, l'attention et le calcul, mais aussi le langage et la praxie (Folstein et al., 1975). Le MMSE a l'avantage d'être rapide, mais sa sensibilité et sa spécificité dans la détection du MCI, ou la prédiction de démence, sont aujourd'hui largement discutées (Arevalo-Rodriguez et al., 2021). Même si d'autres analyses neuropsychologiques comme l'ADCOMS (*Alzheimer's Disease Composite Score*) prennent mieux en compte le déclin cognitif au stade prodromique (Wang et al., 2016), ces méthodes d'évaluation doivent nécessairement être complétées avec d'autres outils diagnostics se basant sur l'imagerie cérébrale.

L'Imagerie structurale par Résonance Magnétique (IRM) peut être réalisée dès qu'il y a suspicion de MA afin d'évaluer si les atteintes cognitives observées chez les patient.e.s sont corrélées à des modifications anatomiques compatibles avec la maladie. En particulier, une atrophie symétrique du lobe temporal médian et de l'hippocampe est recherchée car c'est un marqueur diagnostique du stade prodromique MCI de la MA (Lane et al., 2018). L'IRM permet aussi d'estimer la progression de la MA par une étude longitudinale du degré d'atrophie de ces régions, et leur extension à d'autres structures comme le cortex entorhinal. Enfin, cette approche permet de distinguer la MA d'autres pathologies neurodégénératives (démence à corps de Lewy, dégénérescence fronto-temporale, démence vasculaire sous-corticale), pour établir un diagnostic différentiel (Frisoni et al., 2009), ou encore de détecter d'éventuels micro-saignements causés par l'angiopathie amyloïde cérébrale fréquemment associée à la MA. L'imagerie par Tomographie à Emission de Positons (TEP) permet quant à elle de mesurer l'état des métabolites du cerveau comme le glucose des neurones ou des cellules gliales grâce au traceur ¹⁸F-FluoroDeoxyGlucose (FDG). La diminution de la capture de ce traceur dans les régions temporo-pariétales et dans l'hippocampe indique un hypométabolisme associé aux stades prodromiques et de démence de la MA. Le degré et l'étendue de cet hypométabolisme est corrélé à l'importance des atteintes cognitives. Parallèlement, grâce à l'utilisation d'autres traceurs radioactifs en TEP comme le *Pittsburgh compound B* (PiB) ou le ¹⁸F-Flutemetamol ciblant l'A β , l'augmentation de la charge amyloïde peut être détectée dans le cerveau des patient.e.s atteint.e.s de la MA. Cependant, l'accumulation cérébrale de dépôts amyloïdes visibles en TEP peut aussi être observée au cours du vieillissement, sans atteinte cognitive

associée (Harrison et al., 2018), soulignant l'importance d'utiliser plusieurs approches pour établir un diagnostic clinique au stade prodromique de MCI.

Tous ces tests sont donc nécessaires pour orienter le diagnostic vers l'identification de MCI ou de la MA ; cependant la confirmation du diagnostic est possible en *post mortem* avec l'analyse anatomopathologique du cerveau des patient.e.s.

c. Anatomopathologie

L'étude anatomopathologique du cerveau de personnes décrites de leur vivant comme séniles ou démentes a permis de mettre en lumière deux types de lésions caractéristiques. Celles-ci sont à l'origine des grands axes de recherche concernant la MA.

i. Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes résultent de l'agrégation en dépôts extracellulaires de la protéine A β qui s'assemblent en formes multimériques et fibrillaires (Masters et al., 1985). On parle de plaques insolubles car la plupart des méthodes de solubilisation sont inefficaces et ne permettent pas de dissocier ces formes fibrillaires. L'observation histologique des plaques amyloïdes peut se faire par immunomarquage ciblant l'A β , ou bien avec les colorants Thioflavine S (ThS) ou Congo Red se fixant sur les feuillets β qui sont enrichis dans les fibrilles d'A β (Serrano-Pozo et al., 2011).

Initialement, trois morphologies de plaques amyloïdes ont été décrites sur des coupes *post mortem* de cortex et d'hippocampe de patient.e.s Alzheimer : les plaques classiques, matures ou immatures, et les plaques diffuses (Figure 15) (Masliah et al., 1990).

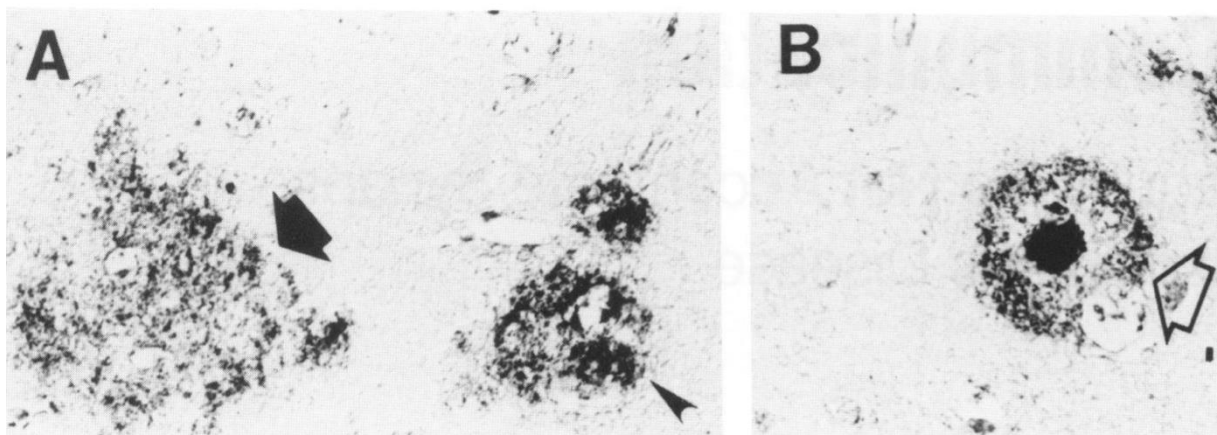


Figure 15 - Différentes morphologies de plaques amyloïdes.

Marquage des plaques avec un anticorps anti-A β , puis révélation DAB. De gauche à droite : plaque diffuse, plaque classique immature, plaque classique mature (à cœur dense). Source : Masliah et al. 1990

Cette classification initiale a dû être actualisée pour intégrer une douzaine d'autres morphologies, mais les plus communément observées sont les plaques diffuses et les plaques compactes, aussi appelées à cœur dense (DeTure and Dickson, 2019). Ces dernières sont retrouvées uniquement chez des patient.e.s MA (Delaère et al., 1991; Armstrong, 1995). L'utilisation des colorants Thioflavine S et Congo Red permet de rapidement distinguer les plaques compactes (ThS+/Congo Red+) des plaques diffuses qui ne sont marquées que par des anticorps anti-A β (Serrano-Pozo et al., 2011). Une partie de ces plaques à cœur dense peut être associée en périphérie à des neurites anormales ou dystrophiques, à une perte synaptique, et à un recrutement de microglies et d'astrocytes ; on parle alors de plaques neuritiques (Wong et al., 1985; Delaère et al., 1991). Ces plaques neuritiques sont observées plus particulièrement chez les patient.e.s MA présentant des atteintes cognitives importantes ou une démence (Delaère et al., 1991; Knowles et al., 1999).

D'autres variants morphologiques peuvent être observés comme les plaques en pelote de laine qui sont des dépôts amyloïdes assez grands (>100 μ m), sphériques et sans cœur dense, associées à la présence de neurites dystrophiques (Tabira et al., 2002). Récemment, une nouvelle morphologie a été décrite chez des patient.e.s atteint.e.s de MA atypique, les plaques à gros grain, fréquemment associées à des cas d'EOAD et observées chez des porteuses et porteurs du génotype *APOE- ϵ 4* (Boon et al., 2018, 2020). Cette dernière morphologie a la particularité de former des amas amyloïdes multiples entrecoupés de zones ou pores dépourvus d'A β . Enfin, des dépôts amyloïdes se forment aussi en particulier autour des vaisseaux des leptoméniges et du cortex. Ils sont à l'origine de l'Angiopathie Amyloïde Cérébrale (AAC) de type 1 ou 2 qui diffère selon les vaisseaux atteints (Wong et al., 1985; Thal et al., 2002a). L'AAC est retrouvée chez environ 85% des personnes âgées, et bien qu'il s'agisse d'une maladie distincte de la MA, un taux de corrélation de 0,68 entre les deux pathologies a été retrouvée (Arvanitakis et al., 2011). Les mécanismes pathologiques sont différents entre l'AAC et la MA, mais dans les deux cas, on observe une accumulation et une toxicité du peptide A β qui pourrait expliquer la forte corrélation.

La diversité morphologique des plaques implique un assemblage d'espèces amyloïdes de structures et de composition différentes, avec certaines de ces morphologies pouvant être associées à la progression clinique de la MA. Plusieurs groupes se sont donc intéressés aux espèces d'A β composant chacune de ces plaques, et ont pu voir que les isoformes de la protéine ne se distribuent pas de la même manière selon les morphologies (Iwatsubo et al., 1994; Boon et al., 2020). De plus, de très nombreuses molécules sont retrouvées liées ou piégées dans les plaques, notamment des immunoglobulines, des protéines du complément, ou encore des facteurs de croissance et des lipides (Rahman and Lendel, 2021). Ainsi, il a été suggéré que les compositions variées des plaques amyloïdes pourraient être à l'origine des différences de toxicité associées.

ii. Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF)

Les DNF sont des neurofibrilles retrouvées dans les neurones, correspondant à de la protéine Tau codée par le gène *Microtubule-Associated Protein Tau* (MAPT) qui s'agrège suite à diverses modifications post-traductionnelles, notamment des hyper-phosphorylations (Goedert et al., 1988; Mandelkow et al., 2007). Ces formes hyper phosphorylées de TAU perdent leur capacité de lier et stabiliser les microtubules, de réguler le transport axonal (Long and Holtzman, 2019), et s'agrègent en filaments appelés PHFs (ou *Paired Helical Filament*) pour former les DNF. Les PHF sont retrouvés dans les neurites dystrophiques autour des plaques neuritiques. Si le rôle précis de TAU dans les mécanismes pathophysiologiques de la MA n'est pas encore bien compris, il est maintenant admis que la densité et la localisation des DNF sont étroitement liés à la perte neuronale et à l'évolution clinique de la MA (Arriagada et al., 1992).

iii. Distribution des plaques amyloïdes et des DNF

Les plaques amyloïdes apparaissent progressivement au cours de la MA selon une organisation topographique stéréotypée qui a donné lieu à une classification en 5 stades d'évolution (Figure 16) (Thal et al., 2002a). Elles sont d'abord retrouvées dans le néocortex, dans les lobes frontaux, pariétaux temporaux et occipitaux (stade 1), puis atteignent ensuite le cortex entorhinal, la région hippocampique et l'amygdale (stade 2). Dans des stades plus avancés, elles envahissent les noyaux sous-corticaux et la matière blanche (stade 3), les noyaux du tronc cérébral (stade 4) et enfin le cervelet et le pont au stade 5 (Braak and Braak, 1991; Thal et al., 2002b).

Dans leur étude, les Dr. Braak ont observé que, pour des stades de pré-démence, les dépôts amyloïdes dans le cortex montrent une variabilité inter-individuelle importante, tandis que la progression des lésions Tau est corrélée à l'avancée de la pathologie (Braak and Braak, 1991). L'apparition et la distribution topographique des DNF permet de distinguer par analyse histologique *post mortem*, six stades de Braak (I à VI) en fonction des zones et des niveaux d'atteinte (Braak and Braak, 1991). Au cours des premiers stades, les DNF concernent le cortex trans-entorhinal (stade Braak I), puis progressent dans l'hippocampe, le subiculum et les régions limbiques (stades Braak II et III). Le néocortex, le thalamus et l'amygdale sont envahis au stade IV et, dans les stades très avancés (stade VI), les aires primaires sensorielles et motrices (Braak and Braak, 1991).

La propagation des lésions amyloïdes et Tau diffèrent en termes de localisation et de temporalité (Figure 16) (Braak and Braak, 1991; Thal et al., 2002b).

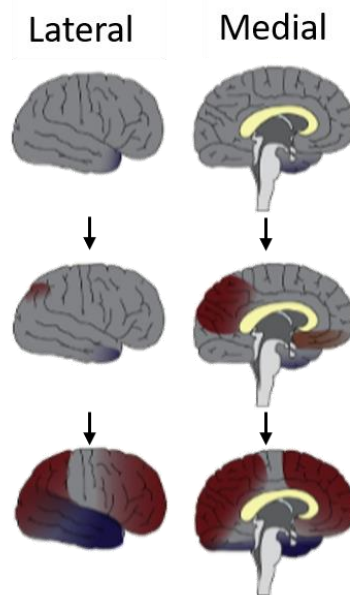


Figure 16 - Evolution des dépôts amyloïdes et Tau dans la progression de la MA. En rouge, la pathologie amyloïde ; en bleu les dégénérescence fibrillaires Tau. *Source : Long et Holtzman 2019.*

Récemment le développement des approches d'imagerie par TEP a permis de comparer la progression de ces deux types de lésions au cours de la MA. L'accumulation amyloïde permettrait de prédire l'apparition des lésions Tau, puis l'évolution des lésions serait prédictive des atteintes cognitives et de la sévérité de la maladie (Hanseeuw et al., 2019).

Ces deux lésions cérébrales retrouvées dans la MA sont aussi associées à d'autres pathologies et au vieillissement. Des plaques amyloïdes et des lésions DNF sont en effet présentes dans le cortex de personnes ayant le syndrome de Down, qui ont une prédisposition génétique à développer la MA (Masters et al., 1985; Hartley et al., 2015). D'autre part, des agrégats de TAU peuvent aussi être retrouvés chez des personnes ayant la maladie de Parkinson ou une démence à corps de Lewy, et parfois associés aux dépôts de la protéine α -synucléine (Ishizawa et al., 2003). Au cours du vieillissement, la présence de plaques amyloïdes dans le cortex cérébral et de DNF dans la région hippocampique pose la question de ce qui détermine la transition d'un vieillissement normal au développement de la MA (Armstrong, 1995; Bennett et al., 2006). C'est la considération de l'ensemble des lésions anatomopathologiques en lien avec les observations cliniques et l'imagerie *ante mortem*, qui permet de confirmer un diagnostic de MA en *post mortem*. Pour compléter et mieux comprendre l'apparition de la pathologie, de nouveaux biomarqueurs et nouvelles formes de classification apparaissent, dont le but est de déterminer plus précisément la séquence des processus pathogéniques qui conduisent aux déficits cognitifs et à la démence.

d. Biomarqueurs et nouvelle classification

L'aspect symptomatique, regroupant les mesures cognitives et d'imagerie, a longtemps été au centre du diagnostic de la MA. Or, l'évolution des connaissances et des techniques nous impose d'intégrer la composante biologique dans l'identification de la pathologie (Dubois et al., 2014). La prise en considération à la fois des syndromes et de l'aspect biologique rend notamment le diagnostic de formes atypiques ou asymptomatiques de la MA possibles (Dubois et al., 2021).

C'est là l'une des raisons du développement des mesures de certains biomarqueurs dans les fluides biologiques (LCR et sang) afin d'estimer les risques de développer un MCI et/ou la MA. La méta-analyse d'Olsson et collaborateurs a regroupé les résultats de 231 publications mesurant des facteurs relatifs à la neurodégénérescence (neurofilaments et TAU Total), aux neurofibrilles (TAU phosphorylée), à la pathologie amyloïde (A β isoformes 40 et 42) et à la réactivité gliale (YKL-40 et GFAP) (Olsson et al., 2016). Les études portent sur des patients contrôles, MCI stable, MCI qui ont développé la MA (MCI-MA) et MA. Elles révèlent que les mesures de biomarqueurs essentiels comme les protéines TAU totales et phosphorylées augmentent significativement dans le LCR de patients MA par rapport au groupe contrôle, et permettent de distinguer les patients au stade MCI stable des patients en conversion MCI-MA. Toujours dans le LCR, les niveaux d'A β (isoforme 42) diminuent chez les patients MA, et permettent aussi de distinguer les deux catégories de MCI. Ces mesures dans le LCR sont très importantes car elles permettent de distinguer un état de transition entre le stade MCI stable, qui peut refléter des changements cognitifs dus au vieillissement, et le stade MCI-MA de patients à risque de développer la MA.

La multiplicité des biomarqueurs de la MA et la grande variabilité du taux de ces biomarqueurs selon les cas cliniques entre les publications fragilisent leur utilisation comme outil diagnostique. Dans un but d'harmonisation, un groupe a proposé une classification basée sur les trois grandes caractéristiques pathologiques de la MA : la pathologie amyloïde (A), Tau (T) et la neurodégénérescence (N) (Jack et al., 2016). Cette classification ATN attribue un score « + » pour tous les paramètres anormaux, et « - » pour les paramètres dans les valeurs usuelles. Pour la pathologie amyloïde (A), ce système est basé sur l'analyse en imagerie TEP-amyloïde et sur la baisse des taux d'A β dans le LCR. Pour Tau (T), l'imagerie TEP-Tau et l'augmentation de TAU phosphorylée dans le LCR sont considérées. Enfin, pour la Neurodégénérescence (N), l'imagerie en TEP-18F-FDG (hypométabolisme), l'IRM structurale (atrophie, élargissement des ventricules) et l'augmentation de la protéine TAU totale dans le LCR servent de biomarqueurs. Cette méthode ATN permet donc de distinguer des personnes à risque de développer une MA ou atteintes de MA.

Cette classification présente néanmoins une limitation car elle ne permet pas de trancher la question de la transition entre le vieillissement et les atteintes amyloïdes sans symptômes cognitifs associés. De plus, l'aspect invasif d'une ponction lombaire, requise pour le prélèvement du LCR, rend nécessaire le développement d'autres marqueurs prédictifs/diagnostiques. La caractérisation de biomarqueurs sanguins reste la piste principale, mais est jusqu'à présent très variable et peu fiable pour la mesure des niveaux plasmatiques d'amyloïdes et de TAU. L'incertitude liée à l'analyse des taux plasmatiques d'A β 40 et d'A β 42 est grandement discutée dans la communauté scientifique, notamment à cause de la production d'A β périphérique et de l'influence de certaines comorbidités associées, comme dans le cas d'atteintes rénales (Pichet Binette et al. 2022). Cependant, l'évaluation du ratio A β 42/A β 40 par immunoprécipitation et spectrométrie de masse a permis de s'affranchir de ces facteurs confondants et représente une alternative prometteuse pour déterminer la charge amyloïde aux différents stades de la maladie (Benedet et al., 2022). C'est par cette approche que le test PrecivityAD™, mesurant le ratio plasmatique des formes A β 42/A β 40, a été commercialisé aux Etats-Unis et est utilisé comme une aide au diagnostic de patient.e.s présentant des troubles cognitifs. La détermination de la pathologie amyloïde dans le système de classification ATN repose aujourd'hui sur les mesures par TEP-A β et du LCR, mais la fiabilité des mesures sanguines en fait un autre élément d'évaluation très intéressant.

Une nouvelle piste émergente et prometteuse consiste en la mesure des phosphorylations spécifiques de TAU dans le sang, notamment avec l'accumulation des phosphorylation T231 et T217 de TAU sanguin. Cette accumulation se produit très tôt dans le processus pathologique, et pourrait donc détecter une MA naissante dès le stade préclinique, et sont fortement associés à la pathologie amyloïde détectée par TEP (Milà-Alomà et al., 2022).

Ces avancées rendent désormais possible l'utilisation des biomarqueurs plasmatiques dans la détermination du type de pathologie (A+ et T+), et facilitent le recrutement de participant.e.s pour développer de futurs essais cliniques dès le stade préclinique.

2. Processus pathologique

a. Amyloïde

i. APP : fonction, clivage et mutations

L'APP (*Amyloid Precursor Protein*) est une protéine transmembranaire, codée par le gène *APP* situé sur le chromosome 21, qui présente un long domaine extracellulaire et un domaine intracellulaire court (Müller et al., 2017). Elle a été identifiée comme la protéine

précurseur des peptides amyloïdes β retrouvés dans les dépôts amyloïdes (Kang et al., 1987). Trois isoformes principales de la protéine existent, composées de 695, 751 et 770 acides aminés. L'isoforme 695 est exprimée principalement dans le SNC, alors que les isoformes 770 et 751 sont plus ubiquitaires. Elles possèdent toutes le domaine A β , ainsi que des domaines de liaison extracellulaires (E1 et E2), et le domaine APP intracellulaire (AICD) (Müller et al., 2017). Chez la souris, l'App est exprimée dès le stade embryonnaire E7.5 dans l'ébauche du tube neural, et la différenciation des neurones s'accompagne d'une augmentation de l'expression de l'isoforme 695 (Hung et al., 1992; Ott and Bullock, 2001). L'expression de cette isoforme par les neurones est à la fois pré- et post-synaptique, au niveau des axones et des dendrites (Müller et al., 2017).

L'APP fait partie d'une famille de protéines hautement conservées au cours de l'évolution qui comprend chez les mammifères les protéines APP-Like 1 (APLP1) et APLP2 (Shariati and De Strooper, 2013). Elle peut s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec les *APP-Like Proteins* (APLP) qui sont dépourvues du domaine A β , mais présentent des fonctions redondantes avec l'APP. La formation de ces hétérodimères entre deux neurones permet à l'APP de jouer le rôle de molécules d'adhésion synaptique et de moduler la formation des synapses. De plus, environ 200 protéines adaptatrices se liant à l'APP ont été identifiées, facilitant la fixation de ligand à l'APP et la transduction du signal en aval.

L'importance de l'APP a été démontrée grâce à un modèle de souris *App-KO* constitutif (Zheng et al., 1995). Les souris *App*^{-/-} sont viables et fertiles, mais présentent une masse corporelle diminuée de 15 à 20% et une faiblesse musculaire. L'APP a donc un rôle physiologique dans le SNC comme en périphérie. Ses fonctions en conditions physiologiques ont notamment pu être déterminées par un modèle murin de KO conditionnel de l'*App* et de l'*Aplp2* dans les neurones (Hick et al., 2015). L'étude a mis en avant que l'absence d'*App/Aplp2* induit une altération de la morphologie neuronale (longueur des neurites, branchements dendritiques), des défauts de transmission synaptique (LTP, *Paired-pulse facilitation*) ainsi que des atteintes comportementales et de mémoire. De manière intéressante, l'ajout de sApp α , une forme clivée de l'App, est suffisant pour rétablir la LTP.

L'APP à la membrane peut subir deux types de clivages canoniques, impliquant des α -sécrétases comme ADAM10 ou ADAM17 pour la voie non-amyloïdogénique, ou la β -sécrétase BACE1 pour la voie amyloïdogénique (Figure 17A) (Müller et al., 2017). D'autres clivages non-canoniques existent et mettent en jeu la méprine β , les η et δ sécrétases, ou encore les caspases. Dans les voies non-amyloïdogénique et amyloïdogénique, deux clivages séquentiels de l'APP se produisent : le premier spécifique de la voie par une α -sécrétase ou une β -sécrétase; puis un second clivage commun aux deux voies par la γ -sécrétase (complexe de 4 sous-unités Préséniline 1 ou 2, Nicastrine, APHP1a ou APHP1b, et *Presenilin enhancer*

2) (Mañucat-Tan et al., 2019). Les α et β -sécrétases vont libérer un fragment extracellulaire, sAPP α ou sAPP β respectivement, et laissant ainsi le fragment CTF α ou CTF β ancré à la membrane (Figure 17A). L' α -sécrétase reconnaît les acides aminés 612-613 de l'APP qui se trouvent au milieu de la séquence correspondant à l'A β , tandis que la β -sécrétase clive l'APP au résidu 596 dans l'extrémité N-terminale de l'A β (Figure 17B). Le clivage par la γ -sécrétase du CTF α produit les peptides p3 et AICD, tandis que celui du CTF β libère l'A β et l'AICD. Le fragment AICD est commun aux deux voies de clivage et agit comme un facteur de transcription en modulant l'expression de gènes impliqués, par exemple dans le contrôle de la mort cellulaire et l'inactivation de l'A β par la libération d'enzymes (Pardossi-Piquard and Checler, 2012). Les γ -sécrétases sont capables de cliver le CTF β à plusieurs positions, et génèrent ainsi des peptides A β de 37, 38, 40, 42 et 43 acides aminés. C'est donc le clivage amyloïdogénique qui est responsable de la production des peptides A β .

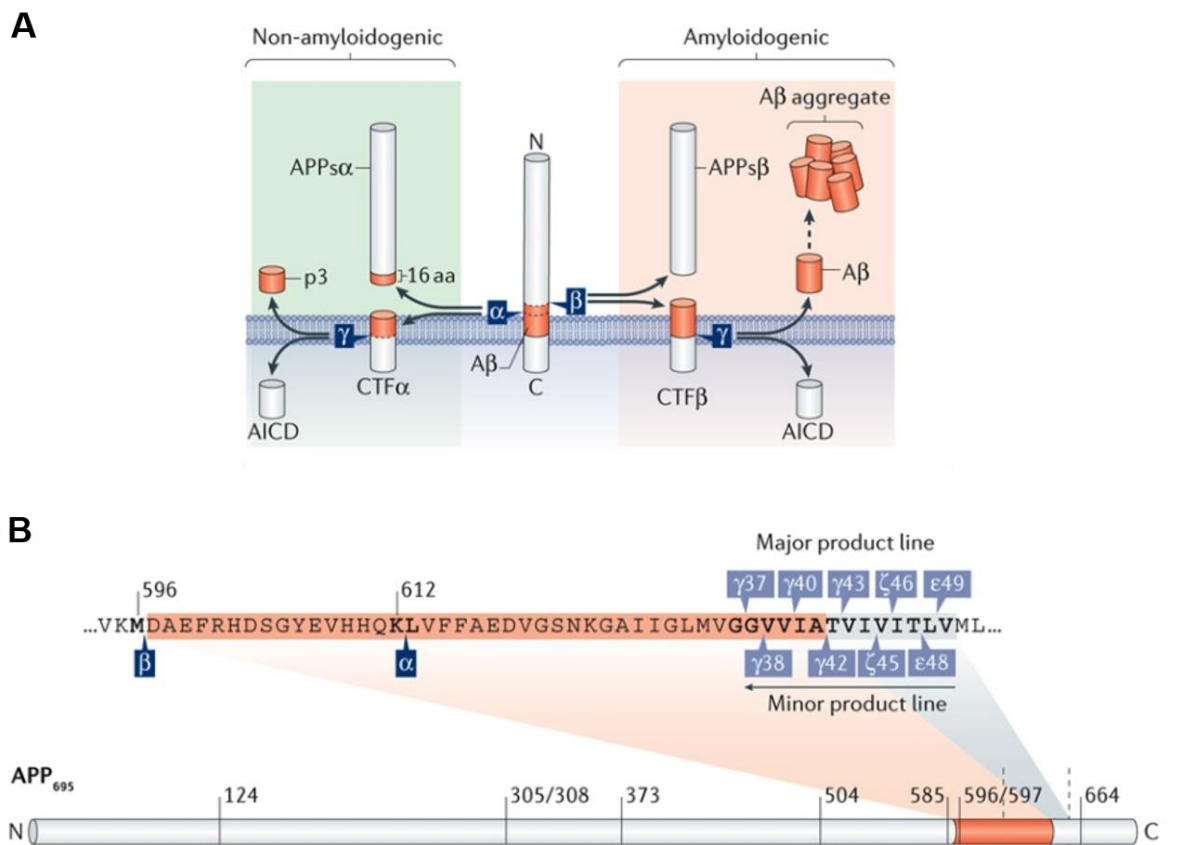


Figure 17 - Clivage canonique de l'APP.

A. Voies amyloïdogénique et non-amyloïdogénique de l'APP. En rouge, la région correspondant à l'A β .
B. Séquence d'acides aminés de l'A β , et les sites de clivages par les α , β et γ sécrétases.

Source : Müller et al. 2017.

Le clivage de l'APP participe à sa régulation et son renouvellement membranaire (Tan and Gleeson, 2019). Lors de la biosynthèse de l'APP, la protéine est transportée du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, puis jusqu'à la membrane plasmique ou des endosomes par le biais de protéines cargo. Au niveau de la membrane, la voie non-

amyloïdogénique sera favorisée (Parvathy et al., 1999; Chyung and Selkoe, 2003). Cependant, lorsque l'APP est retenue ou réinternalisée dans des vésicules de type endosomes ou synaptosomes, seules les β et γ -sécrétases sont présentes et donc, seule la voie amyloïdogénique peut se produire (Koo and Squazzo, 1994; Parvathy et al., 1999; Tan and Gleeson, 2019).

Le trafic de l'APP intracellulaire et la régulation de son adressage à la membrane est modulée par l'activité neuronale, avec une augmentation du transport jusqu'aux synapses (Tampellini et al., 2009). Les α et β secrétases agissent donc à deux localisations différentes (membrane ou vésicule) et sont sensibles à l'activité de la cellule, ainsi qu'à l'organisation de la membrane (Reiss and Bhakdi, 2017; Tan and Gleeson, 2019). Les modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations de l'APP ou de la β -sécrétase vont aussi moduler leur trafic et le clivage amyloïdogénique (Mañucat-Tan et al., 2019).

L'accumulation d'A β dans les plaques amyloïdes est observée dans trois contextes : en contexte physiologique en lien avec le vieillissement, dans le syndrome de Down (Trisomie 21) et dans la MA. Dans le syndrome de Down, les caractéristiques neuro-pathologiques avec la présence de plaques sont semblables à celles observées chez les patient.e.s atteints de la MA. La présence d'un chromosome 21 surnuméraire a permis d'identifier la région chromosomique contenant le gène de l'APP ; il existe de fait une copie supplémentaire du gène chez les personnes atteintes de ce syndrome (Kang et al., 1987; St George-Hyslop et al., 1987). L'expression de la protéine à de plus hauts niveaux va donc augmenter la quantité d'A β produite par la voie amyloïdogénique et conduire à l'accumulation, ainsi qu'à l'agrégation, des peptides en plaques amyloïdes (Wisniewski et al., 1985). En plus de ces plaques, des dégénérescences neurofibrillaires et des altérations cognitives importantes sont aussi décrites chez des patient.e.s âgé.e.s ayant le syndrome de Down.

L'identification de la région chromosomique contenant le gène de l'APP a permis la découverte d'une première mutation d'APP dans une forme familiale de la MA (Goate et al., 1991). Depuis cette étude pionnière, de nombreuses mutations ont été retrouvées dans les formes familiales de la maladie, au niveau des gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2*. Ces mutations autosomiques dominantes conduisent à des EOAD et à leur progression fulgurante.



Figure 18 - Séquence d'acides aminés de l'A β portant des mutations majeures dans la MA.

Les flèches violettes indiquent les sites de clivage des β , α et γ secrétases. En rouge sont indiqués les mutations pathogéniques dominantes, en jaune la mutation Islandaise protectrice. Adapté de alzforum.org

Aujourd'hui 78 mutations de l'*APP* sont connues. Celles systématiquement associées à la MA se situent principalement à proximité des sites de clivage des α , β et γ sécrétases, et concernent 16 acides aminés (Figure 18) (Bi et al., 2019; Mutations, 2023). Par exemple, la double mutation K690N_M671L retrouvée dans la population suédoise se situe au niveau du site de clivage de BACE1, dans l'extrémité N-terminale de la séquence du peptide A β , et conduit à une augmentation de sa production et de sa sécrétion (Mullan et al., 1992). D'autres mutations se produisent dans la séquence de l'A β comme les mutations en position 692 à 694 (par exemple hollandaise et arctique) qui bloquent le site de clivage de l' α -sécrétase, ou bien limitent l'adressage à la membrane de l'APP, favorisant ainsi la voie amyloïdogénique et provoquant *in fine* une agrégation plus importante de l'A β en plaques amyloïdes (Levy et al., 1990; Kamino et al., 1992; Sahlin et al., 2007). Les mutations entre les résidus 714 et 723 (par exemple allemande et ibérienne) vont affecter le site de clivage de la γ -sécrétase et favoriser le clivage de l'A β en position 42, en augmentant le ratio A β 42/A β 40 (Cruts et al., 2003; Guerreiro et al., 2010). Les effets de ces mutations sont donc multiples puisqu'elles peuvent augmenter la production d'A β , favoriser les formes d'A β les plus toxiques ou modifier leurs propriétés d'agrégation. De manière surprenante, une mutation particulière de l'*APP* identifiée dans un screening de la population d'Islande (mutation islandaise) s'est révélée protectrice dans la MA. En effet, la substitution A673T permet de limiter le clivage de l'APP par la β -sécrétase, limitant de 40% la production du peptide A β (Peacock et al., 1993; Jonsson et al., 2012).

La majorité des mutations qui affectent les gènes codant pour les sous-unités catalytiques de la γ -sécrétase concerne *PSEN1*, avec 350 mutations dont plus de 80 acides aminés substitués donnant lieu à des mutations pathologiques dominantes, contre environ 80 mutations de *PSEN2* connues à ce jour et seulement deux résidus pathologiques (Mutations, 2023). Les effets des mutations des *PSEN1/2* sont débattus car certaines études décrivent une augmentation du ratio A β 42/A β 40 (Liu et al., 2017), alors que d'autres travaux suggèrent une perte de fonction de la γ -sécrétase, sans augmentation des niveaux d'A β , ni du ratio A β 42/A β 40 (Bentahir et al., 2006; Sun et al., 2017). Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer l'effet délétère des mutations des *PSEN* sans augmentation des niveaux d'A β . L'une d'entre elle propose que le clivage impacte d'autres substrats du complexe γ -sécrétase, comme par exemple la voie Notch qui module de très nombreuses fonctions dans le SNC (Bentahir et al., 2006). Il est aussi possible de considérer le rôle propre de la protéine ; car la *PSEN1* seule est capable de moduler certaines fonctions homéostatiques au niveau du réticulum endoplasmique ou de la membrane plasmique, et ces fonctions-là seraient à l'origine du développement de la MA (Deaton and Johnson, 2020).

Les porteuses et porteurs des mutations pathogéniques des gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2* présentent des formes très sévères et généralement précoces de la MA. La connaissance de ces variants génétiques a permis le développement de modèles murins de la MA, et on compte aujourd'hui 103 modèles de souris Alzheimer basés sur une ou plusieurs mutations de ces trois protéines (Research models, 2023). Il existe des modèles Knock-In (KI) ou Knock-Out (KO), présentant une ou plusieurs mutations d'une même protéine, des doubles mutants (exemples : APP-PS1, APP-ApoE) ou encore des multiples mutants comme les 3xTg (APP-PS1-MAPT) ou les 5xFAD (3 mutations *APP* et 2 mutations *PSEN1*). Les fonds génétiques de ces modèles, le type et l'évolution temporelle des lésions et l'apparition d'éventuels troubles du comportement offrent un panel de modèles d'études large à la communauté scientifique (Jankowsky and Zheng, 2017). En particulier, nous nous intéresserons dans la thèse au modèle APPPS1-21 développé par l'équipe de Mathias Jucker, qui porte la double mutation Suédoise K690N_M671L de l'*APP*, ainsi qu'une mutation de la *PSEN1* L166P (Radde et al., 2006). Ce modèle présente l'intérêt de développer très tôt des plaques amyloïdes dans le cortex et dans l'hippocampe, avec une perte d'épines dendritiques et de synapses qui s'accompagne de déficits cognitifs (Radde et al., 2006; Bittner et al., 2012; Paumier et al., 2022).

ii. Formes d'A β

Les peptides d'A β résultant des deux clivages séquentiels de l'APP par la voie amyloïdogénique peuvent avoir de 38 à 43 acides aminés, en fonction de l'activité de la γ -sécrétase. Dans la MA, on retrouve principalement des monomères de 40 et 42 acides aminés. Cette différence de 2 acides aminés confère une meilleure solubilité à l'A β 40, tandis que l'A β 42, plus hydrophobe, a une plus grande tendance à s'agréger (Bitan et al., 2003). Les interactions hydrophobes favorisent le changement de conformation des monomères qui adoptent alors une structure mal repliée. Une combinaison de techniques de biochimie analytique (notamment la chromatographie par exclusion de taille ou SEC) et structurale a montré que l'A β 42 s'associe rapidement en dimères, trimères et tétramères, qui peuvent être stabilisés par certains tampons, puis en pentamères, hexamères et en oligomères de taille supérieure à 50 kDa, et en protofibrilles (Ahmed et al., 2010). Ce processus de formation d'oligomères à partir de monomères est appelé nucléation primaire (Figure 19), et dépend de plusieurs facteurs comme la concentration en monomères, en sel, la température et le pH. Cette nucléation primaire comprend deux phases, une phase initiale d'oligomérisation, qui correspond à une phase de latence, et une phase d'élongation. La formation des oligomères est une étape importante car ces agrégats d'A β intermédiaires de nature pré-fibrillaires vont

servir de matrice à la formation de fibrilles après leur changement de conformation en structures riches en feuillets β (Chatani and Yamamoto, 2018).

La phase d'élongation conduit ensuite à la formation de protofibrilles solubles, puis de fibrilles. Un groupe s'est intéressé à l'effet de la mutation autosomique dominante de l'APP Arctique (E693G), située au milieu de la chaîne d'acides aminés de l'A β , et a regardé l'agrégation des monomères (Johansson et al., 2006). Par chromatographie (SEC), l'étude a montré que la mutation Arctique augmentait la vitesse d'oligomérisation puis d'assemblage en protofibrilles. Ces procédés sont sensibles à la température, avec une agrégation optimale à 37°C, mais sont aussi dépendants de la charge ionique et du pH. La mutation E693G augmente l'agrégation des monomères d'A β en oligomères pour différents paramètres physico-chimiques. Il est aujourd'hui connu que de nombreux autres facteurs peuvent influencer la formation des agrégats *in vivo*, avec des modifications post-traductionnelles telles que des oxydations, phosphorylations ou des complexes pyroglutamate (Thal et al., 2015). Le processus de formation des oligomères et protofibrilles est donc un élément important de la pathogénicité de la MA.

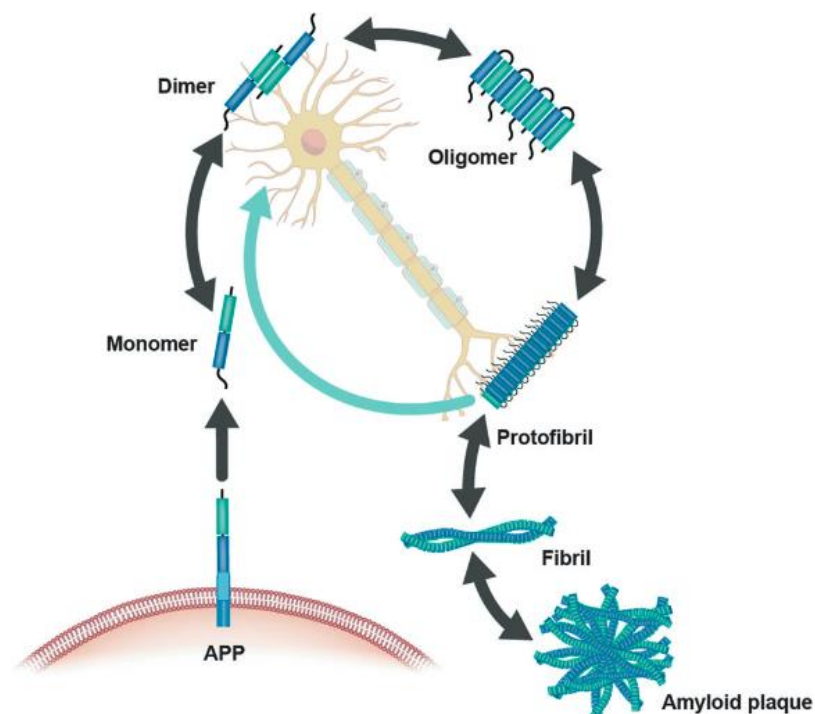


Figure 19 - Processus d'agrégation de l'A β .

Source : Hampel et al. 2021

A cette nucléation primaire succède une nucléation secondaire où les fibrilles d'A β vont servir de catalyseurs et ainsi permettre la formation de nouveaux oligomères en grand nombre. Ces oligomères fibrillaires se forment à la surface des fibrilles préexistantes à partir des monomères (Ashe, 2020; Hampel et al., 2021). Les fibrilles possèdent une structure en

feuillets β croisés qui peut être de nature parallèle ou antiparallèle. Il existe un certain degré de polymorphisme des fibrilles, mais le processus de nucléation secondaire permet de produire des fibrilles « filles » en tout point semblables aux fibrilles « mères » (Zimmermann et al., 2021).

Ce sont ces structures fibrillaires qui s'assemblent ensuite en plaques, dont les morphologies sont très variées. Ces plaques, de morphologies différentes, sont généralement classées en plaques diffuses, autrement dit sans $A\beta$ fibrillaire, en plaques fibrillaires ou à cœur dense. Ces trois morphologies sont présentes dès les stades précoces de la maladie, mais les plaques fibrillaires et à cœur dense deviennent prépondérantes avec la progression au stade de démence (Dickson and Vickers, 2001). La composition des plaques diffère aussi par la nature des isoformes d' $A\beta$ qui les compose. Par exemple, les plaques matures (denses) et immatures (compactes, mais sans cœur dense) sont composées d' $A\beta$ 40 et 42, tandis que les plaques diffuses ne sont composées que de l'isoforme 42 et les plaques en corps à grain presque exclusivement d' $A\beta$ 40 (Iwatsubo et al., 1994; Boon et al., 2020). L'agencement de la plaque peut aussi rendre plus ou moins accessible certaines isoformes, avec par exemple des plaques en pelote de laine ayant un centre riche en $A\beta$ 40 et encerclé d'une couronne d' $A\beta$ 42 (Boon et al., 2020). Récemment, une étude a montré d'importantes différences de morphologie de plaques selon le modèle murin de la MA et les variants génétiques considérés (APP, PS1, PrPc ; $A\beta$ humain ou murin) (Xu et al., 2020). En plus de ces différences de structure et de composition, ces auteurs ont montré une très importante variabilité de la solubilité des agrégats d' $A\beta$ chez ces souris mutantes. La présence d' $A\beta$ 40 et 42 dans les plaques à cœur dense est associée au plus fort taux de protéines cytosoliques insolubles. Il est désormais connu que les plaques amyloïdes et les fibrilles peuvent se désassembler en protofibrilles, par un processus de fragmentation, et générer des monomères et des oligomères dans une phase de nucléation secondaire. Ces oligomères nouvellement créés vont exercer un rétrocontrôle positif et amplifier la formation d'agrégats amyloïdes, qui augmenteront la neurotoxicité (Figure 19) (Cohen et al., 2013).

Les monomères d' $A\beta$ sont impliqués dans la neurotransmission (trafic vésiculaire, signalisation intracellulaire, maintien de l'équilibre énergétique neuronal), la neurogénèse hippocampique, ou encore l'homéostasie lipidique (Hampel et al., 2021). Mais le rôle pathologique des agrégats d' $A\beta$ est difficile à cerner, et est encore aujourd'hui débattu. Les dépôts amyloïdes sous forme de plaques sont très nombreux dans le parenchyme de patients MA, mais il n'y a pas de corrélation entre la quantité de plaques et les altérations cognitives (Braak and Braak, 1991). De plus, les atteintes neuronales et la mort cellulaire sont importantes dans des régions ne contenant pas de dépôts fibrillaires. Les plaques amyloïdes ne seraient donc pas impliquées dans la toxicité de l' $A\beta$. Depuis ce constat, un groupe a estimé

que la quantité d'A β soluble dans le cerveau de personnes atteintes de la MA corrèle avec les DNF, donc la neurodégénérescence, et par extension avec le stade de la maladie (McLean et al., 1999). Cette étude a souligné le rôle des formes solubles d'A β dans l'altération de l'homéostasie neuronale, y compris dans des régions sans plaque amyloïde. Certaines difficultés techniques ont compliqué la caractérisation des espèces toxiques d'A β . Nous avons précédemment vu que les peptides A β vont de façon dynamique s'assembler ou se désassembler en monomères, oligomères et protofibrilles, mais sont aussi sensibles à des variations physico-chimiques (température, pH). Plusieurs groupes ont cherché à extraire et à identifier le type et les proportions d'oligomères retrouvés dans des homogénats de cerveau de patient.e.s MA ; et ont observé qu'une extraction dénaturante avec la présence du détergent Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) induit l'oligomérisation de l'A β (Bitan et al., 2005; Tew et al., 2008). Par la suite, une étude a même suggéré que les oligomères de petit poids moléculaire, notamment les dimères observés en western blot de type SDS-PAGE à partir d'homogénats, ne seraient qu'artificiellement créés par l'usage du détergent (Watt et al., 2013). Ces dimères n'étaient en effet pas retrouvés après analyse des homogénats par spectrométrie de masse. Les techniques de purification par SEC non dénaturante développées par la suite ont permis d'obtenir des agrégats d'A β naturel de différentes tailles, et de les appliquer dans des modèles *ex vivo* pour étudier leur toxicité. L'utilisation d'A β synthétique *in vitro* a également permis de caractériser la toxicité des agrégats d'A β . Il est important de noter que des oligomères de même taille peuvent avoir des conformations et des structures distinctes qui sont reconnues par des anticorps spécifiques (Kayed et al., 2007). Ces anticorps permettent ainsi de distinguer les oligomères pré-fibrillaires des oligomères fibrillaires. Cependant, la relation entre structure et toxicité des oligomères reste une question encore largement débattue.

Benilova et al. ont comparé les effets délétères d'espèces oligomériques d'A β obtenues dans de nombreuses études et par plusieurs méthodes (Benilova et al., 2012). Dans la majorité des cas, les oligomères d'A β induisent une modification de la morphologie des dendrites et une synaptotoxicité. Des travaux ont caractérisé l'effet des formes solubles d'A β , en particulier les monomères et dimères, isolés de cerveaux de patient.e.s MA (Shankar et al., 2008). L'application d'A β soluble sur des coupes d'hippocampe de souris entraîne une diminution de la LTP et de la LTD (dépression à long terme), ainsi qu'une diminution de la densité d'épines dendritiques sur des tranches organotypiques de rat. De plus, l'injection intraventriculaire d'A β chez le rat conduit à des atteintes cognitives, mesurées par un test d'évitement passif.

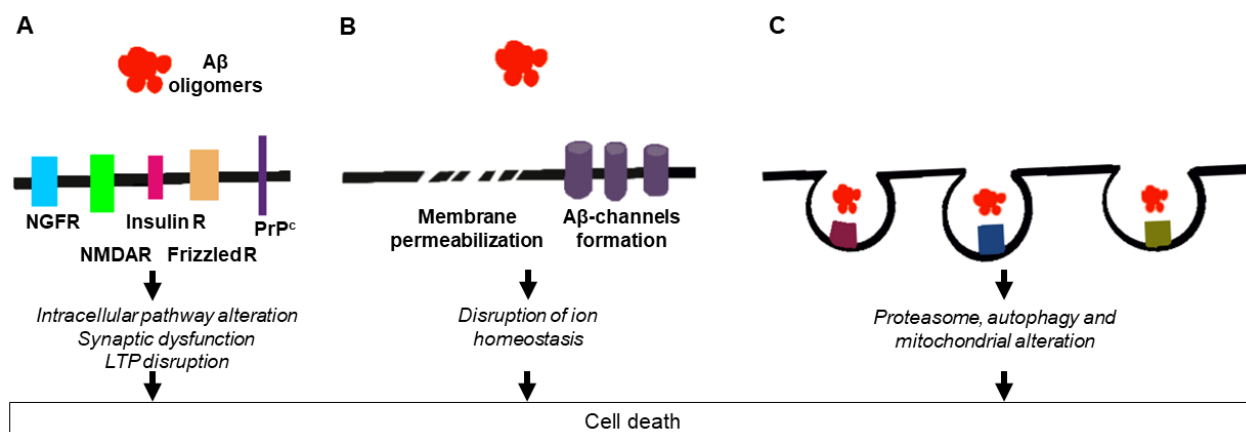


Figure 20 - Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité induite par l'Aβ.

A. Toxicité neuronale par liaison aux récepteurs. **B.** Altération des échanges ioniques.

C. Internalisation et toxicité intracellulaire. *Source : Kaye et Lasagna-Reeves 2012.*

L'effet neurotoxique de l'Aβ peut se produire par (1) fixation des oligomères à des récepteurs membranaires, (2) perturbation de l'homéostasie par modification de la perméabilité membranaire et des flux ioniques et (3) internalisation et toxicité intracellulaire (Figure 20) (Kayed and Lasagna-Reeves, 2012). Un mécanisme récemment proposé est la fixation d'oligomères ou de protofibrilles par exemple par les récepteurs neuronaux PrP^c (Protéine du prion cellulaire) ou des récepteurs de fragment Fc (FcγRIIb) (Amin and Harris, 2021). Ces travaux ont montré que ces récepteurs fixent une extrémité des formes neurotoxiques d'Aβ, bloquent leur processus de fibrillation, et de cette manière, conservent les formes les plus toxiques à la membrane. La signalisation neurotoxique résultant de cette interaction Aβ/PrP^c pourrait passer par le récepteur glutamatergique mGluR5, car l'absence de celui-ci bloque l'activation de la voie Fyn, la perte dendritique et les défauts cognitifs chez des souris APP/PS1 (Um et al., 2013). De plus, il a été montré chez plusieurs modèles de souris APP/Tau et chez des patients MA, que l'Aβ, PrP^c et Tau interagissent, conduisant à l'hypothèse que PrP^c serait impliqué dans l'amplification de la dérégulation de Tau par la pathologie amyloïde (Gomes et al., 2019).

b. Tau

La protéine TAU est codée par le gène *MAPT* présent sur le chromosome 17. Il s'agit d'une protéine cytosolique associée aux microtubules, exprimée presque exclusivement par les neurones dans le SNC (Wang and Mandelkow, 2016). On retrouve six isoformes principales qui varient dans leur composition en inserts proches de la partie N-terminale (0N, 1N ou 2N), et en domaines C-terminal répétés de liaison aux microtubules (3R ou 4R). Les isoformes 4R

ont ainsi la capacité de liaison et l'efficacité d'assemblage des microtubules la plus forte. La protéine TAU peut subir des modifications post-traductionnelles, et en particulier des phosphorylations dans le cas de la MA, qui résultent de l'action de très nombreuses kinases comme la *Cyclin-Dependant Kinase* (CDK5), la GSK-3 β , les *Microtubule Affinity Regulatory Kinase* (MARK), ou encore des tyrosines kinases (exemple : SYK, FYN) (Mandelkow et al., 2007; Wang and Mandelkow, 2016). La principale fonction de TAU est son rôle dans la dynamique d'assemblage et de désassemblage des microtubules du compartiment axonal (Figure 21A) (Wang and Mandelkow, 2016) qui lui permet de contrôler la réorganisation du cytosquelette lors de la formation des neurites. TAU module aussi l'activité des moteurs moléculaires, comme la kinésine et la dynéine, qui régulent le transport antérograde et rétrograde des cargos le long des microtubules dans l'axone. De plus, l'inactivation de Tau par transfert viral (ARN-sh) dans l'hippocampe de souris adultes, suggère son implication dans la régulation de l'activité neuronale, la plasticité synaptique et la mémoire spatiale (Velazquez et al., 2018). Lorsque l'expression endogène de Tau est invalidée dans des modèles murins de la MA, leur susceptibilité à l'excitotoxicité et leurs déficits cognitifs sont réduits (Roberson et al., 2007). Ceci suggère que l'absence de Tau protège les neurones de l'action délétère et excitotoxique de l'A β sur l'activité neuronale.

Dans la MA, TAU est agrégée sous formes de structures filamenteuses hélicoïdales ("*Paired Helical Filament*") dans les neurones qui composent les DNF (Mandelkow et al., 2007). Ces agrégats de TAU sont retrouvés dans les fibres tortueuses des dendrites, les neurites dystrophiques autour des plaques neuritiques et les DNF dans le soma des neurones. Les stades d'agrégation de TAU sont assez semblables à ceux de l'A β , avec des phases de nucléation et d'élongation (Wang and Mandelkow, 2016). Les monomères phosphorylés s'assemblent en oligomères, puis en filaments hélicoïdaux qui sont des structures riches en feuillets β . Leur regroupement donne lieu aux DNF. Il est aujourd'hui admis que les oligomères sont la forme responsable de la toxicité de la protéine TAU, tandis que les structures hélicoïdales et DNF ne seraient qu'une résultante de l'agrégation (Wang and Mandelkow, 2016; Liu et al., 2020).

Aucune mutation du gène *MAPT* n'a été identifiée comme responsable du développement de la MA, ni même en tant que facteur de risque (Mutations, 2023). Cependant plusieurs mutations permettent d'expliquer le déclenchement, la physiopathologie et le mode de transmission d'autres tauopathies, et en particulier de la démence fronto-temporale. La pathologie Tau dans la MA ne s'explique donc pas par la présence de facteurs génétiques qui impactent directement la structure ou la fonction de la protéine. En condition physiologique chez l'adulte, TAU n'est que très peu phosphorylée, tandis que dans la MA, on retrouve 3 à 4 fois plus de phosphorylations par protéine, et le niveau de phosphorylation suit la progression de la pathologie (Köpke et al., 1993; Wesseling et al., 2020). Actuellement, plus de 40

phosphorylations différentes de TAU sont associées à la MA (Mutations, 2023). La protéine physiologique reste stable et associée aux microtubules, alors que l'excès de phosphorylation augmente sa capacité d'agrégation sous forme de structures filamenteuses hélicoïdales (Alonso et al., 2001; Liu et al., 2020). De nouvelles approches protéomiques ont permis d'identifier l'ensemble des partenaires moléculaires qui interagissent avec ces formes phosphorylées de TAU chez les personnes atteintes de la MA. La grande majorité des protéines partenaires appartient à la voie du protéasome, et pourrait révéler un déficit de dégradation des protéines dans la MA (Kavanagh et al., 2022).

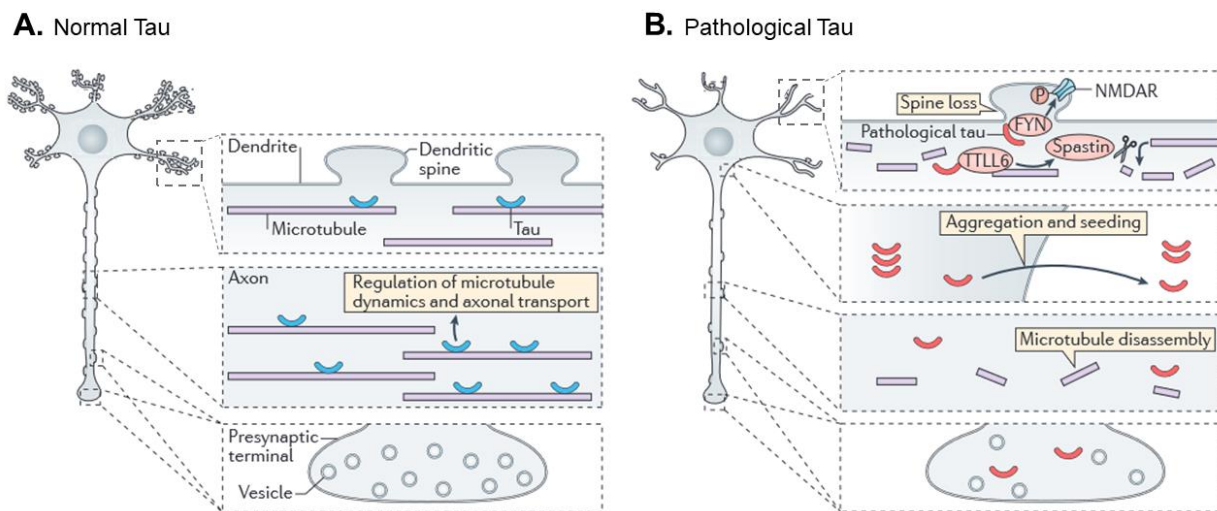


Figure 21 - Fonctions de Tau en condition physiologique ou pathologique.

A. Implications de la forme normale de Tau dans le fonctionnement neuronal. Tau stabilise les microtubules, principalement au niveau axonal, mais peut être aussi retrouvée dans les dendrites.

B. La forme pathologique de Tau dans le dysfonctionnement neuronal. Tau hyper phosphorylée est responsable du désassemblage des microtubules au niveau de l'axone, et altère aussi l'adressage des vésicules pré-synaptiques. On peut la retrouver dans le compartiment post-synaptique des épines dendritiques, ce qui désorganise la synapse et induit une perte des épines dendritiques. Les agrégats de Tau peuvent aussi être libérés dans le milieu extracellulaire, et propager par diffusion la pathologie Tau. Adapté de Wang et Mandelkow 2016.

Deux études ont mesuré des phosphorylations spécifiques de TAU dans le LCR de patient.e.s Alzheimer, et ont ainsi pu mettre en évidence que certains sites de phosphorylation en particulier étaient associés à la progression de la MA (Barthélemy et al., 2020; Suárez-Calvet et al., 2020). Dans le LCR de patient.e.s au stade préclinique de fMA ou sMA, les phosphorylations des résidus T217 et T181 augmentent pour des stades très précoces, environ 20 ans avant le diagnostic de MA ; puis une augmentation de la phosphorylation T205 et de TAU totale est retrouvée 10 ans avant l'apparition des symptômes (Barthélemy et al., 2020). L'augmentation des niveaux de phosphorylation T217 et T181 a été confirmé sur une cohorte de patient.e.s présentant un début de pathologie amyloïde (A+) au stade préclinique de la MA, mais une augmentation très précoce de la phosphorylation T231 a aussi été mise

en évidence (Suárez-Calvet et al., 2020). L'hyperphosphorylation de Tau induit donc l'agrégation de la protéine, avec certains sites phosphorylés spécifiques de la MA.

La protéine Tau hyper-phosphorylée (ou Tau pathologique) induit une neurotoxicité en perturbant différents mécanismes moléculaires (Figure 21B). Une perte de fonction de la protéine compromet le fonctionnement des microtubules, soit par réduction de leur capacité de liaison à la tubuline, soit par perte de capacité d'assemblage de la tubuline (Barbier et al., 2019). Cette altération de la dynamique d'assemblage n'est qu'en partie compensée par d'autres protéines associées aux microtubules. Tau pathologique s'associe aussi aux vésicules synaptiques dans l'élément pré-synaptique, et ralentit leur adressage à la membrane, bloquant donc la neurotransmission (Wu et al., 2021). De plus, elle se retrouve aussi de manière aberrante dans le compartiment post-synaptique, et provoque une altération de l'adressage et de la fonction des récepteurs aux neurotransmetteurs, induisant un influx calcique, de l'excitotoxicité et donc une altération de la transmission synaptique.

Le rôle de Tau dans la MA a été initialement suggéré par le lien entre la quantité et la propagation des DNF dans différentes aires cérébrales et la progression de la pathologie selon les stades de Braak (Braak and Braak, 1991). Aujourd'hui, un autre argument s'ajoute pour renforcer la possibilité de la pathogénicité de Tau : sa propagation selon un mode « *Prion-like* » (Clavaguera et al., 2017). Dans ce mode de transmission, les protéines Tau pathologiques libérées dans la matrice extracellulaire sont internalisées par d'autres cellules, et induisent l'agrégation de Tau physiologique dans cette nouvelle cellule. Les protéines TAU fibrillaires provenant de cerveaux de personnes atteintes de la MA ont été purifiées, puis injectées dans l'hippocampe de souris non-transgéniques (Guo et al., 2016). La protéine TAU humaine a induit l'apparition de dépôts de type DNF dans plusieurs régions cérébrales ipsilatérales et controlatérales à l'injection, avec une propagation qui s'amplifie avec l'âge de la souris. Les agrégats alors formés sont composés de protéine Tau endogène de souris. Cette étude a donc mis en évidence que les fibrilles TAU humaines peuvent faire office de matrice et induire l'agrégation des monomères murins Tau, mais aussi leur propagation. La pathogénie et la capacité de diffusion de TAU hyper-phosphorylée a mis en lumière sa potentielle implication dans l'initiation de la MA.

3. Hypothèses de la MA

a. Hypothèse cholinergique

L'identification de l'élément déclencheur de la MA est source de débat. La première hypothèse formulée était l'hypothèse cholinergique. Dans les années 60, l'importance du système cholinergique dans la mémoire a été démontrée par la perte de capacité de mémorisation de rats recevant de la scopolamine, un antagoniste de l'acétylcholine (Pazzagli and Pepeu, 1965). Par la suite, des études *post mortem* de patient.e.s atteints de MA ont montré une perte des neurones cholinergiques dans le lobe temporal, mais aussi une diminution de l'activité de la choline acétyltransférase, enzyme responsable de la synthèse de l'acétylcholine (Davies and Maloney, 1976; Bowen and Davison, 1980). Ainsi, le défaut du système cholinergique a été proposé comme hypothèse de mécanisme à l'origine de la MA (Davies and Maloney, 1976; Francis et al., 1999). Il a été suggéré que la diminution de transmission cholinergique dans les neurones pyramidaux du cortex entraîne ensuite l'hyperphosphorylation de Tau, et une surproduction d'A β . Selon cette hypothèse, le développement de traitements visant une augmentation des niveaux d'acétylcholine et rétablissant sa fonction devraient permettre une amélioration des fonctions cognitives chez les malades (Long and Holtzman, 2019). Aujourd'hui, il est admis que la dysfonction cholinergique est effectivement impliquée dans les troubles cognitifs de la MA, mais elle n'en serait pas à l'origine.

b. Hypothèse neurovasculaire

L'hypothèse neurovasculaire propose que les troubles vasculaires soient à l'origine de la MA. L'observation d'une forte corrélation entre MA et AAC, mais aussi avec d'autres pathologies vasculaires (athérosclérose, artériosclérose), lie déjà altération neurovasculaire et démence (Arvanitakis et al., 2011, 2016). La présence de pathologie vasculaire est associée à une plus forte probabilité de développer la MA (Arvanitakis et al., 2016). Cette hypothèse a notamment été appuyée par l'observation d'une importante perméabilité de la BHE au niveau de l'hippocampe chez des personnes porteuses d'*APOE- ϵ 4* (Montagne et al., 2020)

Une analyse multifactorielle a caractérisé la transition des patient.e.s de stade préclinique à la MA, en considérant l'A β , le métabolisme, la vascularisation, les atteintes fonctionnelles (activité neuronale), les atteintes structurales et la mémoire (Iturria-Medina et al., 2016). Le premier évènement dérégulé observé dans cette cohorte est le fonctionnement vasculaire, suivi par l'A β et le métabolisme. De plus, la perméabilité de la BHE a été mesurée dans l'hippocampe de personnes sans atteinte cognitive et avec MCI, par une technique de contraste dynamique avec IRM, et a révélé une augmentation de la perméabilité chez les

patient.e.s MCI (Montagne et al., 2015). La dysfonction microvasculaire, neurovasculaire et de la BHE serait donc un élément précurseur dans la MA. Or, ces systèmes sont responsables de l'apport en nutriments, ainsi que de l'élimination d'éléments vasculo-toxiques et neurotoxiques. Dans l'hypothèse vasculaire, le dysfonctionnement neurovasculaire est responsable de l'accumulation d'A β , qui sera ensuite responsable de l'apparition de TAU hyper-phosphorylée, puis de la mort neuronale (Zlokovic, 2011). De plus, l'A β produit entraîne une vasoconstriction des capillaires cérébraux chez les patient.e.s atteints de MA, par contraction des péricytes (Suo et al., 1998; Nortley et al., 2019).

c. Hypothèse Tau

L'hypothèse Tau stipule que l'apparition de TAU pathologique est à l'origine de la MA. Ce postulat s'appuie sur de multiples observations de formes pathologiques de Tau sous la forme d'agrégats non fibrillaires dans le Locus Cœruleus, dès l'enfance ou l'adolescence chez certaines personnes (Braak and Del Tredici, 2012). La présence de TAU dans cette région précède donc d'une décennie l'apparition des plaques amyloïdes dans le cortex (Arnsten et al., 2021). La présence de ces formes pathologiques de TAU dès l'adolescence suggère que le processus pathologique de la MA inclut une phase prodromique particulièrement prolongée. Il existerait un continuum entre ces changements pathologiques précoces de TAU et les déficits cognitifs caractéristiques de l'adulte âgé. En effet, les déficits cognitifs qui apparaissent à des stades plus avancés de la maladie corrént avec la progression des dépôts neurofibrillaires de TAU (Braak and Braak, 1991). L'argumentaire soutenant cette hypothèse Tau est que l'hypothèse de la cascade amyloïde se fonde sur des mécanismes prodromiques observés dans des formes familiales de la MA, sans considérer les sMA comme fondamentalement différentes.

La protéine hyper-phosphorylée qui s'accumule dans les neurones du Locus Cœruleus peut être transmise aux aires cérébrales interconnectées, et notamment au cortex entorhinal, via les neurones de projection glutamatergiques du locus. Cependant, ces formes pathologiques de TAU n'induisent la mort des neurones du locus que tardivement au cours de la MA (Braak and Del Tredici, 2012; Arnsten et al., 2021). Selon cette hypothèse, les neurones les plus vulnérables utilisent de fortes concentrations de calcium intracellulaire pour assurer leur fonction physiologique, comme par exemple les neurones du Locus Cœruleus. Le mécanisme physiopathologique implique alors la perte de l'homéostasie calcique dans ces neurones, provoquant une activation anormale de kinases, notamment la Glycogène Synthase Kinase 3 β (GSK3 β). Cette activation excessive conduit ensuite à une phosphorylation anormale de la protéine Tau (Arnsten et al., 2021). Lors de l'apparition de TAU pathogène dans les régions trans-entorhinales et entorhinales, les neurones pyramidaux

glutamatergiques, qui sont plus sensibles aux oligomères et aux fibrilles de TAU, vont dégénérer (Bussière et al., 2003; Wu et al., 2021). La transmission se fait ensuite de neurone à neurone entre régions connectées selon un mode de propagation *Prion-like* Tau, amplifiant l'agrégation pathologique de Tau (Guo et al., 2016; Vogel et al., 2020).

Avant d'induire la mort de neurones, Tau pathogène va perturber le fonctionnement neuronal, et notamment le transport axonal (Wu et al., 2021). Or, une équipe a montré sur des souris 5xFAD qu'une perte de fonction des microtubules entraîne une rétention de la β -sécrétase BACE et de l'APP dans des vésicules, conduisant ainsi à une surproduction d'A β (Sadleir et al., 2016). Sachant que les phosphorylations de Tau altèrent la structure et la fonction des microtubules, Tau pourrait donc être à l'origine d'une surproduction d'A β . Puis, un cercle vicieux se mettrait en place, avec la protéine Tau hyper-phosphorylée augmentant la production d'A β et, en retour l'A β , stimulant la phosphorylation de Tau (Arnsten et al., 2021).

d. Hypothèse de la cascade amyloïde

L'hypothèse de la cascade amyloïde proposée initialement par Hardy et Higgins (1992) postule que l'accumulation d'A β est à l'origine de la MA, et que cette accumulation est induite par un déséquilibre entre la production et l'élimination du peptide (Selkoe and Hardy, 2016). Cette hypothèse est confortée par l'observation des formes familiales de la maladie, où une mutation autosomique dominante des gènes *APP*, *PSEN1* ou *PSEN1/2*, peut induire une augmentation de la production d'A β totale ou d'A β 42 qui serait donc à l'origine du développement de la MA. De plus, la présence d'un chromosome 21 supplémentaire qui porte le gène de l'APP est responsable d'une plus forte prévalence de la MA chez les personnes ayant le syndrome de Down (Hartley et al., 2015). Quant aux formes sporadiques, l'accumulation de l'A β résulterait d'un défaut d'élimination, due par exemple à des facteurs de risques génétiques comme la présence de l'allèle $\epsilon 4$ du gène *ApoE*.

L'accumulation d'A β est donc le point de départ de la cascade amyloïde, terme désignant l'ensemble des mécanismes pathogéniques altérés en aval de l'A β . L'agrégation de l'A β en espèces solubles (oligomères et protofibrilles) induit une toxicité synaptique, perturbant l'homéostasie et la transmission neuronale, comme cela a été montré dans des expériences *in vitro* et dans des modèles animaux de la MA (Shankar et al., 2008). Ces espèces toxiques d'A β sont à l'origine des modifications pathologiques de Tau qui conduisent à la déstabilisation des microtubules, puis à la formation de plaques neuritiques et de DNF (He et al., 2018). L'A β peut se retrouver dans le compartiment intracellulaire des neurones, où un début d'oligomérisation est possible, et pouvant, *in fine* altérer la fonction synaptique (LaFerla et al., 2007). Les différentes espèces d'A β , et notamment les espèces insolubles (fibrilles puis

plaques), sont reconnues par les microglies et les astrocytes, qui réagissent en essayant de contenir et d'éliminer les peptides agrégés. Ces cellules gliales préviennent aussi les cellules voisines du danger reconnu en sécrétant des molécules inflammatoires (Mattiace et al., 1990; Singh, 2022).

Une version revisitée de l'hypothèse amyloïde a récemment été proposée (Frisoni et al., 2022). Cette hypothèse probabiliste considère toujours l'A β comme élément clef dans les mécanismes pathologiques de la MA, mais prend également en compte les facteurs de risque (*APOE- ϵ 4*). L'intérêt de ce modèle alternatif est de considérer le processus pathologique pas seulement selon le prisme des formes de fMA, mais aussi de proposer un schéma de compréhension pour les formes sporadiques. L'équipe reconsidère l'hypothèse selon trois catégories : MA autosomique dominante, MA liée à l'*APOE- ϵ 4* et MA non liée à l'*APOE- ϵ 4* (Figure 22). Ce modèle inclut les événements inducteurs (mutation autosomique ou facteurs de risque), ainsi que la temporalité des pathologies amyloïdes et Tau, et permet donc de réajuster notre conception de la MA selon l'hypothèse amyloïde.

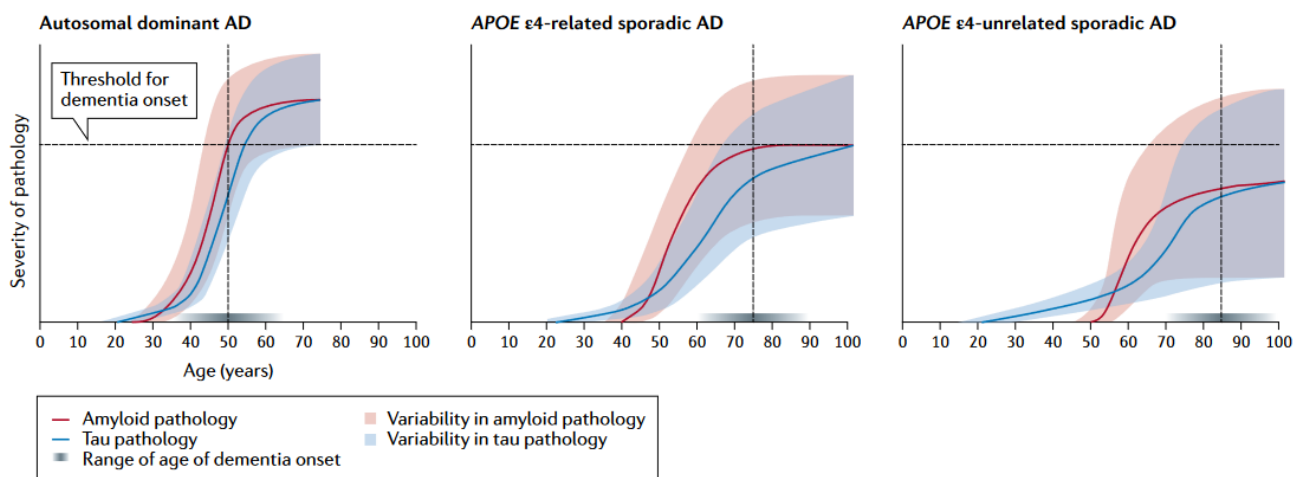


Figure 22 - Dynamique de la progression de la MA selon un modèle probabiliste de la MA.

Cette version revisitée du modèle amyloïde propose une progression des pathologies amyloïdes et Tau différentes selon les formes de MA : familiale autosomique dominante, sporadique pour porteur.euse.s d'*APOE- ϵ 4*, sporadique non lié à *APOE- ϵ 4*.

Source : Frisoni et al. 2022

e. Hypothèse inflammatoire

Cette hypothèse suggère que la neuroinflammation générée, dans un premier temps par les microglies, les astrocytes puis par les cellules immunes périphériques infiltrantes, serait l'élément déclencheur de la MA. Chez les personnes atteintes de MA, une réactivité gliale et une inflammation du parenchyme sont depuis longtemps décrites, notamment à proximité des

DNF et des plaques amyloïdes (Mattiace et al., 1990; Braak and Braak, 1991). La réactivité microgliale observée se caractérise par un changement morphologique des microglies qui présentent des prolongements plus épais et plus nombreux, couplé à un marquage positif HLA-DR, c'est-à-dire du complexe majeur d'histocompatibilité II (Mattiace et al., 1990). De plus, la présence de protéines du complément (C4b) et d'immunoglobulines suggèrent une inflammation locale (Boon et al., 2020; Rahman and Lendel, 2021). Cette réactivité et cette inflammation chronique sont aussi retrouvées dans de nombreux modèles transgéniques de la MA (Research models, 2023).

La neuroinflammation va amplifier le déséquilibre neuronal et favoriser l'apparition des formes pathologiques de Tau. Une équipe a en effet montré sur un modèle murin de Tauopathie (P301S) que la réactivité microgliale et astrocytaire précèdent l'apparition des DNF (Yoshiyama et al., 2007). De plus, les niveaux en cytokine IL-1 β dans les neurones hippocampiques sont aussi augmentés de manière précoce chez ces souris. Or, le blocage du récepteur à l'IL-1 β (IL-1 β R) chez des souris 3xTg MA a révélé que cette cytokine est responsable de l'augmentation d'activité des kinases CDK5 et GSK-3 β , kinases qui phosphorylent Tau (Kitazawa et al., 2011). Le blocage de l'IL-1 β R diminue donc les niveaux de Tau phosphorylés. Ces travaux montrent que la neuroinflammation entraîne la phosphorylation de Tau de manière excessive, ce qui conduit à la formation de neurofibrilles intracellulaires, à l'induction de la mort neuronale et enfin à la dissémination de ces agrégats (Selkoe and Hardy, 2016). La progression des agrégats (amyloïdes et Tau), la neuroinflammation et la mort neuronale vont ainsi mener aux altérations cognitives observées au stade MCI, puis à la démence.

Le modèle proposé pour expliquer l'origine de cette neuroinflammation est celui d'un « *priming microglial* », autrement dit d'une préparation à la réaction immunitaire, responsable d'une part de la synthèse et libération de cytokines, mais aussi de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces changements conduiront à la neuroinflammation et à la neurotoxicité (Figure 23) (Leng and Edison, 2021a). Les cytokines sont reconnues par les astrocytes et perturbent leurs fonctions de régulation de la transmission neuronale et du maintien de l'intégrité de la BHE. Les cytokines et les ROS vont aussi agir directement sur les neurones, entraînant leur dysfonctionnement par une perte synaptique. On parle d'un cercle vicieux où la primo-sécrétion inflammatoire est responsable de l'augmentation de la production et de l'agrégation d'A β . De plus, suite à la stimulation cytokinique, certaines kinases activées vont entraîner l'hyperphosphorylation de Tau. Ces deux types d'agrégats induisent en retour l'activation chronique des cellules gliales (Kinney et al., 2018).

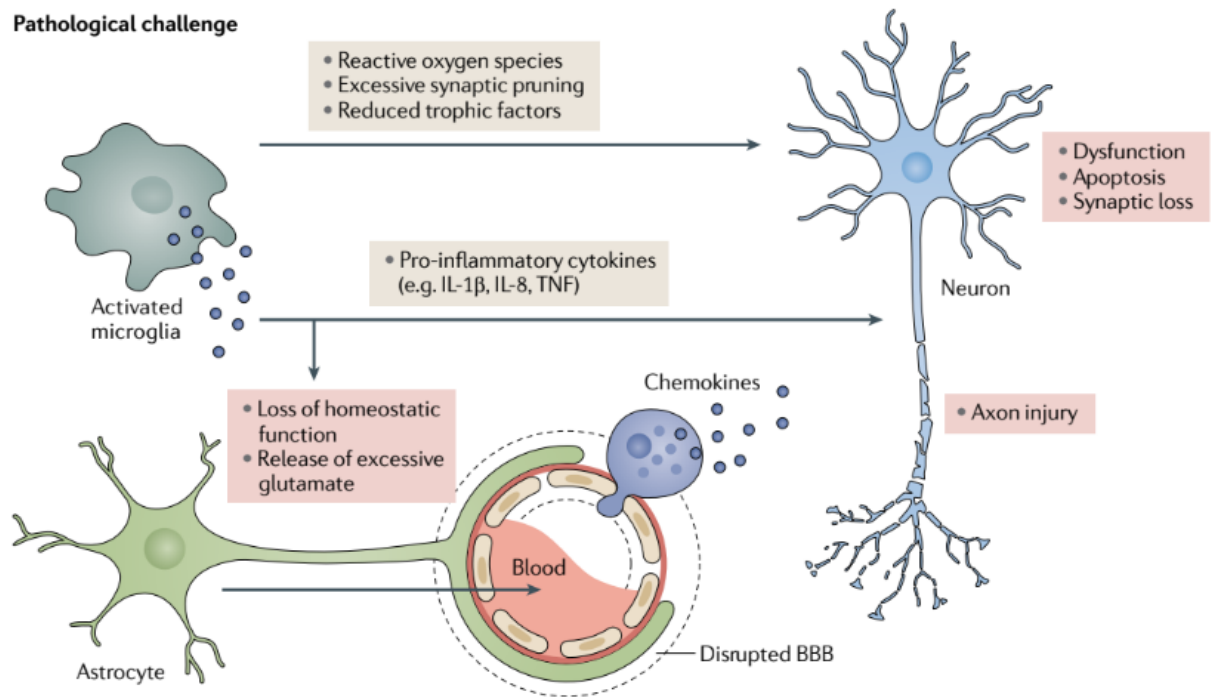


Figure 23 - Hypothèse inflammatoire : la réactivité microgliale initiatrice de l'altération neuronale.
 Source : Leng et Edison 2021

Une question néanmoins reste en suspens : quelle est la raison de la primo-activation gliale ? Des facteurs de risques génétiques affectant la réponse microgliale ont été identifiés par GWAS (mutations *TREM2*, *CR3*) comme étant potentiellement à l'origine du dysfonctionnement microglial (Guerreiro et al., 2013b; Karch and Goate, 2015). D'autres études corrélatives suggèrent que la réactivité microgliale serait due à une infection virale, pouvant avoir eu lieu plusieurs dizaines d'années avant l'apparition des troubles cognitifs. Une méta-analyse récente s'intéressant aux liens potentiels entre exposition virale et maladie neurodégénérative a mis en évidence que le risque de développer la MA était accru chez des patient.e.s ayant un antécédent de méningite ou d'encéphalite virale (Levine et al., 2023). Enfin, une autre possibilité est que la microglie réagisse simplement à la présence d'A β , sans être l'élément déclenchant à l'origine de la MA (Kinney et al., 2018).

4. Thérapeutique

En France, jusqu'en 2018, 4 traitements visant une amélioration des troubles cognitifs étaient présents et remboursés sur le marché. Il s'agissait d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (donépézil, rivastigmine et galantamine) ainsi que d'un antagoniste des récepteurs NMDA du glutamate (Imémantine). Ces différentes molécules visaient donc à améliorer le fonctionnement synaptique chez des patient.e.s Alzheimer présentant une altération cognitive d'un niveau modéré (inhibiteurs acétylcholinestérase) à élevé (antagoniste récepteur glutamatergique). En 2018, le sénat a décidé l'arrêt du remboursement de ces

quatre traitements en raison d'un "intérêt médical insuffisant pour justifier leur prise en charge" (senat.fr, JO Sénat 12/07/2018 - page 3503). Aucun impact de ces traitements n'a été montré sur le délai d'entrée en institution et leur utilisation peut entraîner des effets secondaires importants.

En 2020, 441 molécules étaient en développement, avec respectivement 291 essais précliniques et 150 essais cliniques (van Bokhoven et al., 2021). Aujourd'hui, le défi pour la recherche thérapeutique est de bloquer l'apparition et/ou la progression de la pathologie, dès l'apparition des premiers biomarqueurs positifs. C'est pour cette raison que les traitements développés ciblent principalement l'A β (16%), l'inflammation (13%), les neurotransmetteurs (11%) et Tau (10%) qui sont les premiers à être affectés au cours du processus pathologique. Les deux approches thérapeutiques majeures sont celles privilégiant les petites molécules et les anticorps.

Dans ces approches thérapeutiques ciblant l'A β , le but est de faciliter sa clairance et de limiter son agrégation. Après le développement de l'immunisation active (administration d'A β) qui avait l'inconvénient d'induire des réactions immunes incontrôlées, la stratégie d'immunisation passive (administration d'anticorps ciblant l'A β) a été privilégiée. L'intérêt thérapeutique de plusieurs anticorps monoclonaux ciblant la partie N-terminale ou la partie centrale de l'A β a été évalué en essai clinique de phase III au cours de cette dernière décennie. Ces anticorps ont donné lieu, au mieux, à une réduction de la charge amyloïde avec diminution de la quantité des plaques, mais sans améliorer significativement le déclin cognitif des patient.e.s (Long and Holtzman, 2019). Récemment, deux anticorps ciblant l'A β ont été approuvés par l'agence de la santé aux Etats-Unis en 2022 : l'Aducanumab et le Lecanemab. L'Aducanumab, dirigé contre les acides aminés 3 à 7 de l'A β et commercialisé sous la marque Aduhelm, a été au centre de débats dans la communauté scientifique car la significativité de ses effets sur la cognition a été contestée. Actuellement, cet anticorps peut être administré, mais en suivant une procédure particulière ; il est en phase IV jusqu'à 2026 sur des patient.e.s présentant un début de MA pour déterminer si les effets cliniques sont probants (Cummings et al., 2022). Depuis, le Lecanemab qui cible les protofibrilles solubles d'A β et commercialisé sous le nom Leqembi, a montré des résultats relativement nets, avec une diminution modérée du déclin cognitif sur 18 mois et une réduction de la charge amyloïde des patient.e.s par TEP-A β (van Dyck et al., 2023).

D'autres approches développées cherchent à diminuer la production d'A β en ciblant les β - et γ -sécrétases (Long and Holtzman, 2019; van Bokhoven et al., 2021). Des inhibiteurs de BACE, principalement des petites molécules ont été testées, certaines jusqu'en phase III, mais elles n'ont pas induit d'amélioration notable de la cognition voire même une détérioration. De la même manière, des inhibiteurs ou modulateurs de la γ -sécrétase étaient inefficaces ou néfaste sur la cognition des patient.e.s (Long and Holtzman, 2019).

Malgré un nombre croissant de tests visant à diminuer la pathologie Tau par inhibition de sa phosphorylation (ex : inhibiteur GSK3 β) ou augmentation de son élimination, n'ont jusqu'à présent, pas non plus été concluants (Long and Holtzman, 2019; van Bokhoven et al., 2021).

IV. Microglie et maladie d'Alzheimer

1. Microglie dans la physiopathologie

a. Implication des microglies réactives dans la MA

La découverte des mutations génétiques causales (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*) et des facteurs de risque génétiques (*APOE- ϵ 4*) ont permis une meilleure compréhension des mécanismes pathologiques de la MA. Plusieurs études de criblage dans les années 2010 ont identifié de nouveaux facteurs de risques dans des formes de sMA, qui portaient sur des gènes exprimés par la microglie. Tout d'abord, les gènes *CLU* et *CR1*, codant respectivement pour l'apolipoprotéine J et le récepteur au complément 1 et exprimés par les microglies du CNS, ont été découverts comme de nouveaux facteurs de risque de développer la MA chez un groupe de patients français (Lambert et al., 2009). Les protéines APOJ et CR1 sont toutes deux impliquées dans l'élimination de l'A β , en particulier par les cellules microgliales. Ces travaux ont montré pour la première fois qu'une dérégulation du fonctionnement microglial pouvait être un élément clef dans la pathogénie de la MA. D'autres études de criblage ont identifié des variants communs de gènes exprimés par la microglie, comme *ABCA7*, *CD33* ou la famille de gènes *MS4A*, qui sont des facteurs de risque de niveau modéré de développer la MA (Hollingworth et al., 2011; Naj et al., 2011; Guerreiro et al., 2013a). En 2013, deux groupes identifient des variants rares de la protéine TREM2 (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2*), et en particulier la mutation R47H, comme facteurs de risque élevé de développer la MA (Guerreiro et al., 2013b; Jonsson et al., 2013). Ce récepteur exprimé uniquement par les cellules microgliales dans le SNC et impliqué dans l'élimination de l'A β , a une fois de plus montré l'importance de la fonction microgliale dans la pathologie. Les études de screening génétique et de séquençage ciblé ont permis ainsi d'identifier environ 50 gènes dont les mutations altèrent la clairance de l'A β par les microglies (Kunkle et al., 2019).

Les études *post mortem* ont depuis longtemps montré que les cellules gliales, et en particulier la microglie, subissent des changements importants dans la MA (Mattiace et al., 1990). Les microglies présentent à la fois des altérations morphologiques, mais aussi des

modifications de leurs expressions protéiques (récepteurs, molécules inflammatoires). Ainsi, les cellules microgliales du néocortex de patient.e.s MA, présentent des prolongements plus courts conduisant à une diminution de l'arborisation, et leur marquage d'identification immunohistochimique apparaît ponctiforme avec une morphologie discontinue (Davies et al., 2017). Une revue systématique s'est intéressée aux variations de nombreux marqueurs d'inflammation et de réactivité microgliale, et a ainsi répertorié ces variations dans des tissus *post mortem* MA (Hopperton et al., 2018). Dans la majorité des cas, il a été observé une augmentation des marqueurs d'activation (CMHII, CD68), de la sécrétion des cytokines inflammatoires (IL1 α) mais aussi des variations du niveau d'expression des récepteurs phagocytaires (CD33, TREM2). Cependant, l'étude de la réactivité microgliale et de l'inflammation dans le cerveau de patient.e.s atteint.e.s de la MA est rendue difficile par les conditions variables d'obtention du matériel *post mortem* (raison du décès, temps avant prélèvement *post mortem*, durée de fixation du tissu) (Gomez-Nicola and Boche, 2015).

La meilleure approche utilisée aujourd'hui est celle de l'imagerie par TEP des microglies réactives en utilisant des marqueurs comme ^{11}C -PK11195 ou ^{11}C -PBR28. La TEP permet en effet de suivre l'évolution de l'inflammation *in vivo*, et peut être couplée à des traceurs d'A β (^{11}C -PiB ou ^{18}F -Flutemetamol) ou de TAU (^{18}F -Flortaucipir), ainsi qu'à des tests cognitifs. Plusieurs groupes ont caractérisé les corrélations régionales entre le signal des microglies réactives et l'évolution des stades de la maladie (Edison et al., 2008; Parbo et al., 2017). Le signal ^{11}C -PK11195 est augmenté dans de nombreuses zones corticales et sous-corticales, en particulier dans le cortex frontal, pariétal et temporal. De plus, une forte corrélation entre l'augmentation du signal ^{11}C -PK11195 et ^{11}C -PiB a été observée chez des patient.e.s au stade MCI (Edison et al., 2008; Ismail et al., 2020). Récemment, une étude a combiné des mesures par TEP de l'activation microgliale (^{11}C -PRB28) et de l'accumulation d'A β (^{18}F -Flutemetamol) avec une approche en IRM structurale afin d'évaluer l'intégrité du réseau neuronal (Leng et al., 2023). Il a été observé une relation inverse entre l'activité des zones cérébrales et l'activité microgliale, montrant donc que ces cellules sont capables de perturber l'intégrité du système. Le suivi au cours du temps d'une cohorte de patient.e.s MCI ou non-MA, par TEP a été réalisé par une équipe danoise pour évaluer la microglie (^{11}C -PK11195), l'A β (^{11}C -PiB) et TAU (^{18}F -Flortaucipir) (Ismail et al., 2020). Cette étude a mis en évidence une réactivité microgliale biphasique, avec tout d'abord une augmentation corrélée aux dépôts amyloïdes, puis une réduction de la réactivité jusqu'à une seconde phase d'augmentation en corrélation avec l'accumulation de TAU. Ces différents travaux ont donc démontré *in vivo* que la réactivité microgliale suit la progression de la pathologie, et les mécanismes mis en jeu suivent une dynamique complexe.

b. Cellules immunes et diversité phénotypique

Afin d'évaluer les changements ayant lieu dans la MA, ainsi que l'hétérogénéité des phénotypes cellulaires en réponse au contexte pathologique, de nombreuses études ont réalisé des analyses transcriptomiques *single-cell*. En 2017, deux groupes ont cherché à identifier des populations microgliales dans des modèles murins de MA (5xFAD) ou MA-like (CamKII-p25) (Keren-Shaul et al., 2017; Mathys et al., 2017). L'étude des 5xFAD par Keren-Shaul et al. a mis en évidence l'existence de microglies ayant un profil transcriptomique associé à la pathologie: les DAM (Keren-Shaul et al., 2017). Les DAM présentent de nombreux niveaux de transcrits modifiés par rapport aux microglies homéostatiques, avec une expression fortement augmentée des gènes impliqués dans la phagocytose ou le métabolisme lipidique (DAM1 et DAM2). L'étude des souris CamKII-p25, présentant une pathologie proche de la MA, a distingué deux populations microgliales, celles retrouvées dans la réponse précoce et celles dans la réponse tardive (Mathys et al., 2017). Les gènes modulés dans la réponse tardive sont presque identiques à ceux observés pour les DAM1 et DAM2. Cependant, contrairement à l'étude des 5xFAD, celle-ci révèle un état intermédiaire de réactivité microgliale au début de la neurodégénérescence. Cela suggère que selon le modèle biologique et l'analyse bio-informatique, les études transcriptomiques peuvent être plus ou moins sensibles pour détecter des sous-populations microgliales.

La multiplicité des phénotypes décrits par la suite dans les contextes neurodégénératifs a mis en évidence que les microglies sont aussi diverses en condition physiologique que pathologique, et que dans la MA par exemple, il existe un grand nombre de profils microgliaux. Certains travaux ont caractérisé des phénotypes microgliaux en les décrivant comme communs à plusieurs maladies neurodégénératives. Cependant, une récente étude a mis en évidence des profils transcriptomiques distincts entre des microglies obtenues chez des patient.e.s atteints de la MA ou de la maladie de Parkinson, avec moins de 50% de similarité entre des gènes différentiellement exprimés par rapport au groupe contrôle (Xu et al., 2023). De manière intéressante, les trois sous-populations d'astrocytes réactifs identifiés dans cette même étude avaient des profils semblables dans la MA et la maladie de Parkinson. Ainsi, certains phénotypes microgliaux seraient propres à un environnement pathologique donné.

Cette différence phénotypique peut être due à la présence des marqueurs histopathologiques : A β et Tau. Afin de déterminer l'importance de chacune de ces deux protéines dans les changements d'expression des microglies, une étude a constitué trois cohortes de patient.e.s : Contrôles (A β , TAU-), Contrôles + (A β +, TAU-) et MA (A β +, TAU+) (Gerrits et al., 2021). Deux populations microgliales ont été identifiées : les AD1, retrouvées principalement chez les Contrôles + et MA, avec des variations transcriptomiques proches des DAM ; et les AD2, presque exclusivement retrouvés chez les MA, dont l'apparition coïncide

avec la pathologie Tau. Cette étude montre que les gènes dérégulés pour les AD1 et AD2 ne se chevauchent pas. La présence d'A β induit donc un changement phénotypique, mais la présence conjointe d'A β et de TAU crée une nouvelle sous-population réactive.

Afin de mieux caractériser les microglies présentes autour des plaques amyloïdes, une étude a réalisé une capture laser à différentes distances autour des plaques dans des cerveaux de souris APPPS1-CX3CR1^{+GFP}, a isolé les microglies, puis effectué leur séquençage (Hemonnot-Girard et al., 2022). Trois catégories de microglies ont été considérées : les contrôles (CX3CR1^{+GFP}), les microglies du parenchyme PCM et les microglies associées aux plaques amyloïdes PAM (APPPS1-CX3CR1^{+GFP}). De manière intéressante, les PCM et PAM présentent des altérations transcriptomiques en lien avec la progression de la pathologie, mais avec des profils différents qui suggèrent une fonction spécifique de chaque type de microglie. Parmi les gènes dérégulés, il est important de noter que les PAM présentent une augmentation d'expression des gènes identifiés comme facteur de risque pour la MA, ce qui a aussi été observé chez l'humain.e (Hemonnot-Girard et al., 2022; Xu et al., 2023). L'analyse en séquençage de cellule unique (*single-cell RNA-seq*) de patient.e.s avec des mutations des facteurs de risque microgliaux *TREM2* et *MS4A*, a montré des changements importants du profil transcriptomique des microglies (Brase et al., 2023). Pour les variants *TREM2*, il y a une diminution d'expression des gènes d'activation et une augmentation des gènes homéostatiques ; tandis qu'un tout autre profil inflammatoire est observé pour les variants de la famille génique *MS4A*.

L'étude protéomique des microglies sur des modèles murins APPPS1 et APP^{NF-G-L} a mesuré les variations de leur expression protéique par spectrométrie de masse avec le développement de la pathologie (Sebastian Monasor et al., 2020). Des changements se produisent avec l'accumulation d'A β dans le parenchyme, mais ces changements ne sont retrouvés qu'à proximité des plaques amyloïdes. Par exemple, après validation de ces changements par immunomarquage, une augmentation d'expression de la protéine Clec7 (identifiée aussi dans les DAM) a été observée dans les microglies présentes autour des dépôts d'A β . Ces changements protéomiques ont lieu bien plus rapidement dans le modèle APPPS1 que dans le modèle APP^{NF-G-L}, ce qui pourrait être dû aux dépôts d'A β fibrillaire plus précoces dans le premier modèle. Ainsi, les auteur.ice.s concluent que les plus grands changements phénotypiques microgliaux sont induits par les fibrilles d'A β . L'interaction des microglies avec l'A β est donc un élément clef dans leur réponse au cours de la MA.

2. Accumulation d'A β et réponse microgliale

a. Voies d'élimination de l'A β

Il existe 4 processus de clairance majeurs de l'A β dans le SNC (Tarasoff-Conway et al., 2015). Le principal est le passage à travers la BHE, où le transport est médié majoritairement par LRP1/LRP2 et ABCB1 pour l'efflux vers le sang, alors que RAGE permet la recapture de l'A β sanguin et son influx dans le parenchyme. L'A β transporté en périphérie est dégradé par des facteurs sanguins (enzymes, monocytes) ou bien transporté pour permettre une dégradation hépatique ou rénale. La circulation du LCR est aussi une voie de clairance importante, où les mêmes transporteurs (LRP1/2, ABCB1 et RAGE) sont responsables des échanges avec la circulation sanguine (à travers la barrière hémato-céphalo-rachidienne) ou avec la circulation lymphatique (au niveau périvasculaire, péri-neural ou dans les méninges). Le transport de l'A β jusqu'aux zones d'échange avec le sang ou le LCR est réalisé par le mouvement du fluide interstitiel, c'est-à-dire les flux périvasculaires et glymphatiques (Tarasoff-Conway et al., 2015; Plog and Nedergaard, 2018). L'efficacité de ces flux à transporter l'A β dépend en partie des protéines APOE et AQP4 (aquaporine 4) (Tarasoff-Conway et al., 2015). APOE est impliquée dans le transport de l'A β , et l'isoforme APOE- ϵ 4 diminuerait l'efflux via LRP1 (Deane et al., 2008; Verghese et al., 2013). En plus d'APOE- ϵ 4, d'autres facteurs affectent l'élimination de l'A β par ces trois mécanismes au cours du vieillissement et de la MA, comme l'augmentation de la résistance du flux céphalo-rachidien, la diminution du flux glymphatique lié à l'âge et à l'A β , ou encore les changements d'expression des transporteurs d'efflux et d'influx LRP1, ABCB1 et RAGE (Tarasoff-Conway et al., 2015). Le dernier processus de clairance de l'A β est sa dégradation, à la fois extracellulaire par le biais des protéases ; et intracellulaire, effectué majoritairement par les neurones, astrocytes et microglies. Il est aussi possible que les cellules musculaires lisses (présentes à la BHE) ou les cellules endothéliales dégradent l'A β . Sa dégradation intracellulaire implique les voies ubiquitine-protéasome, endosome-lysosome, autophagie-lysosome et des protéases intracellulaires.

Une part importante de cette dégradation de l'A β extracellulaire est effectuée par les cellules gliales qui synthétisent et libèrent des protéases ou l'internalisent par endocytose (Ries and Sastre, 2016). Les cellules gliales libèrent différents types de protéases : des métallo-endopeptidases (Neprilysine, *Insulin-degrading enzyme*, *Endothelin-converting enzyme*), l'*Angiotensin-converting enzyme*, des métalloprotéases (MMP2, MMP9) et des peptidases lysosomales (cathepsine B). L'internalisation de l'A β par les cellules gliales se fait par pinocytose, notamment pour les espèces solubles d'A β , ou par phagocytose médiée par

des récepteurs. L'A β internalisé peut être ensuite dégradé par le protéasome, par l'acidification lysosomale ou par des protéases intracellulaires.

Les cellules gliales, et en particulier la microglie, jouent ainsi un rôle important dans l'élimination de l'A β . Les mécanismes de détection et de réponse aux signaux tels que l'A β , sont donc très importants dans la progression de la MA.

b. Signaux de danger et récepteurs microgliaux

Dans la MA, les microglies doivent répondre à de très nombreux signaux de dangers (DAMP) : des protéines toxiques (A β et TAU), des débris neuronaux, ou des signaux moléculaires d'inflammation comme les cytokines et les chimiokines. La diversité des récepteurs microgliaux constituant le sensome permet de détecter et de réagir à l'ensemble de ces signaux.

Nous avons déjà évoqué l'accumulation des protéines A β et TAU, et la mort neuronale conduisant à des débris cellulaires, en lien avec la progression de la pathologie (voir paragraphe III.1.c). L'équipement en récepteurs détectant le peptide A β sous forme oligomérique ou fibrillaire est important sur la membrane microgliale, et ces divers récepteurs peuvent induire plusieurs réponses microgliales que nous développerons dans une prochaine partie (Yu and Ye, 2015).

La propagation de Tau dans les différentes régions cérébrales se fait par transmission de neurone à neurone, selon un mode « *Prion-like* », mais les microglies sont aussi en contact avec les agrégats Tau relargués après la mort des neurones (Clavaguera et al., 2017). La reconnaissance des protéines Tau est possible par sa liaison directe à certains récepteurs comme CX3CR1 (Bolós et al., 2017), LRP1 et TREM2 (Jin et al., 2021); ou par la fixation des fragments Fc des anticorps anti-Tau sur les agrégats, entraînant leur phagocytose (Luo et al., 2015). L'internalisation de Tau par la microglie induit ensuite une activation de la voie NF κ B et donc une réponse inflammatoire (Jin et al., 2021).

Lorsque les neurones dégénèrent et que les processus d'apoptose sont initiés, ils présentent à leur surface la phosphatidylsérine qui est reconnue par des récepteurs microgliaux comme BAI1, TIM4 ou TREM2. Ces récepteurs vont alors activer la phagocytose du neurone apoptotique (Takahashi et al., 2005; Mazaheri et al., 2014). Les neurones en souffrance produisent aussi de nombreux facteurs chimio-attractants comme l'ATP/ADP, la bradykinine ou la galanine (Noda et al., 2011), puis l'UTP/UDP reconnu par exemple par des récepteurs purinergiques exprimés par la microglie comme P2Y6 (Koizumi et al., 2007).

c. Réponse microgliale

Plusieurs études *in vivo* sur des modèles murins de la MA ont montré que les microglies migrent à proximité des plaques, prolifèrent et forment une barrière en périphérie (Bolmont et al., 2008; Condello et al., 2015). La première étude par Bolmont et al. a en effet montré que la moitié des microglies présentes à moins de 50 μm des plaques migrent vers elles, tandis que les 50% restants envoient des prolongements au contact des plaques (Bolmont et al., 2008). L'étude a aussi rapporté d'importants changements morphologiques, avec de longs prolongements polarisés en direction des plaques pour les microglies se trouvant à distance, mais très peu de prolongements pour les microglies présentes sur les plaques. Ces observations ont été confirmées par immunomarquage de coupes de cerveaux de patients atteints de MA et de souris modèles de la maladie, qui visait à caractériser l'organisation des cellules gliales autour des plaques amyloïdes, d'en mesurer les interactions et les changements morphologiques (Bouvier et al., 2016). L'organisation 3D autour des plaques amyloïdes denses se caractérise par la présence d'une couronne microgliale en contact avec la plaque, où les microglies présentent peu de ramifications et un cytoplasme gonflé ; plus à distance, des astrocytes hypertrophiques les entourent et envoient des prolongements en direction des microglies (Figure 24). L'organisation des microglies et des astrocytes est cependant différente autour des dépôts amyloïdes fibrillaires, suggérant que l'organisation et la composition des plaques amyloïdes influence la réponse gliale. Le lien entre formes d'A β et présence des microglies a été particulièrement étudié par imagerie biphotonique chez des souris 5xFAD, en utilisant la propriété de l'A β 42 fluorescent injecté de se fixer sur les plaques fibrillaires (Condello et al., 2015). Le groupe a ainsi identifié des dépôts fluorescents nouvellement formés correspondant à des agrégats proto-fibrillaires d'A β , presque exclusivement autour des plaques dépourvues de couronne microgliale. Ces dépôts sont aussi associés à la présence de neurites dystrophiques, qui révèlent leur neurotoxicité. En revanche, en présence de microglies, les plaques sont plus denses et le nombre de neurites dystrophiques est significativement diminué. Enfin, ces études *in vivo* ont montré que les microglies retrouvées au niveau des plaques sont phagocytaires (Bolmont et al., 2008; Condello et al., 2015).

Ainsi, le recrutement des microglies autour des plaques est un processus extrêmement dynamique, et ces cellules qui forment une barrière sont capables de phagocyter et de restructurer les plaques.

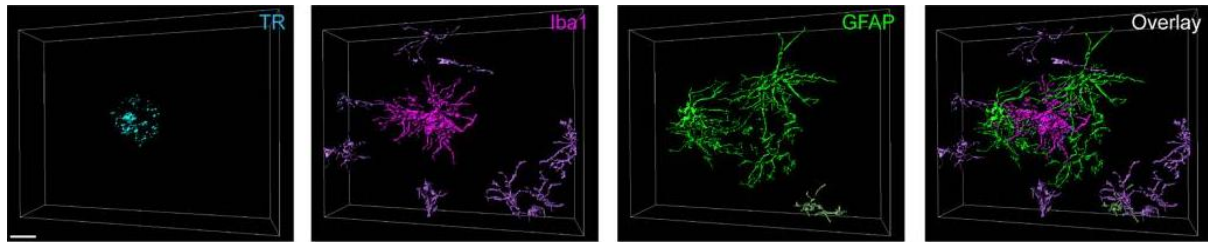


Figure 24 - Organisation spatiale des cellules gliales autour d'une plaque amyloïde dense. Marquage et acquisition en imagerie 3D des plaques amyloïdes (Thiazine Red TR), des microglies (Iba1) et des astrocytes (GFAP). *Bouvier et al. 2016.*

Un autre versant de la réaction microgliale dans la MA est la sécrétion de nombreuses molécules inflammatoires : cytokines, chimiokines et protéines du complément. Plusieurs travaux suggèrent que la réaction inflammatoire microgliale est initiée par l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Heneka et al., 2013; Van Zeller et al., 2021). Le complexe protéique NLRP3 est responsable de l'activation de la caspase-1, protéase elle-même responsable du clivage et de l'activation des cytokines pro-IL1 β et pro-IL18 en IL1 β et IL18 (Van Zeller et al., 2021). Dans la MA, l'élément déclencheur de la voie NLRP3 microgliale est l'A β , et des mécanismes semblables se produiraient dans les astrocytes. Les travaux de Heneka et al. ont montré une augmentation des niveaux de caspase-1 active dans les cortex et hippocampe de patient.e.s atteints de la MA ainsi que de souris APP/PS1 (Heneka et al., 2013). De plus, le développement de modèles transgéniques APP/PS1-NLRP3^{-/-} et APP/PS1-Casp-1^{-/-} a permis de mettre en évidence que l'inhibition de la voie NLRP3 diminuait la production de molécules pro-inflammatoires (IL1 β , NOS2), augmentait la proportion de microglie phagocytaires, et limitait l'accumulation d'A β et les altérations synaptiques (LTP, mémoire) (Heneka et al., 2013). Ainsi, l'activation de l'inflammasome NLRP3 serait responsable d'une réaction microgliale inefficace, avec la sécrétion de cytokines à l'origine d'une perte de fonction phagocytaire et d'une absence de dégradation de l'A β (Van Zeller et al., 2021).

La présence d'A β est aussi capable d'entraîner la synthèse du facteur du complément C1q par les microglies, comme cela a été montré *in vivo* chez des souris J20 modélisant la MA (Hong et al., 2016). Quant à l'augmentation des sécrétions de cytokines et de chimiokines, elle a été rapportée dans plusieurs modèles animaux de la maladie, avec des variations du taux des molécules inflammatoires (Martin and Delarasse, 2018; Leng and Edison, 2021a). Cependant l'augmentation des niveaux cytokiniques chez des personnes atteintes de la MA est très discutée (Brosseron et al., 2014). Les niveaux de chimiokines et cytokines sont extrêmement variables entre les études et nécessitent la réalisation de méta-analyses. Par exemple, certaines études dosant les cytokines dans des échantillons sanguins ont observé une augmentation d'IL1 β , IL2, IL6, IL18, TNF α et IFN γ chez des patient.e.s Alzheimer (Lai et al., 2017). Cependant, la quantité de cytokines dans le sang résulte à la fois de leur production dans le SNC, mais aussi de celle issue de la périphérie. C'est pourquoi d'autres études se

sont focalisées sur la mesure des cytokines dans le LCR, reflétant mieux l'inflammation dans le parenchyme. Une méta-analyse a ainsi observé une hétérogénéité entre les niveaux cytokiniques du LCR en fonction des études, et n'a relevé que trois facteurs significativement plus élevés dans la MA : TGF β , YKL-40 et MCP1 (Chen et al., 2018).

Les difficultés à détecter des variations claires des niveaux cytokiniques chez les patients et d'en tirer des biomarqueurs intéressants, pourraient être dues à des contraintes méthodologiques (test utilisé) et aux variations inter-individuelles (sexe, âge, stade cognitif, facteurs génétiques) (Brosseron et al., 2014). L'étude des facteurs inflammatoires permet néanmoins d'identifier des mécanismes potentiels impliqués dans la pathogénicité de la MA.

La réponse microgliale, notamment à l'A β , se met en place rapidement et vise à contenir et éliminer les dépôts toxiques. Les sécrétions inflammatoires servent à alerter les autres cellules environnantes de la présence d'un danger. Cependant, avec la progression et la chronicité de la pathologie, ces mécanismes sont dérégulés (Sarlus and Heneka, 2017).

d. Dérégulation de la réponse

i. Communication cellulaire

Plusieurs aspects de la réponse microgliale sont altérés, notamment sa communication avec d'autres cellules du CNS. L'équipe de Ben Barres a montré que les synthèses protéiques (IL1 α , TNF α , C1q) des microglies étaient capables de changer le phénotype réactif des astrocytes et d'entraîner leur production de molécules du complément (C3) (Liddelow et al., 2017). Réciproquement, il a été mis en évidence que le C3 produit par les astrocytes était responsable d'une diminution de la phagocytose microgliale d'A β (Lian et al., 2016). Un blocage pharmacologique du récepteur au C3 (C3aR) microglial *in vivo*, diminue la charge amyloïde d'un modèle murin de la MA. Ainsi, en réponse aux DAMP détectés par les microglies, la sécrétion de molécules inflammatoires va moduler la réponse des astrocytes, qui vont en retour altérer la fonction microgliale.

De plus, la communication avec les neurones est dysfonctionnelle (Simon et al., 2019). Par exemple, l'altération de la signalisation entre la chimiokine neuronale Cx3cl1 et le récepteur microglial Cx3cr1 augmente la réactivité microgliale (synthèse IL1 β), la pathologie Tau, mais présente des effets variables sur la pathologie amyloïde selon les modèles murins de la maladie (diminution/augmentation/pas d'effet sur la charge A β) (Martin and Delarasse, 2018). De manière intéressante, l'expression de Cx3cr1 est diminuée dans les DAM, suggérant une perte de la communication directe neurone-microglie en contexte pathologique

(Keren-Shaul et al., 2017). De manière plus indirecte, les sécrétions cytokiniques des microglies vont altérer l'intégrité et la fonction neuronale, de par leur neurotoxicité mais aussi en réduisant la sécrétion d'enzymes dégradant l'A β , et augmentant la pathologie Tau (Simon et al., 2019).

La réactivité microgliale dans le contexte de la MA conduit à de nombreux effets délétères avec une perte de réponse adaptée. Par exemple, la présence d'oligomères d'A β va augmenter la fixation des protéines du complément C1q aux synapses, qui seront alors reconnues par le récepteur CR3 microglial, entraînant ainsi une phagocytose anormale des synapses (Hong et al., 2016). De cette manière, l'absence de signaux inhibiteurs de phagocytose et l'augmentation de signaux « *eat-me* » (C1q/CR3) participe à la perte synaptique observée dans la MA.

Plusieurs travaux ont rapporté une diminution de la densité neuronale dans des modèles de souris exprimant constitutivement Tau (P301S) ou des souris WT injectées avec de l'A β (Brelstaff et al., 2018; Puigdellívol et al., 2021). L'étude des souris P301S a mis en évidence que les neurones ayant des filaments Tau, expriment à leur surface des molécules de phosphatidylsérine (PhosSer), qui déclenchent une réaction microgliale avec la synthèse de dérivés réactifs de l'oxygène (ou ROS), mais aussi la phagocytose du neurone (Brelstaff et al., 2018). Parallèlement, un traitement avec des agrégats Tau extracellulaires induit aussi l'exposition à la membrane neuronale de PhosSer (Pampuscenko et al., 2020). Dans ces deux études, l'exposition de PhosSer à la membrane des neurones se traduit par leur phagocytose et donc la disparition des cellules. L'équipe dirigée par Guy Brown s'est focalisée sur la caractérisation de ces mécanismes de phagocytose dans les contextes de vieillissement et de maladies neurodégénératives. Leurs travaux ont mis en évidence notamment deux voies : TREM2 et P2Y6. Sur divers modèles de microglies (BV2, CHME3, iPSC) en coculture avec des neurones, le groupe a montré que l'expression du variant R47H de TREM2 est à l'origine d'une activation aberrante du récepteur après stimulation avec le ligand PhosSer neuronal. Ceci se traduit par une phagocytose augmentée et une perte neuronale (Popescu et al., 2023), qui est amplifiée lorsqu'un traitement à l'A β est appliqué aux cocultures. Ainsi, une réaction microgliale inadaptée peut être initiée par des variants de gènes microgliaux considérés comme facteurs de risque génétiques, dans un contexte de MA. Le groupe a aussi montré que la voie des purines, et en particulier le récepteur P2Y6, est un modulateur important de la phagocytose neuronale (Puigdellívol et al., 2021). En effet, l'injection intra-ventriculaire d'A β chez des souris WT provoque une augmentation de la phagocytose neuronale 3 jours post-injection, et une diminution de la densité neuronale corticale 2 semaines post-injection. Les mêmes observations ont été faites chez des souris P301S. Or, pour des souris *P2rY6^{-/-}* (avec injection d'A β) ou *P301S-P2rY6^{-/-}*, ces effets ne sont pas observés, soulignant ainsi

l'importance du récepteur purinergique dans la perte neuronale. Enfin, l'étude a démontré *in vitro* que cette phagocytose de neurones stressés, mais viables, était médiée par l'UDP reconnu par les récepteurs purinergiques P2y6.

Si l'on considère l'ensemble de ces études, on peut conclure que les signaux pathologiques (A β , Tau) vont altérer à la fois le fonctionnement des cellules neuronales et astrocytaires, mais aussi la réponse microgliale qui sera donc exacerbée et devient ainsi délétère.

ii. Perte de fonction microgliale

L'accumulation d'A β dans la SMA est considéré depuis quelques décennies comme résultant en partie d'un défaut de fonction microgliale (Paresce et al., 1997). *In vitro*, les oligomères d'A β et la protéine du complément C3 diminuent les capacités phagocytaires des microglies (Pan et al., 2011; Lian et al., 2016). Plus précisément, un traitement avec des formes oligomériques d'A β (A β _o) de cellules microgliales primaires et BV2 diminue la phagocytose de billes inertes, mais aussi celle des formes d'A β fibrillaire (A β _f) (Pan et al., 2011). Ainsi, les oligomères présents au début de la pathologie, mais aussi les sécrétions inflammatoires, pourraient être à l'origine d'une diminution des capacités de phagocytose des microglies. Pour confirmer ces résultats, une étude a utilisé un modèle *ex vivo* de coupes organotypiques cortico-hippocampiques de souris WT, repeuplées avec des microglies isolées de souris WT ou 5xFAD juvéniles (5 semaines) ou adultes (25 semaines) (Hellwig et al., 2015). L'étude a montré que les microglies juvéniles (WT ou 5xFAD) sont capables d'éliminer l'A β exogène déposé sur les coupes, mais pas les microglies adultes 5xFAD. Cette perte fonctionnelle a aussi été observée dans un modèle de tauopathie. En effet, l'utilisation de cocultures de microglies (WT) et de neurones (P301S) a révélé que le nombre de neurones Tau + diminue en présence des microglies, alors que la quantité de protéine Tau augmente dans le milieu (Brelstaff et al., 2021). Les auteurs ont ensuite isolé ces microglies, et les ont remis en culture avec de nouveaux neurones P301S. Les microglies n'étaient alors plus en capacité de phagocyter des neurones Tau +, et présentaient des signes de sénescence. Ainsi, les microglies ayant internalisé des neurones contiennent des agrégats Tau ne sont plus en capacité de phagocyter de nouveaux éléments, qu'il s'agisse de billes fluorescentes ou de neurones en souffrance. Avec la progression de la pathologie, les microglies deviennent donc hypo-fonctionnelles, et n'éliminent plus les protéines toxiques et les débris cellulaires.

Plusieurs études montrent que la sénescence gliale est importante dans la MA, et on la considère désormais comme un élément clef dans les mécanismes pathophysiologiques

dans les sMA et LOAD (Lau et al., 2023). Dans l'étude de Brelstaff et al., la sénescence microgliale observée dans des cocultures microglie-neurones P301S est associée à une signature moléculaire unique et à une expression augmentée de l'activité β -galactosidase, un marqueur de la sénescence cellulaire. Cette signature de la sénescence est confirmée *in vivo* dans le modèle murin P301S, avec un important marquage cortical de la β -Galactosidase (Brelstaff et al., 2021). L'augmentation de la proportion de cellules sénescents a été aussi rapportée sur des coupes de cerveau de patients présentant des tauopathies ou la MA (Brelstaff et al., 2021; Hu et al., 2021). Cette entrée en sénescence des microglies pourrait être due à une prolifération aberrante chez les souris APP/PS1 et cibler en particulier les cellules ayant un profil d'expression de DAM (Hu et al., 2021). L'inhibition de la division microgliale avec un inhibiteur pharmacologique de CSF1R entraîne une diminution de l'expansion microgliale chez les APP/PS1, une diminution des marqueurs DAM, et une amélioration de la pathologie amyloïde (charge A β , perte synaptique).

iii. Propagation de la pathologie

Le rôle dual de la microglie dans la pathologie Alzheimer réside dans le fait qu'elle est impliquée dans l'élimination des protéines toxiques et des débris cellulaires, mais aussi dans l'accumulation des lésions pathologiques et la progression de la MA. Cette contradiction apparente a été soulignée par la caractérisation d'un effet de « *seeding* » microglial, à la fois de l'A β et de Tau (Asai et al., 2015; Baik et al., 2016).

Le développement d'un modèle aigu de tauopathie, par injection dans le cortex entorhinal d'adénovirus codant pour la forme pathogénique P301L-Tau (AAV-P301L), a mis en évidence la présence d'agrégats de Tau hyper-phosphorylés dans le gyrus denté, uniquement en présence de microglie (Asai et al., 2015). En effet, la déplétion de la microglie par traitement au clodronate ou au PLX3397, bloque la propagation de Tau et la formation des agrégats dans le gyrus denté. Ce rôle de la microglie dans la propagation de Tau a été confirmé dans un autre modèle murin de tauopathie, le modèle PS19, avec une réduction de l'expression des formes de Tau hyper-phosphorylée. Ces travaux ont aussi révélé les mécanismes mis en jeu par la microglie dans cette propagation de Tau avec la sécrétion d'exosomes contenant la protéine Tau agrégée. Enfin, des modèles *in vitro* (microglies primaires) et *in vivo* (souris PS19 et P301S) ont permis de mettre en évidence l'importance de la voie NF κ B dans la réponse microgliale à Tau (Wang et al., 2022). L'activation de cette voie augmente l'internalisation de Tau, mais aussi son seeding.

Des mécanismes semblables ont été observés dans la propagation de la pathologie A β tout d'abord chez des souris 5xFAD-Cx3cr1^{GFP} (Baik et al., 2016). Grâce à l'utilisation du Méthoxy-X04, un marqueur fluorescent de l'A β fibrillaire injecté *in vivo* chez les souris, les

auteur.ice.s ont pu étudier la dynamique de formation des plaques amyloïde par imagerie biphotonique. De nouvelles plaques apparaissent en périphérie des plaques déjà formées, avec notamment la présence d'un signal Méthoxy-X04 dans les microglies. L'Aβ fibrillaire est retrouvé dans le compartiment lysosomal des microglies, à la fois *in vitro* et *in vivo* et entraîne la mort de ces cellules. Les cellules mortes et/ou en souffrance déposent alors l'Aβ fibrillaire non dégradé à proximité des plaques préexistantes. Ainsi, la microglie capture les protéines Tau et Aβ extracellulaires, mais l'état réactif que ces protéines toxiques induisent va empêcher une élimination correcte des agrégats, qui sont ensuite relâchés dans le parenchyme.

Plusieurs groupes proposent que la microglie fait un lien entre les pathologies amyloïde et Tau. Tout d'abord, par un effet indirect de modulation de l'activité de kinases responsables de la phosphorylation de Tau, comme discuté précédemment au paragraphe III.3.e (Kitazawa et al., 2011). Deux études récentes ont plus particulièrement étudié le rôle direct de la microglie dans la progression de ces deux pathologies. La première s'appuie sur l'utilisation de souris APP^{NL-F-G}, modèle de la MA, injectées avec un AAV codant pour la forme mutée de Tau P301L, et déplétées ou non en microglies avec l'inhibiteur du CSF1R, PLX5622 (Clayton et al., 2021). L'absence de microglie entraîne une augmentation de la pathologie Aβ, mais une diminution de la propagation de Tau. En réponse à l'accumulation d'Aβ, les microglies facilitent la propagation de Tau par la sécrétion de vésicules contenant sa forme hyper-phosphorylée. Cependant, ces effets n'ont pas été reproduits dans l'étude de Gratuze et al. sur les souris 5xFAD injectées avec des protéines Tau isolées à partir d'extraits *post mortem* dérivés de patient.e.s MA (Gratuze et al., 2021). Dans cette seconde étude, la déplétion en microglie par le PLX3397 (inhibiteur CSF1R) une fois les plaques amyloïdes formées, ne modifie pas la charge amyloïde mais augmente la quantité de Tau hyper-phosphorylé. Dans des conditions de repeuplement microglial, à l'arrêt du traitement PLX3397, ou en présence de microglies déficientes en TREM2 (*TREM2*^{-/-}), les auteur.ice.s observent une augmentation des dépôts d'Aβ fibrillaire et du seeding de Tau. Les cellules microgliales déficientes en TREM2 sont donc dysfonctionnelles, car leur réponse ne permet pas de retarder la propagation de Tau induite par l'accumulation d'Aβ.

Ainsi, ces effets apparemment contradictoires pourraient s'expliquer par la dérégulation progressive de l'activité des microglies au cours de la pathologie. La réponse microgliale devient rapidement inadaptée et participe à la progression de la pathologie Tau induite par l'Aβ. Il est donc important d'identifier quelles voies sont bénéfiques afin de cibler l'activité microgliale au début du développement de la MA.

3. Récepteurs à l'Aβ et phagocytose microgliale

a. Différents récepteurs pour différentes espèces d'Aβ

Les microglies possèdent de très nombreux récepteurs capables de lier l'Aβ (Sierra et al., 2013; Yu and Ye, 2015). Parmi les principales familles de protéines liant l'Aβ, on peut retrouver les récepteurs scavenger (SCARA-1, CD36), des récepteurs couplés aux protéines G (*chemokine-like receptor 1*), des *Toll-like receptor* (TLR2 et TLR4, couplés à CD14), ou encore des récepteurs de la superfamille des immunoglobulines (SIRPβ1, TREM2). La détection de l'Aβ par ces récepteurs va induire dans la grande majorité des cas son internalisation, parfois associée à une réponse inflammatoire (Yu and Ye, 2015).

Il est maintenant largement admis que les microglies répondent différemment aux espèces d'Aβ monomériques, oligomériques ou fibrillaires. En effet, le traitement de cultures primaires microgliales avec des oligomères ou des fibrilles d'Aβ synthétique a mis en évidence une forte réponse microgliale aux oligomères (phosphorylations des protéines SYK, LYN et p38 MAPK; augmentation de CD68, COX2 et IL-6), en comparaison de l'Aβ fibrillaire (phosphorylation ERK) (Sondag et al., 2009). Une autre étude a comparé la réponse microgliale à des oligomères de haut poids moléculaire isolés par chromatographie et provenant de patient.e.s MA, à celle des monomères, dissociés des oligomères précédemment isolés (Yang et al., 2017). Ces deux espèces d'Aβ ont été ensuite injectées dans le ventricule latéral de souris WT. De manière surprenante, les monomères induisent une augmentation de la circularité des cellules microgliales, une diminution de leurs ramifications et du nombre de microglies réactives (CD68+). A l'inverse, les microglies ne sont que peu affectées par les oligomères. Ainsi, les microglies vont élaborer des réponses différentes selon le type d'Aβ (monomères, oligomères, fibrilles) et le récepteur impliqué.

b. TREM2

TREM2 est une protéine transmembranaire avec une domaine extracellulaire de type immunoglobuline (*Ig-like*) (Deczkowska et al., 2020; Hou et al., 2022). Ce récepteur est capable de lier des phospholipides, glycolipides, lipoprotéines (APOE, APOJ) et de l'Aβ. La signalisation fait intervenir des adaptateurs transmembranaires DAP10 et DAP12 avec lesquels TREM2 forme un complexe, à l'origine de l'activation des voies SYK, PI3K et MAPK (Figure 25). Un mécanisme de régulation du récepteur implique son clivage, à la position Histidine 157, par les protéases ADAM10 et ADAM17, libérant un fragment soluble (sTREM2) (Feuerbach et al., 2017; Schlepckow et al., 2017).

i. Facteur de risque

En 2013, deux études ont mis en évidence des variants rares du gène *TREM2* comme facteurs de risque de développer la MA (Guerreiro et al., 2013b; Jonsson et al., 2013). D'autres études ont par la suite identifié de nouveaux variants, dont R47H (rs75932628), R62H (rs143332484) et D87N (rs142232675) qui affectent le domaine immunoglobuline, tandis que le variant H157Y (rs2234255) se situe au niveau de la zone de clivage par les ADAM10 et ADAM17 (Guerreiro et al., 2013b; Jonsson et al., 2013; Jin et al., 2014; Jiang et al., 2016). Les mutations affectant la partie immunoglobuline diminueraient la capacité de fixation des ligands, tandis que le variant H157Y augmenterait le clivage de la protéine (Hou et al., 2022).

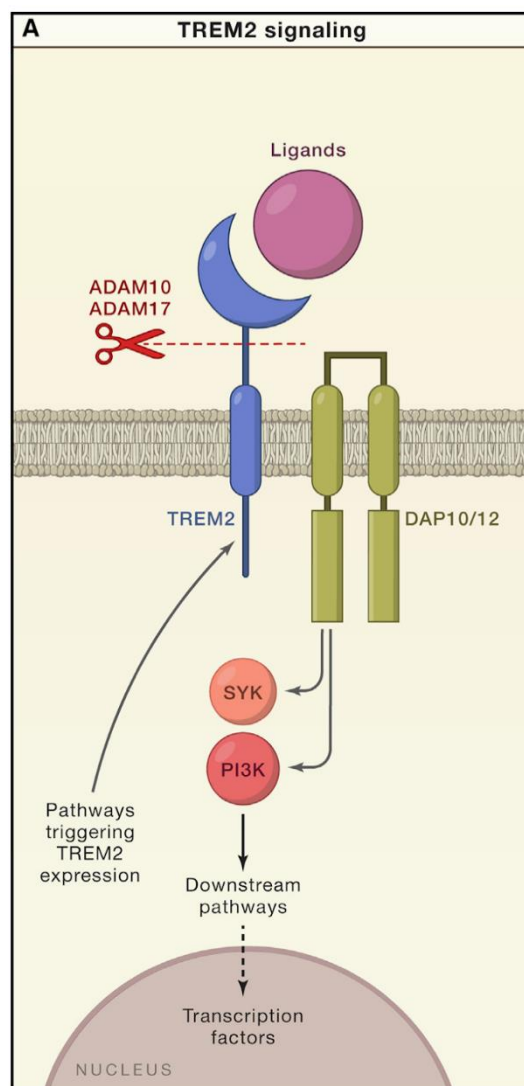


Figure 25 - Voie de TREM2.

TREM2 membranaire induit une voie de signalisation SYK via son co-récepteur DAP10 ou DAP12, après fixation d'un ligand à la partie extracellulaire. Le récepteur peut être clivé par les ADAM10 et ADAM17, générant un fragment soluble (sTREM2). *Source : Deczkowska et al. 2020*

En plus de son rôle direct chez les porteuses et porteurs de ces variants, TREM2 est associé à d'autres facteurs de risque, comme *APOE-ε4*, qui reste le principal facteur de risque dans les sMA (Karch and Goate, 2015). TREM2 étant un récepteur microglial de l'APOE, plusieurs groupes ont cherché des liens potentiels entre ces deux protéines. Une étude *post mortem* de patient.e.s MA ayant l'haplotype *APOE-ε4* et/ou *TREM2* R47H a montré une diminution importante du nombre de microglies associées aux plaques amyloïdes par rapport aux patient.e.s *APOE-ε2*, *APOE-ε3* ou au variant commun *TREM2* (Nguyen et al., 2020). La diminution du recrutement des microglies aux plaques est semblable entre les porteur.euse.s des variants *APOE-ε4* et *TREM2* R47H, suggérant des mécanismes potentiellement communs pour ces deux facteurs de risque. Parallèlement, l'utilisation de cellules humaines pluripotentes induites (hIPSC) a montré que les microglies humaines WT ont un tropisme phagocytaire plus grand pour les protéines exogènes *APOE-ε4*, qui diminue pour *APOE-ε3* et davantage pour *APOE-ε2* ; en revanche, la capacité de phagocytose des protéines *APOE* est perdue pour les cellules hIPSC-*TREM2*^{-/-} (McQuade et al., 2020). Ces deux études montrent donc une interaction fonctionnelle entre les voies TREM2 et APOE.

L'identification des variants de TREM2 et leur implication dans la MA a concentré les efforts de nombreuses équipes sur la caractérisation de la fonction du récepteur, étant donné son implication dans l'initiation de la pathologie.

ii. Fonctions

Les différents ligands connus de TREM2 ont permis de déterminer que ce récepteur est impliqué dans l'élagage synaptique, la phagocytose (cellules apoptotiques, débris cellulaires, bactéries, lipoprotéines), le métabolisme du cholestérol et la survie cellulaire (Deczkowska et al., 2020). En contexte pathologique comme la MA, son implication dans la régulation de la réponse microgliale a notamment été révélée avec l'identification des DAM, dont le niveau d'expression de TREM2 est augmenté et essentiel à la transition vers le sous-type DAM2 (Keren-Shaul et al., 2017). Ces travaux ont ensuite conduit à explorer l'effet du récepteur sur les deux principaux marqueurs histopathologiques, Aβ et Tau.

-Tau

L'effet d'une déplétion totale ou partielle de TREM2 a été analysé dans des modèles murins de tauopathie. Une déplétion totale du récepteur chez les souris P301S ne modifie ni la pathologie Tau, ni la neurodégénérescence (Sayed et al., 2018; Gratuze et al., 2023). Cependant, une diminution partielle de TREM2 chez ces mêmes souris, par un processus d'interférence par ARN (shTREM2) ou par haploinsuffisance (*TREM2*^{+/-}), induit une augmentation de la phosphorylation de TAU et une aggravation de la neurodégénérescence

(Jiang et al., 2015; Sayed et al., 2018). Grâce au développement d'un nouveau modèle de tauopathie par surexpression de la protéine TAU humaine dans les cellules ganglionnaires de la rétine, la neurotoxicité a été confirmée pour les haplotypes *Trem2^{+/+}* et *Trem2^{+/-}*, mais s'est avérée limitée chez les mutants *Trem2^{-/-}* (Dywat et al., 2023). D'autre part, l'effet du variant R47H chez des souris exprimant la mutation TAU P301S (lignée murine PS19), a montré une diminution de la pathologie Tau, de la perte synaptique et de l'atrophie cérébrale, par rapport aux souris *TREM2* WT (Gratuze et al., 2020). La fonction du récepteur dans la propagation de TAU semble donc complexe, car l'altération de la signalisation *TREM2* microgliale pourrait réduire la neurodégénérescence induite par TAU dans certains modèles de tauopathie.

Cette complexité est d'autant plus importante à considérer dans des modèles présentant les pathologies amyloïdes et Tau. En effet, chez des souris 5xFAD injectées avec des protéines TAU isolées à partir du cerveau *post mortem* de patient.e.s MA, la déplétion totale de *TREM2* induit une augmentation de la pathologie Tau, du nombre de neurites dystrophiques et de la charge en A β (Gratuze et al., 2021). Cela a aussi été observé chez des souris P301L-PS2APP *Trem2^{-/-}* qui présentent des plaques amyloïdes plus diffuses, un taux élevé de protéine TAU hyper-phosphorylée et une mort neuronale importante. En revanche, ce n'est pas le cas des souris *Trem2^{+/+}* et *Trem2^{+/-}* (Lee et al., 2021). La fonction du récepteur *TREM2* dans la propagation de TAU est donc modulée par la présence d'A β .

-A β

La première approche pour caractériser l'effet de *TREM2* sur la pathologie amyloïde a été d'utiliser des modèles murins. Ainsi, chez des 5xFAD, l'haplotype de *TREM2* (+/+, +/-, -/-) a montré un effet graduel des niveaux d'expression de la protéine sur la charge amyloïde (Wang et al., 2015). Les niveaux d'A β et la dégénérescence neuronale sont significativement augmentés chez les souris *Trem2^{-/-}*, avec une diminution du recrutement des microglies au niveau des plaques. Une étude s'est ensuite intéressée à l'effet d'une surexpression de *TREM2* par transduction virale chez des souris APPPS1dE9, au cours de l'installation de la pathologie (âge moyen, 7 mois) ou chez des animaux âgés (18 mois) (Jiang et al., 2017). Aucun effet bénéfique n'a pu être observé sur les dépôts d'A β de souris âgées. La culture *in vitro* de microglies primaires isolées à partir de souris de 7 ou 18 mois a montré que la phagocytose d'A β est très faible pour les microglies âgées, mais plus importante pour les microglies d'âge moyen, en cas de surexpression de *TREM2*. Des résultats semblables ont été obtenus chez des souris 5xFAD, où l'expression de *TREM2* WT ou de *TREM2* R47H est induite avant l'apparition de la pathologie (0-2 mois), au cours de la pathologie amyloïde (2-5 mois), ou une fois la maladie présente (5-8 mois) (Zhao et al., 2022). La surexpression de *TREM2* WT diminue le dépôt d'A β avant l'apparition de la pathologie uniquement, tandis que celle de *TREM2* R47H augmente la quantité d'A β fibrillaire, de plaques et de neurites dystrophiques, spécifiquement lors de la phase exponentielle d'accumulation d'A β (2-5 mois).

L'ensemble de ces études suggère que TREM2 joue un rôle essentiel dans la réponse microgliale à l'A β , avec un effet d'autant plus accentué que la pathologie amyloïde se met en place. Ceci permet de mieux comprendre pourquoi les facteurs de risque génétiques, comme le variant R47H, sont responsables d'une amplification des processus pathogéniques.

Nous avons précédemment évoqué les différences d'affinité de liaison des récepteurs à l'A β aux espèces solubles (monomères, oligomères) et insolubles (fibrilles). Plusieurs études *in vitro* ont cherché à caractériser les capacités de liaison de TREM2, et ont toutes conclu à sa plus forte affinité pour les oligomères d'A β (Lessard et al., 2018; Zhao et al., 2018; Zhong et al., 2018; Vilalta et al., 2021). Sa capacité de lier les fibrilles d'A β est cependant moins évidente. Le groupe dirigé par Guy Brown a montré que la forme soluble sTREM2 ne liait pas les A β f, tandis que le groupe de Todd Golde a observé une fixation TREM2-A β f uniquement en absence de détergent (Lessard et al., 2018; Vilalta et al., 2021). Ces résultats définissent TREM2 comme un récepteur préférentiel des oligomères d'A β .

De manière intéressante, ces études ont rapporté que la liaison TREM2-A β o induit une activation du récepteur et son clivage, avec libération de la forme soluble sTREM2 (Lessard et al., 2018; Vilalta et al., 2021). Or, la mutation H157Y retrouvée comme facteur de risque chez les patient.e.s MA augmente *in vitro* le clivage de TREM2 (Thornton et al., 2017). Ce variant affecte les acides aminés reconnus notamment par ADAM10, et augmente l'activité de la protéase. Cet effet a soulevé la question de l'effet du clivage de TREM2 dans la pathologie, et le rôle spécifique de son produit sTREM2.

iii. sTREM2

Plusieurs groupes se sont focalisés sur le développement de stratégies pour stimuler la voie TREM2, considérant que les mutations à risque étaient des pertes de fonctions pouvant être compensées par une stabilisation et/ou activation du récepteur. Différents anticorps ciblant la protéine TREM2 murine ou humaine ont ainsi été générés, se focalisant sur la région de clivage des α -sécrétases ADAM10/17, avec limitation du clivage par encombrement stérique (Schlepckow et al., 2020; Wang et al., 2020; van Lengerich et al., 2023). L'action des anticorps 4D9 et AL002c, ciblant respectivement Trem2 de souris ou TREM2 humain, a notamment été caractérisée *in vivo* sur des souris APP^{NL-F-G} ou 5xFAD (Schlepckow et al., 2020; Wang et al., 2020). Le 4D9 diminue la charge amyloïde des souris, à la fois pour les formes d'A β solubles et insolubles, tandis que l'effet de l'AL002c est plus ciblé avec une diminution du nombre de plaques filamenteuses (marquées par l'anticorps anti-A β , clone 6E10+) entourées de neurites dystrophiques. On peut noter que l'impact de l'AL002c sur les dépôts d'A β est identique chez les souris 5xFAD exprimant le récepteur TREM2^{WT} ou TREM2^{R47H},

mais les microglies R47H associées aux plaques ont une morphologie moins ramifiée, avec une phagocytose réduite (Wang et al., 2020). Enfin, l'anticorps ATV:TREM2 associé à un domaine du récepteur de la Transferrine a été développé très récemment pour augmenter le passage de la BHE dans une future optique thérapeutique (van Lengerich et al., 2023). L'effet de cet anticorps a été caractérisé *in vitro*, avec la mise en évidence d'une stimulation de la voie TREM2 (phosphorylation SYK) sur des iPSC microgliales, mais aussi sur des microglies isolées de souris injectées avec l'ATV:TREM2, avec cette fois l'augmentation de la phagocytose des débris de myéline et de l'A β . De manière surprenante, les auteurs ont observé que l'anticorps induit une endocytose de TREM2 sur le modèle iPSC, sans augmentation de son expression membranaire comme cela avait été décrit pour l'anticorps 4D9. Enfin, l'étude *in vivo* de l'ATV:TREM2 a révélé que la biodisponibilité de l'anticorps dans le cerveau est importante et provoque une augmentation du métabolisme du glucose et de l'activité microgliale chez des souris 5xFAD-hTREM2. Ces trois études suggèrent donc que la diminution du clivage de TREM2 est bénéfique, et ces molécules d'intérêt sont actuellement en essai clinique de phase I pour ATV:TREM2 et de phase II pour l'AL002.

Cependant, plusieurs travaux récents ont rapporté des résultats opposés. Un groupe a généré une forme de Trem2 non clivable, en substituant les acides aminés His-Ser-Thr normalement présents en position 157-159 et reconnus par ADAM10/17, par la séquence Ile-Pro-Asp (IPD) chez des souris APP23-PS45, modèle de la MA (Dhandapani et al., 2022). Contrairement aux études visant à inhiber le clivage de TREM2 par administration d'anticorps, ici la production de sTrem2 par clivage du récepteur membranaire est constitutivement inhibée. Les souris *APP23-PS45-Trem2-IPD* de 3 mois présentent une augmentation du nombre de petites plaques et d'A β (40 et 42) insoluble, tandis que la quantité d'A β 40/42 soluble diminue. Cependant, à 7 mois, il n'y a plus de différence entre les souris *APP23-PS45-Trem2-WT* et *APP23-PS45-Trem2-IPD*. Les auteurs suggèrent qu'une accélération de l'altération du phénotype microglial se produit chez les souris avec substitution *Trem2-IPD*, car leurs microglies présentent à 3 mois des profils transcriptomiques semblables à celles de 7 mois chez les souris *Trem2-WT*. Ainsi, la stabilisation du récepteur TREM2 à la membrane aurait des effets délétères au stade précoce de la pathologie.

Le dosage de sTREM2 dans le LCR de patients apparaît désormais comme un biomarqueur intéressant de la MA (Morenas-Rodríguez et al., 2022). Plusieurs travaux ont mis en évidence que les niveaux de sTREM2 sont plus importants chez des personnes au stade MCI ou ayant développé la MA, par rapport aux personnes sans trouble cognitif (Heslegrave et al., 2016; Piccio et al., 2016; Suárez-Calvet et al., 2016). Toutes ces études ont observé que les niveaux de sTREM2 corrélaient avec la pathologie Tau (TAU total et TAU phosphorylé dans le LCR), mais pas avec la pathologie amyloïde. Ces groupes ont donc proposé sTREM2

comme un marqueur de la neuroinflammation, apparaissant avec la neurodégénérescence. Le suivi de patient.e.s MCI ou MA a ensuite mis en évidence que des niveaux élevés de sTREM2 dans le LCR étaient associés à un meilleur pronostic, c'est-à-dire à un déclin cognitif atténué (Ewers et al., 2019). Ces résultats ont été confortés récemment par une étude longitudinale sur 4 ans de personnes ne présentant pas d'atteintes cognitives, mais classées A+T-, A+T+ et A-T- en imagerie TEP Amyloïde ($[^{18}\text{F}]$ Flutemetamol) et Tau ($[^{18}\text{F}]$ RO948) (Pereira et al., 2022). L'étude distingue la progression au cours du temps de la pathologie A β et Tau en fonction du niveau basal de sTREM2 dans le LCR. De manière très intéressante, un taux initial élevé de sTREM2 est associé à une progression moindre de la pathologie Tau, ainsi qu'à un déclin cognitif moins rapide.

Ainsi, le clivage de TREM2 en sTREM2 dans les premiers stades de la MA serait un élément clef de la réponse microgliale, avec un effet potentiellement bénéfique sur la progression de la pathologie.

Ces données soulèvent la question de la fonction de sTREM2. La protéine soluble était initialement considérée comme un antagoniste de TREM2, qui agirait comme un leurre en entrant en compétition avec les ligands du récepteur membranaire. Cependant, deux groupes ont rapporté récemment que sTREM2 exerce un effet propre et diminue la formation des oligomères d'A β , en bloquant aussi le processus de fibrillation (Vilalta et al., 2021; Belsare et al., 2022). Cet effet est diminué ou même absent pour les formes mutées de sTREM2 R47H. De plus, Vilalta et al. ont montré qu'un traitement de cellules HEK surexprimant TREM2 par des oligomères d'A β conduit au clivage du récepteur membranaire (Vilalta et al., 2021). La libération de sTREM2 est donc induite après la liaison des A β _o au récepteur.

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de sTREM2, l'une des premières approches a été d'utiliser un modèle de microglies primaires (Zhong et al., 2017, 2019). Sur des cellules *Trem2-KO*, sTREM2 active la voie de signalisation Akt/Gsk3 β / β caténine, démontrant l'effet propre de sTREM2 sur les microglies (Zhong et al., 2017). Ces traitements au sTREM2 ont aussi montré une augmentation de la survie microgliale, des changements morphologiques de la microglie, ainsi qu'une augmentation de la phagocytose d'A β (Zhong et al., 2017, 2019). Puis, l'administration intra-hippocampique de sTREM2 chez des souris WT et *Trem2-KO*, a ensuite révélé une amplification des sécrétions inflammatoires (IL1 β , IL6, TNF α) couplé à des changements morphologiques de la microglie (augmentation surface du soma, raccourcissement des prolongements), et ce indépendamment de Trem2 (Zhong et al., 2017). Dans l'étude suivante, l'injection d'AAV-TREM2 dans l'hippocampe de souris 5xFAD nouveau-nés (P0) ou de souris adultes de 7 mois, induit une diminution de la charge amyloïde, un recrutement des microglies autour des plaques, et une augmentation de la LTP hippocampique associée à une amélioration de la mémoire spatiale (Zhong et al., 2019).

TREM2 et sa forme soluble sont donc des modulateurs majeurs de la microglie dans la MA. La stabilisation et l'activation du récepteur membranaire, ou bien l'action directe et indépendante de sTREM2, conduisent tous deux à une augmentation de la réponse microgliale. Les mécanismes potentiellement mis en jeu par sTREM2 ont été résumés et schématisés dans la revue de Filipello et al., où trois principales hypothèses concernant l'effet de sTREM2 sont abordées (Figure 26) (Filipello et al., 2022). Tout d'abord, le clivage de TREM2 permet de bloquer la signalisation du récepteur membranaire activé par un ligand, comme par exemple l'A β (Vilalta et al., 2021). La protéine sTREM2 libérée peut ensuite agir de manière autocrine et paracrine sur des récepteurs non encore identifiés, comme cela a été observé lors de traitements sTREM2 de microglies ou souris *Trem2-KO* (Zhong et al., 2017). Enfin, sTREM2 pourrait jouer un rôle de leurre, entrant en compétition avec le récepteur TREM2 membranaire, en séquestrant ses ligands (Filipello et al., 2022). Pour compléter cette dernière hypothèse, on peut supposer que sTREM2 en se liant à l'A β opsonise les agrégats solubles, et de cette manière facilite leur reconnaissance et leur internalisation par la microglie.

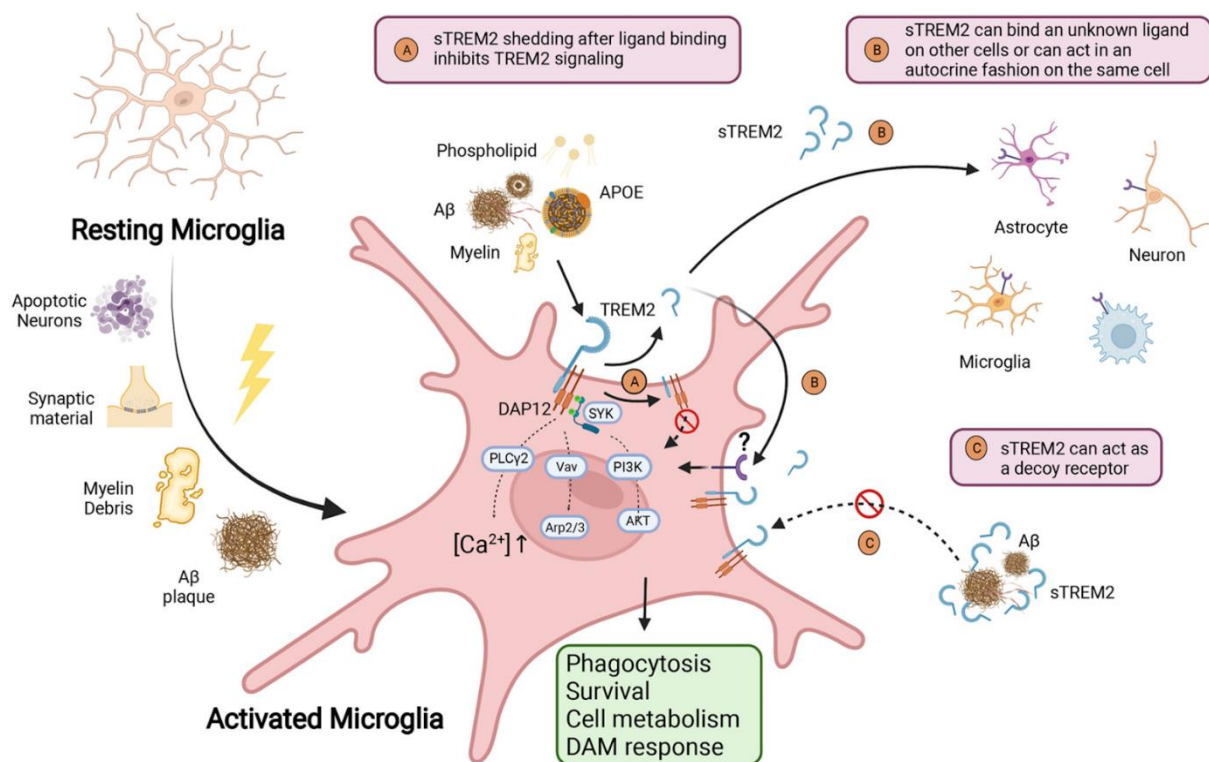


Figure 26 - Hypothèse des mécanismes d'action de TREM2 et sTREM2 dans la MA.

Il est proposé que (A) la fixation des ligands de TREM2 entraîne son activation et son clivage, pour réguler la signalisation intracellulaire. (B) sTREM2 libéré agit de manière paracrine ou autocrine sur un/des récepteur/s encore non identifié/s, et active des voies de signalisation intracellulaires semblables à celles de TREM2. (C) sTREM2 se lie aux ligands de TREM2 et bloque leur interaction avec le récepteur exprimé à la membrane. Source : Filipello et al. 2022

Les rôles de TREM2 et sTREM2 restent cependant très discutés et nécessitent encore de nombreuses investigations pour comprendre la diversité des effets observés jusqu'à présent.

4. VEGF et maladie d'Alzheimer

a. Corrélation avec le stade clinique

Étant donné les atteintes vasculaires retrouvées dans la MA, un premier groupe s'est intéressé au rôle du VEGF en contexte pathologique (Yang et al., 2004). Le marquage du cortex temporal de patient.e.s MA a révélé une concentration de l'expression du VEGF au niveau des plaques amyloïdes, où il pourrait être séquestré. Ce résultat a été ensuite confirmé dans le cortex prémoteur (Yang et al., 2004; Martin et al., 2021) et suggère une dérégulation de la voie du VEGF dans la MA.

Les variations d'expression du VEGF dans la MA sont débattues, car certains groupes rapportent une corrélation positive entre les taux de VEGF plasmatique et la pathologie (Winder et al., 2023), alors que d'autres observent l'inverse (Mateo et al., 2007). Les niveaux plasmatiques du VEGF sont en effet extrêmement variables selon les études considérées, car ils dépendent en partie des sécrétions périphériques de VEGF. D'autres groupes ont observé des variations au cours de la pathologie (MCI précoce versus tardif MA), mais il est aujourd'hui difficile de conclure sur les niveaux de VEGF dans la MA par cette méthode d'analyse (Malashenkova et al., 2017; Liang et al., 2021). Une autre approche consiste à mesurer les niveaux d'expression d'ARN provenant du cortex préfrontal de patient.e.s MA, mais aucune variation des transcrits du VEGF n'a été observée (Mahoney et al., 2021).

La meilleure technique aujourd'hui pour connaître les niveaux de VEGF chez des patient.e.s est le dosage de la protéine dans le LCR. Une diminution de la concentration en VEGF dans le LCR a été observée dans la MA, en lien avec la réduction des taux d'A β (Guo et al., 2013; Leung et al., 2015). Cette diminution est à mettre en relation avec l'augmentation des taux de VEGF dans le cerveau, en association avec les plaques amyloïdes du parenchyme (Thomas et al., 2015). Plusieurs groupes ont aussi comparé les niveaux de VEGF dans le LCR avec les atteintes cognitives des patient.e.s MCI ou MA (Hohman et al., 2015; Leung et al., 2015; Huang et al., 2020; Tubi et al., 2021). Dans chacune de ces études, une corrélation positive a été observée entre les taux de VEGF et les performances cognitives des sujets, notamment concernant la mémoire épisodique et les fonctions exécutives (Hohman et al., 2015). Il a aussi été trouvé que les niveaux de VEGF corrèlent avec une augmentation du

métabolisme cérébral (FDG-TEP) et une diminution de l'atrophie cérébrale (Hohman et al., 2015; Tubi et al., 2021).

Ainsi, ces études révèlent le rôle potentiellement bénéfique du VEGF dans la MA. Au cours de la maladie, la diminution de son niveau d'expression dans le LCR pourrait refléter (1) une baisse de la sécrétion du facteur de croissance ou (2) plus probablement son accumulation dans les plaques amyloïdes du parenchyme, en association avec l'A β .

b. VEGF et A β

L'interaction entre le VEGF et l'A β a été caractérisée *in vitro*, par ELISA et par une approche biochimique d'immunoprécipitation, mais aussi *in vivo* sur des coupes de cerveaux de patient.e.s MA (Yang et al., 2004; Martin et al., 2021). La liaison A β -VEGF est très affine et spécifique, et plusieurs domaines d'interaction entre ces deux protéines ont été identifiés, dont le principal correspond au domaine de liaison à l'héparine (HBD) (Yang et al., 2005; Martin et al., 2021). L'A β induit notamment une diminution de l'activation du récepteur VEGFR2 des cellules endothéliales, par diminution des phosphorylations Tyr996 et Tyr1175, mais aussi des neurones (Patel et al., 2010; Martin et al., 2021). Deux scénarii peuvent expliquer cette altération de la voie VEGF/VEGFR2 par l'A β . D'une part, l'A β est capable de se fixer directement au VEGFR2, empêchant la liaison de son ligand naturel, le VEGF (Patel et al., 2010). D'autre part, la liaison de l'A β au VEGF entre en compétition avec la fixation du VEGF à son récepteur (Martin et al., 2021). Ce sont essentiellement les oligomères d'A β qui sont capables d'inhiber la voie du VEGFR2, mais ce blocage peut être compensé par l'apport de VEGF exogène (Martin et al., 2021). L'A β peut aussi induire la production de VEGF astrocytaire, via la translocation du facteur de transcription HIF α au noyau, et la stimulation de la transcription du gène (Chiarini et al., 2010).

Le VEGF peut en retour influencer l'A β . En effet, des travaux sur le modèle de souris Tg2576, sur des cultures de neurones, des coupes organotypiques de cortex ou bien *in vivo*, ont permis de caractériser l'effet d'un traitement au VEGF sur la pathologie amyloïde (Bürger et al., 2009, 2010; Guo et al., 2019). Chez ces souris, une diminution du niveau de VEGF libre a été observée dans le cortex et l'hippocampe, avec parallèlement son accumulation au niveau des plaques amyloïdes (Guo et al., 2019). Le traitement au VEGF de neurones en culture ou de tranches organotypiques a mis en évidence une diminution des niveaux de la forme soluble sAPP β après 24h de traitement (Bürger et al., 2009, 2010). Cet effet s'explique par une diminution de l'activité de la β -sécrétase (BACE1) due au VEGF, conduisant à une plus faible

production du peptide A β . Ces observations ont été complétées par l'étude *in vivo* de Guo et al., où l'administration intranasale d'A β chez des souris Tg2576 de 8 à 12 mois se traduit par une augmentation de l'expression d'ADAM10 et une diminution d'expression de BACE1 (Guo et al., 2019). Chez ces souris, il est observé une baisse des niveaux d'A β soluble et fibrillaire, du nombre de plaques amyloïdes, mais aussi une amélioration de la cognition d'après le test de la piscine de Morris.

Pour étudier plus précisément l'effet fonctionnel du VEGF, notre équipe a montré que son application sur des tranches d'hippocampe de souris APP/PS1 est capable de rétablir la LTP et la LTD (Martin et al., 2021). Le VEGF améliore donc l'efficacité de la transmission synaptique dans ce modèle *ex vivo* de la MA. D'autres études ont cherché à caractériser l'effet *in vivo* du VEGF dans des modèles murins de la MA, à la fois les effets d'un traitement aiguë ou chronique. Ainsi, l'injection intrapéritonéale de VEGF chez des souris PDGF-hAPP entraîne une augmentation de l'angiogenèse, une diminution de la charge en A β et une amélioration des capacités mnésiques jusqu'à 24 jours post-traitement (Wang et al., 2011). Afin de déterminer l'action à long terme du VEGF, plusieurs techniques d'administration ont été développées, notamment des micro- ou nanoparticules (microcapsules d'Alginate-Poly-L-Lysine-Alginate APA, des nanosphères de Poly-lactic-co-glycolic acid PLGA), des surexpressions constitutives (neuronale par l'utilisation d'un vecteur viral NSE-VEGF) ou la transplantation de cellules surexprimant le VEGF (cellules souches mésenchymateuses) (Spuch et al., 2010; Herrán et al., 2013; Religa et al., 2013; Garcia et al., 2014). Ces travaux ont porté sur plusieurs modèles murins de la MA, dont le modèle APP/PS1 (Spuch et al., 2010; Herrán et al., 2013), CRND8-APP (Religa et al., 2013) et APP/PS1dE9 (Garcia et al., 2014). Toutes ces études ont rapporté une augmentation de l'angiogenèse et une amélioration des fonctions cognitives. De plus, la charge amyloïde y était diminuée (Spuch et al., 2010; Herrán et al., 2013; Garcia et al., 2014) ainsi que la phosphorylation de Tau (Spuch et al., 2010). Garcia et al. ont aussi observé une gliose réactionnelle plus faible dans les souris traitées au VEGF, avec une diminution de l'expression des protéines Gfap (astrocytes) et Iba1 (microglie), pour atteindre un niveau comparable à celui des souris WT (Garcia et al., 2014).

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que le VEGF est capturé par l'A β dans la MA, et n'est donc plus capable de diminuer les niveaux de production du peptide amyloïde. Or, un gain de fonction du VEGF est capable de rétablir des niveaux de vascularisation physiologiques, de limiter l'accumulation des protéines A β et Tau, et d'obtenir des réponses neuronales et gliales adaptées.

c. Microglie et VEGF dans la MA

L'A β affecte aussi la voie du VEGF des cellules microgliales, notamment en entraînant une augmentation de l'expression du VEGF et du VEGFR1 par des microglies en culture, et *in vivo* sur des coupes de cerveaux de patient.e.s MA (Ryu et al., 2009; Liu et al., 2015). De plus, TREM2 pourrait être impliqué dans l'inhibition de la surexpression du VEGF microglial en réponse à l'A β (Akhter et al., 2021). Le signal VEGF et VEGFR1 colocalise avec les plaques amyloïdes, à la fois dans le cortex de patient.e.s MA et de souris APP23 (Ryu et al., 2009). Cette colocalisation suggère un rôle de la voie VEGF/VEGFR1 microgliale dans le recrutement de ces cellules aux plaques amyloïdes et/ou dans la réponse microgliale autour des plaques. Pour l'étudier, Ryu et al. se sont basés sur un essai fonctionnel *in vitro* de chambres de migration, et sur un modèle *in vivo* d'injection d'A β dans la région CA1, combinée à l'implantation de microglies fluorescentes (EGFP) dans le corps calleux de rats adultes. Par ces deux approches, les auteur.ice.s ont montré que la migration des microglies vers l'A β est inhibée à l'aide d'un anticorps anti-Vegfr1. Ces données confirment donc les précédentes observations de Forstreuter et collaborateurs, sur l'implication de la voie Vegf/Vegfr1 dans la migration microgliale (Forstreuter et al., 2002). L'ensemble de ces travaux souligne le rôle facilitateur du VEGF dans la chimio-attraction des microglies vers l'A β (Ryu et al., 2009). La voie VEGF/VEGFR1 microgliale est donc impliquée dans la réponse à l'A β , mais son mode d'action et sa contribution dans la pathologie amyloïde n'ont jamais été élucidées.

V. Objectifs de thèse

Le VEGF est capable d'exercer des effets positifs dans le contexte de la MA, à la fois sur la fonction synaptique et les performances cognitives. Un de mes objectifs de thèse a consisté à caractériser l'effet d'un peptide bloquant sur l'interaction entre le VEGF et l'A β , sur les dynamiques d'agrégation de l'A β et sa toxicité synaptique (Annexe). Mon implication dans ce projet a été de développer divers essais fonctionnels pour tester l'efficacité du peptide bloquant et son innocuité.

Comme le VEGF a la capacité de réguler *in vivo* et *in vitro* le recrutement des microglies vers l'A β et les plaques amyloïdes, j'ai exploré dans une deuxième partie l'implication de la voie du VEGF dans la réponse microgliale à la pathologie amyloïde. Mon projet principal a consisté à caractériser *in vitro* l'effet du VEGF sur la réponse fonctionnelle des microglies à l'A β , et les mécanismes mis en jeu. L'objectif était donc d'évaluer la contribution du VEGF à la phagocytose de différentes espèces d'A β , puis de déterminer les mécanismes et acteurs impliqués dans cette modulation de l'activité microgliale.

Résultats

VEGF control of the microglial phagocytic response to amyloid- β

Priscille de Gea¹, Sarah Benkeder¹, Pauline Bouvet¹, Mélanie Aimard¹, Naura Chounlamountri¹, Jérôme Honnorat^{1,2}, Le Duy Do^{1,2}, Claire Meissirel^{1,*}

¹ MeLiS laboratory, Institut NeuroMyoGène (INMG), Synaptopathies and Autoantibodies, INSERM U1314, CNRS UMR5284, Université Claude Bernard Lyon 1, 69000 Lyon, France

² French Reference Centre On Paraneoplastic Neurological Syndromes and Autoimmune Encephalitis, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, 59 Boulevard Pinel, 69677, Bron Cedex, France.

* Corresponding author: claire.meissirel@gmail.com

I. Introduction

A key pathogenic mechanism in Alzheimer's disease (AD) is the accumulation of the β -amyloid peptide (A β) in the brain, leading to its aggregation and deposition in plaques. A β plaque deposition occurs decades before patients are diagnosed with dementia, and is thought to result from an imbalance in the production and clearance of A β (Hardy and Selkoe, 2002; Mawuenyega et al., 2010). The neuropathological hallmarks associated with A β brain deposition are the dystrophic neurites surrounding dense-core plaques, along with activated microglial cells, forming the neuritic plaques (Serrano-Pozo et al., 2011). Dense-core A β plaques are constituted of compacted fibrillar A β surrounded by a halo of soluble A β oligomers or protofibrils, considered as the most neurotoxic A β forms (Koffie et al., 2009). Recent studies in mouse models of AD indicate that microglia play a pivotal role in the development of these plaques, either by contributing to their formation (Baik et al., 2016; Huang et al., 2021), or by limiting their expansion as a barrier to the addition of toxic soluble A β forms (Condello et al., 2015). Imaging studies using PET markers have shown that brain A β load in patients with mild cognitive impairment (MCI) is associated with clusters of cortical microglial activation (Parbo et al., 2017). Furthermore, microglial activation at early MCI stages has been linked to higher gray matter and hippocampal volumes and slower decline in cognition, suggesting a protective role for activated microglia in early AD (Hamelin et al., 2016).

Late-onset AD (LOAD) which accounts for more than 90% of the cases implicate a combination of lifestyle, environmental and genetic factors, with a genetic contribution constituting 60 to 80% of the risk to develop the disease (Gatz et al., 2006). A major genetic risk factor for LOAD is the ϵ 4 allele of the Apolipoprotein E gene *APOE* (Corder et al., 1993) that is associated with a decreased ability of the brain to clear accumulating A β in animal models of the disease (Castellano et al., 2011; Verghese et al., 2013). Most of the rare risk genes that have been identified by genome-wide association studies (GWAS) are strongly expressed in microglia, which emphasizes the role of these brain immune cells in AD pathogenesis (Jansen et al., 2019; Bellenguez et al., 2022). This includes a gene encoding for a key transmembrane receptor involved in microglial response, the Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2 (TREM2), with variants increasing the risk for developing the disease (Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013). Emerging evidence indicate that most TREM2 variants affect the interaction between TREM2 ligands and the receptor, resulting in either reduced or increased TREM2 activity *in vitro* (Gratuze et al., 2018). Finally, TREM2 activity can be impaired by its excessive shedding from the microglial cell surface, triggered by ADAM proteases in a specific AD-associated variant (Schlepckow et al., 2017; Thornton et al., 2017). The impact of TREM2 function has been investigated *in vivo* in AD mouse models deficient for TREM2 that show a

clear reduction in A β plaque-associated microglia (Ulrich et al., 2014; Jay et al., 2015; Wang et al., 2015). In these models, TREM2 deletion also leads to an impairment in fibrillar A β deposition with loosely defined and less compact A β plaque morphology associated with dystrophic neurites (Wang et al., 2016), and at late stages, to an increase in A β load (Wang et al., 2015) and A β plaque size (Jay et al., 2017). Thus, TREM2 is implicated in microglial recruitment to A β plaques, in link with A β phagocytosis.

Phagocytosis carried out by microglia is important for tissue homeostasis in physiological conditions to clear the microenvironment from ineffective synapses, dying cells and cellular debris (Hammond et al., 2018). In AD, the role of microglia in A β plaque clearance is debated because pharmacological depletion of microglia in AD mouse models resulted in reduced A β plaque deposition when induced early and for a long duration period (Sosna et al., 2018; Spangenberg et al., 2019), but did not change A β load at later stages (Dagher et al., 2015; Spangenberg et al., 2016). Furthermore, when repopulation of microglia was initiated by discontinuous pharmacological treatments, it resulted in the remodeling of plaque morphology with plaque compaction and decreased neuritic dystrophy (Casali et al., 2020). However, with disease chronicity, microglia are thought to become hypofunctional and lose their ability to internalize and degrade A β aggregates (Friker et al., 2020). These studies underscore that complex role of microglia during the course of AD, being involved in initial plaque formation and preventing further neuronal damage by forming a barrier at the periphery. Thus, one still need to determine whether microglial internalization concern mostly freely diffusible neurotoxic A β forms or plaque-derived forms of fibrillar A β , and to explore the factors that can regulate this process in the plaque microenvironment.

Interestingly, the vascular endothelial growth factor (VEGF), which is known to display both a vascular and neuronal function (Lange et al., 2016), accumulates in A β plaques in the brains of AD patients and mouse models of the disease (Yang et al., 2004; Ryu et al., 2009; Martin et al., 2021). Evidence also show an impairment in VEGF protein expression in AD, with mainly an upregulation in the brain (Thomas et al., 2015; Miners et al., 2016), but contrasted results in the periphery, with up- or downregulation in the serum (Mateo et al., 2007; Huang et al., 2013; Cho et al., 2017; Liang et al., 2021). This increase in brain VEGF levels correlates with the amount of insoluble A β and with the progression of the disease (Thomas et al., 2015). Moreover, VEGF is able to trigger the recruitment of microglia via their VEGFR1 receptor to A β -rich brain areas in adult rats administrated with A β (Ryu et al., 2009). This suggests a role for VEGF signaling in microglial function in AD. The impact of VEGF has been further explored in mouse models of AD using transgenic mice overexpressing VEGF or with brain administration of VEGF-releasing nanospheres or secreting cells, and showed an improvement in memory deficits, in vascularization and a decreased A β load (Spuch et al.,

2010; Herrán et al., 2013; Religa et al., 2013; Garcia et al., 2014). These findings demonstrating a beneficial role of VEGF in preclinical models of the disease led to the longitudinal exploration of VEGF levels changes with biomarkers of AD during human brain aging. Importantly, higher VEGF levels in cerebrospinal fluid (CSF) have been associated with increased brain metabolism, less hippocampal atrophy and cognitive decline over time in the presence of elevated AD biomarkers (Hohman et al., 2015; Tubi et al., 2021).

A still unresolved question is whether the neuroprotective role of VEGF which limit brain A β accumulation in AD models involves the regulation of microglial phagocytic function in AD. Therefore, using various approaches including flow cytometry, biochemical and fluorescence-based substrate assays and cell imaging, we explored the role and underlying mechanisms of VEGF in microglial phagocytosis of A β species. Our findings indicate that VEGF signaling increases microglial phagocytic function for A β oligomers but not fibrils in various cellular and *ex vivo* AD models. Moreover, we describe how the ADAM protease activity induced by VEGF can be involved in TREM2-dependent regulation of microglial phagocytosis of A β oligomers.

II. Materials and methods

1. Animals

Postnatal (P1-P2) wild-type C57BL/6JRj female and male mice were used for primary mixed glial cell cultures. *Ex vivo* cryostat replenishment assay was performed on 14-month-old male APP/PS1-21 mice expressing a transgene combining human APP^{KM670/671NL} and presenilin 1 L166P mutations under the *Thy1* promoter (Radde et al., 2006). Genotyping was systematically carried out to validate the presence of the transgene. Intracardiac-perfusions were then performed with Dulbecco Phosphate buffer saline (DPBS) supplemented in Mg²⁺ and Ca²⁺ under deep isoflurane anesthesia. Brains were directly snap-frozen in isopentane and kept at -80°C prior to cryo-sectioning at 10 μ m thick. Sections were then kept at -20°C until use. The study respected the European Community Council directive 2010/63/EU on the protection of animals used for experimental and scientific purposes, and housing followed the guidelines approved by the French Ethical Committee of the Lyon 1 University (DR2013-47).

2. Cell culture

Microglia murine N9 cell line was kindly provided by Christian Haass group. N9 cells were cultured in serum-supplemented medium including DMEM with L-glutamine, 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptavidin (P-S), and used prior to 15 passages. Before treatment application, cells were serum-deprived overnight in DMEM, 2mM L-glutamine and 1% P-S.

Cell seeding density per well was for Western Blot, 800,000 cells in 12-well plate; for Peptidolytic assays 400,000 cells in 96-well black plate; for flow cytometry assays 250,000 cells in 12-well plate; for ELISA assay 800,000 cells in 12-well plate.

For primary mixed cultures, mice cortices and hippocampi were collected and cut into pieces in DPBS supplemented with 0.6% glucose and 1% P-S. Tissue dissociation was performed by soft trituration, prior to a centrifugation step at 800 rpm, 4°C for 7 min to remove debris and myelin. Astrocytes and microglial cells were then plated on poly-L-ornithine (1.5 µg/ml) coated petri-dishes, and cultured for two weeks in serum-supplemented medium at 37°C with 5% CO₂. Microglia were collected after 1 hour of shaking at 90 rpm, 37°C, and centrifuged 20 min at 800 rpm, 4°C. For cryostat replenishment assay, 250,000 primary microglia were plated per brain section, in microglial complete medium adapted from (Bohlen et al., 2019) including DMEM/F12 with 1% P-S, 2 mM L-Glutamine, 5 µg/ml N-acetyl cysteine, 100 µg/mL apo-transferrin, 100 ng/mL sodium selenite, 1.5 µg/ml cholesterol, 0.1 µg/ml oleic acid, 1 ng/ml gondoic acid, 1 µg/ml heparan sulphate, 2 ng/ml TGFβ2 and 10 ng/ml M-CSF.

3. Western blotting

N9 cells were serum-deprived overnight and then treated with VEGF (50 ng/ml) for 5, 15 or 30 minutes. After a quick DPBS wash, cells were incubated 10 min in lysis buffer (25 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.50% DOC, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.10% SDS, pH 7), supplemented with protease inhibitor and phosphatase inhibitor cocktails and 2 mM orthovanadate. Cells lysates were next collected and kept 10 min on ice prior to a centrifugation step at 10,000 g, 4°C for 10 min. Supernatants were kept at -20°C until use for immunoblotting. Denatured samples (15 µg of proteins) were separated using 4-12% SDS-PAGE gels, transferred on nitrocellulose membranes and immunoblotted after a blocking step in Tris-buffered saline, 0,1% Tween (TBS-T) and 5% milk. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in 2% milk TBST-T, prior to an incubation step with appropriate secondary HRP-conjugated antibodies for 1.5 hour at RT. Proteins were visualized with an ECL-containing solution and signal intensity quantified with ImageJ software.

4. ADAM peptide substrate assay

ADAM10/17 cell surface activity was measured by monitoring the cleavage of the fluorogenic peptide substrate III (Mca-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂). For short treatments, N9 microglial cells were directly seeded in HBSS to avoid interference of the medium with real-time monitoring of peptide fluorescence. VEGF (50 ng/ml) was applied simultaneously or 15 to 30 min prior to fluorogenic substrate (5 µM) addition. Fluorescence kinetics was then monitored for 90 min using a TECAN microplate reader, at 320 nm of excitation and 390 nm of emission.

Each time point was normalised to the total fluorescence of the control and expressed as Relative Fluorescence Unit (RFU) plotted as a function of time to calculate slopes (RFU/min/%Control). For longer treatments ranging from 2h to 6h and 20h, N9 cells were seeded overnight in serum-free medium for adhesion, and complete medium change to HBSS was performed with fluorogenic substrate addition. VEGF (50 ng/ml) was applied in serum-free medium for 2h, 6h or 20h followed by a complete medium change to HBSS and fluorogenic substrate (5 μ M) addition. Fluorescence level was then measured 30 min after substrate addition and RFU values were normalised to control. In both assays, DAPI (50 μ g/ml) was incubated for 30 min at the end of the experiment and fluorescence determined at 360 nm of excitation and 465 nm of emission to correct substrate fluorescence values as a function of cell density.

5. *In vitro* phagocytosis assay

A β -FAM was reconstituted in 5% DMSO-DPBS, sonicated for 20 min in ice-cold bath and centrifuged for 3 min at 10,000 rpm 4°C to remove non-reconstituted material. Theoretical A β -FAM concentration was considered as 92 μ M and aliquots stored at -20°C until use. A β oligomers (A β _o) and fibrils (A β _f) were obtained after respectively 2 or 72 h of aggregation of a 15 μ M equivalent monomer solution at 37°C. VEGF (50 ng/ml) and recombinant sTREM2 (20 nM) treatments were systematically applied 5min prior to 1 μ M A β _o or A β _f incubation.

In all phagocytic experiments using flow cytometry, membrane-bound A β fluorescent signal was discriminated from internalized A β signal by incubating N9 microglial cells at 4°C to inhibit phagocytosis (A β -4°C condition). For A β _o phagocytosis, N9 cells were collected from 0 to 8 h after A β _o application. For A β _o degradation experiment, N9 cells were first incubated 1 h with A β _o to induce phagocytosis prior to complete medium removal, and A β degradation was monitored after 4 or 8 h. For A β _f phagocytosis, cells were collected 4 h after A β _f incubation.

Cells were collected after a 5 min incubation in 0.25% Trypsin-DPBS. Washing steps and incubation solutions were performed in DPBS-Mg²⁺/Ca²⁺ with 0.5% BSA. For A β _o phagocytosis assay, cells were first stained for 30min in Ghost Dye Violet 450 for cell viability. Non-specific binding to N9 Fc receptors was blocked by a 5 min incubation step with CD16/32 antibody prior to labelling with CD11b-PE or control isotype (IgG2b-PE) for 15 min. In the other phagocytosis and degradation assays, only Ghost-Violet labeling was performed to validate microglial viability. Cells were next fixed in 1 paraformaldehyde, washed and analysed by flow cytometry using BD FACSCanto II™ Flow Cytometer with BD FACSDiva and FlowJo softwares.

The A β -4°C condition allowed defining gates for intracellular (Int) or total (Membrane+Intracellular) A β on FITC histograms. For A β _o phagocytosis and degradation assays, the total A β Mean Fluorescence Intensity (MFI) obtained after VEGF treatment was

normalised to control 0h. For phagocytosis assays with A β f and VEGF as well as A β o and sTREM2, the internalised A β MFI was normalised to control.

6. *Ex vivo* phagocytosis assay

Ex vivo cryostat replenishment assay was adapted from previous studies (Bard et al., 2000; Claes et al., 2019; Colombo et al., 2021). Briefly, wells were built around thawed APP/PS1 brain cryostat sections in sterile conditions and washed once with DPBS prior to complete medium application. On DIV1, A β antibody (6E10) was incubated for 1h on consecutive sections prior to seeding (cells) or not (no cells) with 250,000 primary microglial cells in complete medium, and cultures were maintained at 37°C and 5% CO₂. Control or VEGF (50 ng/ml) treatments were applied on DIV2 and DIV4 with half medium change. Sections were fixed on DIV5 with 4% paraformaldehyde for 10 min.

For immunostainings, a permeabilization and blocking step was performed in PBS - 0.1% Triton - 5% BSA for 45min and sections were incubated overnight at 4°C with primary anti-A β (4G8) and anti-iba1 antibodies in PBS-0,3% Triton-1% BSA. Secondary anti-mouse-Alexa 555 or anti-rabbit-Alexa 488 antibodies were next applied for 2h at RT. Finally, DAPI counterstaining was performed for 10 min and sections were mounted in Fluoromount-G medium with coverslips. Whole slide images were acquired using the Axio-Scan.Z1 slide scanner and 3D-high resolution acquisitions were performed with Confocal Zeiss 880 (CIQLE platform, Lyon). Images were further analysed with MATLAB®2018A by selecting A β positive plaques with a minimum area of 50 μm^2 .

7. ELISA sTREM2

N9 cell culture media were collected after 1 to 4 h of VEGF (50 ng/ml) treatment, centrifuged 5 min at 500 g, and supernatants were kept at -20°C until use. 96-well microplates were coated overnight at 4°C with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of TREM2 antibody in PBS. After a blocking step of 1 h with DPBS-3% BSA, sTREM2 standard (0-100 pg/ml) or samples were loaded in wells and incubated 2 h at RT. Biotinylated-TREM2 antibody (1 $\mu\text{g/ml}$) was then used as a detection antibody and incubated for 2 h prior to HRP-conjugated streptavidin for 1 h, as reported (Zhong et al., 2019). Finally, reaction was performed with Substrate TMB reagent for 20 min and stopped with sulfuric acid solution. Absorbance was measured with a TECAN Microplate-reader successively at 450 nm and 540 nm.

8. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM, except for Figure 3C where median and quartiles box plot were shown. For western blot, flow cytometry, peptidolytic and ELISA assays, sample size

(n) refers to the number of culture wells or petri-dishes and N refers to the number of experiments. For *ex vivo* assay, n refers to the number of brain sections and N refers to the number of mice. Data representation and analyses were carried out with RStudio software. Descriptive statistics and appropriate tests were systematically used to evaluate normality and homoscedasticity of data, and to determine the appropriate statistical analysis to be carried out using non-parametric or parametric tests. Details of each statistical analysis between treatments or groups using ANOVA, Wilcoxon or Kruskal-Wallis are presented in figure legends. For phagocytosis, replenishment and ELISA assays, we used mixed effect models adapted to complex experimental designs with dependent and non-dependent data, and allowing the inclusion of random factors in addition to fixed effects. Models fitting and analysis were carried out with the lme4 package (Bates et al., 2015). For *in vitro* phagocytosis experiments, condition (control/VEGF) and time were considered as fixed effects, whereas the experiment factor was considered as a random intercept allowing us to improve model fitting in comparison with classical linear model. For *ex vivo* phagocytosis, fixed effects were the interaction between replenishment and condition, with a random intercept for the sections. For sTREM2 ELISA assay, the condition was a fixed effect, with a random intercept for the experiment factor. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Supplementary Table: Key resources

<i>Reagent or Ressource</i>	<i>Source</i>	<i>Reference</i>
Antibodies/Probes		
Rabbit anti-phospho Src Tyr416 WB: 1/1000	Cell Signaling Technology	CST2101
Rabbit anti-Src WB: 1/1000	Cell Signaling Technology	CST2108
Rabbit anti-phospho PI3K p85(Tyr458)/p55(Tyr199) WB: 1/1000	Cell Signaling Technology	CST4228
Rabbit anti-PI3K p85 WB: 1/1000	Cell Signaling Technology	CST4257
Rabbit anti-phospho MAPK p38 (Thr180/Thr182) WB: 1/1000	Cell Signaling Technology	CST9211
Mouse anti-MAPK p38 WB: 1/1000	Abcam	ab31828
Rabbit anti-phospho PLC γ (Tyr783) WB: 1/1000	Cell Signaling Technology	CST2821
Rabbit anti-PLC γ WB: 1/1000	Cell Signaling Technology	CST2822
Mouse anti- β Actine WB: 1/40000	Sigma-Aldrich	A1978
Goat anti-rabbit HRP WB: 1/10000	Jackson Immunoresearch	111-036-003
Goat anti-mouse HRP WB: 1/10000	Jackson Immunoresearch	115-036-003
Rat anti-CD11b-PE FC: 20 μ g/ml	BDBioscience	557397

Mouse control isotype PE FC: 20µg/ml	BDBioscience	555058
Rat anti-CD16/36 Fc Block FC: 1µg/ml	BDBioscience	553142
Ghost Dye Violet 450 FC: 0,25µl/tube	Cell Signalling Technology	49826
Mouse anti-Aβ 6E10 Cryostat: 5µg/ml	BioLegend	8003002
Mouse anti-Aβ 4G8 Cryostat IF: 1/500	BioLegend	800709
Rabbit anti-iba1 Cryostat IF: 1/500	Wako	19741
Goat anti-rabbit Alexa488 Cryostat IF: 1/500	ThermoFisher Scientific	A11034
Goat anti-mouse Alexa 555 Cryostat IF: 1/1000	ThermoFisher Scientific	A21424
DAPI 1µg/ml (IF), 50µg/ml (Fluorogenic)	SigmaAldrich	D9542
Sheep anti-TREM2 antibody ELISA: 0.5 µg/ml	R&D Systems	AF1729
Biotinylated sheep anti-TREM2 antibody ELISA:1 µg/ml	R&D Systems	BAF1729
Biochemistry products		
Sodium orthovanadate	SigmaAldrich	450243
Phosphatase inhibitor cocktail	MERCK Millipore	Cat#524629
cOmplete protease inhibitor cocktail	MERCK Millipore	Cat# 04693159001
Bolt MOPS SDS Running Buffer	Thermofisher Scientific	2550875
4-12% Criterion XT Bis-Tris Protein Gel	Bio-Rad	Cat#3450124
Nitrocellulose membrane 0,2 µm	Dutscher	10600001
SuperSignal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate	ThermoFisher Scientific	Cat#34577
Fluoromount G	Thermofisher Scientific	00-4958-02
Epredia SuperFrost Plus glass slides	Thermofisher Scientific	J1800AMNZ
Reagent Diluent Concentrate 2	R&D Systems	Cat#DY995
Clear polystyrene microplates	R&D Systems	Cat#DY990
Streptavidin HRP	R&D Systems	Cat#DY998
Substrate Reagent Buffer	R&D Systems	Cat#DY999B
Stop solution 2N Sulfuric acid	R&D Systems	Cat#DY994

<i>Reagent or Ressource</i>	<i>Use</i>	<i>Source</i>	<i>Reference</i>
Cell culture			
DMEM Low glucose Phenol red	N9 microglia, Mixed culture	ThermoFisher Scientific	
DMEM Low glucose no Phenol red	N9 microglia	ThermoFisher Scientific	31885023
DMEM/F12 no Phenol Red	Primary microglia	ThermoFisher Scientific	
Fetal Bovine Serum	N9 microglia, Mixed culture	Eurobio	CVFSVF00 01

Penicilline-Strepomycine		ThermoFisher Scientific	11548876
L-Glutamine		ThermoFisher Scientific	25030024
N-Acétyl Cystéine	Primary microglia	Merck	A9165
Sodium Selenite	Primary microglia	Merck	AS5261
Apo-Transferrine	Primary microglia	Sigma-Aldrich	T1147
Recombinant murine M-CSF	Primary microglia	PreProtech	315-02
Heparan sulfate	Primary microglia	Amsbio	GAG-HS01
Oleic acid	Primary microglia	Merck	O1383
Gondoic acid	Primary microglia	Merck	E3635
Cholesterol	Primary microglia	Merck	700000P
Trypsin	N9 microglia	ThermoFisher Scientific	11538876
Dulbecco Phosphate Buffer Saline (DPBS)	N9 microglia	ThermoFisher Scientific	12037539
DPBS Mg2+ Ca2+	Perfusion, FC	ThermoFisher Scientific	11580456
Hank's Balanced Saline Solution (HBSS)		Sigma	H6648
Chemical, peptides, recombinant protein			
Recombinant human VEGF 165		R&D System	293-VE
FAM-Amyloid- β protein (1-42)	FC	Bachem	4090151
Recombinant mouse TREM2-His	ELISA, FC	Interchim	50149-M08H
Fluorogenic substrate III (Mca-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH2)		BioTechne	ES003

<i>Reagent or Ressource</i>	<i>Source/Version</i>
Experimental models	
N9 microglia cell line	Christian Haass lab
APP/PS1-21 transgenic mice	Radde et al.,2006
C57Bl/6JRj	JanvierLab
Software	
ImageLab	Version 6.0.1
Fiji - ImageJ	Version 2.9.0
BDFacs Diva	
FlowJo	Version 10.8.2
MATLAB	2018A
RStudio	R 4.2.1/RStudio 2023.03.0

Abbreviations: Western Blot (WB), Flow Cytometry (FC), ImmunoFluorescence (IF)

III. Results

1. VEGF signalling induces Src family kinase activation

To determine whether VEGF is involved in the regulation of microglial clearance function, we first assess the presence of the main VEGF receptors, VEGFR1 and VEGFR2, on N9 microglial cells. We confirmed using western blotting that N9 cells only express VEGFR1 but not VEGFR2 (Figure S1A). Next, we explored the signalling pathways downstream of VEGFR1 based on the one previously identified in endothelial cells (Koch et al., 2011), focusing on phospholipase C- γ (PLC γ), mitogen-activated protein kinase (MAPK-p38), phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K-p55) and Src. We quantified signalling protein expression changes following VEGF treatment of N9 microglia for 5, 15 or 30 minutes by targeting specific phosphorylated residues on immunoblots. The ratio of phosphorylated over total protein expression level was considered as an indicator of pathway activation (Figure 1A-D). VEGF treatment didn't induce changes in MAPK-p38 (T180/182), PI3K-p55 (Y199) nor PLC γ (Y783) activation (Figure 1E-G). In contrast, Src family kinase (SFK) phosphorylation at residue Y416 was significantly increased after 15 minutes of VEGF treatment compared to control (Figure 1H). Thus, these findings indicate that VEGF promotes microglial activation of SFK pathway via VEGFR1.

2. VEGF promotes microglial phagocytosis of A β oligomers

As SFK activation is involved in microglial phagocytosis (Portugal et al., 2022) and microglial phagocytosis required to limit A β accumulation in the brain in AD (Hellwig et al., 2015), we investigated whether VEGF affects A β uptake by microglia. Firstly, as soluble A β oligomers (A β o) are considered the most toxic A β species in AD (Hong et al., 2018), we examined the kinetics of A β o-mediated phagocytosis by N9 microglia using biotinylated A β o aggregated for 2h. Immunofluorescent analyses were performed to monitor the 3D intracellular localization of A β o versus surface adhesion by comparing A β o-treated N9 cells to endogenous biotnine signal in non-treated cells (Figure S2). Notably, streptavidin labelling was increased in microglia as soon as 2 hours after oligomer treatment and remained at a stable and high intensity level up to at least 8 hours, in contrast to the control group (Figure S2). These results indicate that A β o internalization by N9 cells is saturable in a time-dependent manner, suggesting that it is a receptor-mediated process.

Next, we determined the impact of VEGF on A β o internalization process using flow cytometry to quantify fluorescent A β o (FAM-A β o) microglial uptake overtime, with or without VEGF

treatment (Figure 2A, B). The phagocytic uptake of FAM-A β o by N9 microglia cells was characterized by a green fluorescent peak clearly shifted towards higher fluorescence intensity values than in the control condition performed at 4°C, a control group in which phagocytosis is blocked (Figure 2A). When comparing the relative fluorescence normalized to the initial time, a rapid increase in fluorescence occurred during the first 2 hours, followed by a slower increase up to 4 hours and a moderate decrease from 4 to 8 hours, which may reflect a balance between phagocytosis and degradation. Importantly, VEGF significantly increased the fluorescence intensity per cell, indicating that microglial cells were capable of taking higher amount of A β o when treated with VEGF (Figure 2A, B). To determine if this VEGF effect was due to an increase in A β o phagocytosis or alternatively to an impairment in intracellular A β degradation, we performed additional degradation studies. We therefore examined if the VEGF would change the intracellular A β content overtime following a 1 h incubation step of N9 microglia with A β o, during which microglia have previously been shown to phagocytose A β o (Figure 2B). Intracellular A β degradation was monitored after 4 and 8 hours by measuring the relative fluorescence intensity per cell (FAM-A β -MFI) normalized to 100% after the internalization step (0h degradation) (Figure 2C, D). Microglia efficiently degraded internalised A β o, with approximately 30% and 70% reduction for respectively 4 and 8 hours of degradation (Figure 2D). Notably, the VEGF did not alter the progressive decline in microglial A β content compared to the control condition. Altogether, our findings demonstrate that VEGF increases microglial A β o uptake, without modifying intracellular degradation capacity.

3. VEGF does not change microglial phagocytic ability for A β fibrils

Various A β species are recognised by specific microglial receptors and induce distinct phagocytic responses depending on their conformation, namely the oligomeric (A β o) versus the fibrillar (A β f) forms (Yu and Ye, 2015). To further characterize VEGF functional effect in N9 microglial phagocytosis, we explored its impact on A β f uptake by monitoring the internalisation of fluorescent FAM-A β f aggregated for 72 h (Figure 2E-G). Based on the bimodal distribution of A β f fluorescence, we can define two distinct microglial populations, the one with a low fluorescence intensity per cell indicated by peak 1 and a second population with higher phagocytic ability characterized by the broader peak 2 (Figure 2E). Importantly, neither the proportion of phagocytic cells nor the amount of intracellular A β f differed between control and VEGF treated cells (Figure 2F-G). From this assay we concluded that N9 microglia can display various phagocytic mechanisms of A β f but VEGF plays no role in this process.

As the response of microglial cells to brain A β deposition in plaque is a hallmark of AD, we next used an *ex vivo* plaque clearance assay (Bard et al., 2000; Xiang et al., 2016; Colombo et al., 2021) to further investigate VEGF impact on microglia A β phagocytosis. Cryostat brain sections from APP/PS1 mice were used as an extracellular matrix on which primary microglia were cultured to assess their A β plaque clearance capacity. In this AD model, amyloid plaques accumulate in the cortex from 8 weeks onwards (Radde et al., 2006), with plaque load stabilization occurring at 10 months (Yan et al., 2009). Primary murine microglia were therefore deposited on 14-month-old APP/PS1 brain sections and cultured with or without treatment for 5 days to allow assessment of plaque reduction. First, we validated that microglia presence on brain sections reduces plaque size and that their distribution heterogeneity did not bias our measurements (Figure S3). Based on A β immunostaining, plaque area was measured in the cortex with a cut-off value of 50 μm^2 and compared between consecutive slices, replenished or not with microglia (Figure 3A). Further 3D confocal analyses were performed to document intracellular uptake of A β by microglia around plaques, using orthogonal view (Figure 3B). Our results show that replenishment of APP/PS1 brain sections with primary microglia significantly reduced A β plaque size, but without any difference between control and VEGF conditions (Figure 3C). Taken together, these findings indicate that VEGF doesn't promote synthetic and natural A β fibrils or plaque phagocytosis by microglia. This suggests that VEGF could be involved in the regulation of microglial molecular mechanisms that mediate soluble A β oligomer but not fibrillar A β internalisation.

4. VEGF induces ADAM10/17 protease activity in microglia

Microglia can bind soluble A β oligomers through cell surface receptors that trigger a phagocytic response and receptor shedding is critical for regulating this process (Dhandapani et al., 2022). To explore the mechanisms underlying VEGF effect on microglia, we focused on the possibility of modulating the activity of the major sheddase in microglia, namely ADAM10 and ADAM17 (Lambrecht et al., 2018; Hsia et al., 2019). Previous studies reported that VEGF is able to increase ADAM10 and ADAM17 expression and activity *in vitro* in endothelial cells and *in vivo* in the brain of an AD mouse model (Donners et al., 2010; Guo et al., 2019). We therefore investigated if VEGF modulates these protease activities specifically in microglia, and have first confirmed that N9 microglia expressed ADAM10 and ADAM17 (Figure S1B). Next, we evaluated the activity of the proteases using a fluorogenic peptide substrate whose sequence is specifically recognized by ADAM10 and ADAM17. Once cleaved, the substrate emits a fluorescence that can be reported to the ADAM peptidolytic activity. Short VEGF pre-treatment or concomitant application of VEGF and substrate significantly increased the ADAM10/17

peptidolytic activity compared to control (Figure 4A-B). In contrast, a longer pre-treatment failed to stimulate ADAM10/17 cleavage activity, suggesting a rapid and transient effect of VEGF. To further test the kinetics of VEGF action on ADAM10/17 activity, we treated N9 cells with VEGF for longer durations and evaluated the proteases cleavage ability. Interestingly, these VEGF treatments exhibited an inhibitory effect on ADAM10/17 activity compared to control (Figure 4C). Taken together, these findings revealed a time-dependent effect of VEGF on ADAM10/17 protease activity, suggesting that this activity is transiently upregulated at the microglial cell surface, then downregulated by a VEGF-dependent internalization process.

5. VEGF induces microglial TREM2 shedding and sTREM2 release

ADAM10/17 perform two types of cleavage depending on the target, including the peptidolytic cleavage of soluble substrates and the shedding of transmembrane proteins at the cell surface (Reiss and Bhakdi, 2017). To determine the relevance of the VEGF effect on ADAM10/17 sheddase activity, we evaluated the extent of ectodomain release of a microglial A β receptor targeted by these proteases, the triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) (Kleinberger et al., 2014; Feuerbach et al., 2017). We first validated TREM2 expression on N9 microglial cells using western blotting (Figure S1B), confirming a previous report (Xiang et al., 2016). Microglia were then treated with VEGF for 1 to 4 hours, and the levels of the soluble form of TREM2 (sTREM2) were determined by ELISA assay on collected culture medium (Figure 5A). The results demonstrated that VEGF significantly increases sTREM2 levels only after 1 hour of treatment, which is consistent with the early VEGF-dependent increase in ADAM10/17 protease activity shown previously.

As the functional relevance of sTREM2 is not fully understood (Brown and St George-Hyslop, 2021), we designed experiments to determine whether sTREM2 is only a byproduct of TREM2 cleavage or whether it could promote A β phagocytosis by microglia. Recombinant sTREM2 was therefore administered to N9 microglia 5 min prior to FAM-A β , and intracellular A β fluorescence was measured after 4 hours, when A β phagocytosis is at its peak (Figure 5B). Importantly, we observed that sTREM2 significantly increased both the number of phagocytic cells and the amount of internalised A β (Figure 5C,D). Collectively, these findings indicate that VEGF transiently stimulates ADAM10/17 protease activity in microglial cells resulting in TREM2 shedding with sTREM2 release. In turn, sTREM2 was shown to promote A β phagocytosis by microglial cells and could be considered as a mediator of VEGF functional effect on A β uptake.

IV. Discussion

The present study demonstrates that VEGF promotes microglial phagocytosis of A β oligomers but does not affect fibrillar A β internalization. Our experimental data show that this enhanced phagocytosis of A β o is closely linked to the time-dependent effect of VEGF on ADAM10/17 proteolytic activity. VEGF, by transiently activating ADAM metalloproteases, is implicated in TREM2 shedding and sTREM2 production, and therefore regulates TREM2 phagocytic function.

Increasing evidence demonstrate that VEGF exerts its effects upon binding to membrane tyrosine kinase receptors in endothelial cells (Simons et al., 2016), but the type of receptor and molecular pathways involved in VEGF regulation of microglia function are largely unknown. Our present study now shows that SFK signaling is activated upon VEGF treatment in VEGFR1-expressing microglial cells. Although VEGFR1 is commonly considered as a decoy receptor due to its low tyrosine kinase activity (Shibuya, 2006), the genetic invalidation of its tyrosine kinase domain in mice has been shown to impair macrophage migration, implying a direct VEGFR1 signaling (Hiratsuka et al., 1998). Moreover, recent findings indicate that VEGFR1 plays an active signaling role in the development of retinal microglial cells (Ogura et al., 2017) and in the regulation of microglial receptors involved in phagocytosis (Xu et al., 2017). In AD pathological context, VEGFR1 has been shown to underlie microglial recruitment to brain A β deposits in response to VEGF (Ryu et al., 2009). Such a chemotactic response of microglia to VEGF may play a key role in the regulation of A β phagocytosis, because we and others have previously shown that VEGF accumulates in and around A β plaques in the brain of AD patients (Yang et al., 2004; Ryu et al., 2009; Thomas et al., 2015; Martin et al., 2021).

We therefore investigated whether VEGF may serve as a priming signal to regulate A β phagocytosis by microglia, and examined its impact on A β uptake by taking in account different A β conformations with soluble or fibrillar A β species. Notably, our findings revealed that VEGF promotes an efficient uptake of soluble A β o overtime, without stimulating fibrillar A β phagocytosis. Furthermore, we confirmed that VEGF does not impair intracellular A β o degradation, demonstrating that this VEGF-dependent increase in intracellular A β o results solely from an increased phagocytosis by microglia. Importantly, the kinetics of A β o uptake upon VEGF treatment reach a plateau after 4h of treatment, indicating that the underlying mechanisms is saturable and does not involve macropinocytosis, but a receptor-mediated phagocytic process (Mandrekar et al., 2009).

Brain A β deposition in plaques is thought to result from an increasing A β accumulation that leads to the formation of aggregates due to an impaired clearance process (Tarasoff-Conway et al., 2015). To determine if the VEGF facilitating effect on A β o phagocytosis plays a role in

the microglial clearance of preexisting plaques, we used an *ex vivo* assay, as previously reported (Bard et al., 2000; Xiang et al., 2016; Colombo et al., 2021). In the presence of antibody stimulation, VEGF does not impact the phagocytic capacity of microglial cells in amyloid plaque clearance, in agreement with our observation on VEGF-independent fibrillar phagocytosis. Antibody-mediated microglial phagocytosis has been shown to involve Fcγ-receptors (FcγR) (Bard et al., 2000; Wilcock et al., 2004; Doens and Fernández, 2014) and some of these receptors, such as the FcγRIIb, can interact with Aβ_o (Kam et al., 2013; Amin and Harris, 2021). Therefore, the question remains to determine why there is no difference with VEGF treatment in oligomeric Aβ deposited around plaques, while it promotes Aβ_o phagocytosis by microglia. We envisioned that VEGF may regulate a FcγR-independent pathway in microglia, focusing on TREM2 for two main reasons. First, TREM2 deficiency in microglia impairs cell migration towards a defined chemoattractant *in vitro* (Mazaheri et al., 2017), mimicking the impact of VEGFR1 blockade on microglia (Ryu et al., 2009). Second, TREM2 is able to directly bind Aβ_o with a higher affinity (Zhao et al., 2018) than that of Aβ fibrils (Lessard et al., 2018).

One of the main mechanisms regulating TREM2 function in microglial phagocytosis is the receptor ectodomain shedding by ADAM metalloproteases, giving rise to soluble TREM2 (sTREM2) (Feuerbach et al., 2017; Schlepckow et al., 2017, 2020). Notably, VEGF has previously been reported to increase ADAM10 expression and activity in endothelial cells, where ADAM10 interacts with VEGFR2 triggering an increase in endothelial cell permeability and migration (Donners et al., 2010). Moreover, VEGF gain of function has been shown to enhance brain ADAM10 expression in the Tg2576 mouse model of AD, alleviating Aβ load and cognitive deficits (Guo et al., 2019). Importantly, our findings demonstrate that VEGF transiently increases ADAM10/17 proteolytic activity in microglial cells, which solely express VEGFR1 but not VEGFR2. The mechanism underlying this VEGF-induced activation of ADAM10/17 metalloproteases could involve the SFK pathway, as we already showed that VEGF triggers SFK activation in microglial cells. Indeed, a crosstalk has been identified between ADAM10 and Src kinases, implicating Src activation as a positive regulator of ADAM10 shedding activity in pituitary adenoma cells (Huang et al., 2020). However, our findings also revealed that the short-term effect of VEGF, triggering an increase in ADAM10/17 proteolytic activity, is different from the changes induced by long-term VEGF exposure. The downregulation of ADAM10/17 activity at the microglial cell surface after long-term VEGF stimulation could be due to their internalization and/or ectodomain shedding by ADAM9 (Tousseyn et al., 2009), also activated by VEGF (Mehta et al., 2018).

In agreement with the time-dependent increase of ADAM10/17 proteolytic activity by VEGF, we uncovered an enhanced production of sTREM2 which is released in the culture medium

after 1h, and normalized after 2h. In contrast, the subsequent blockade of ADAM10/17 proteolytic activity due to VEGF could stabilize at later stages the TREM2 receptor on the microglial cell surface. Emerging evidence now indicate that sTREM2 exerts direct functions and is not merely a degradation by-product that serves as a decoy receptor to trap TREM2 ligands (Yang et al., 2020; Brown and St George-Hyslop, 2021; Filipello et al., 2022). However, the role of sTREM2 in AD pathogenesis is still debated. On the one hand, sTREM2 production by receptor shedding is thought to negatively regulate TREM2 function, as the AD associated H157Y TREM2 variant promotes this shedding, leading to reduced TREM2-dependent phagocytosis (Schlepckow et al., 2017; Thornton et al., 2017). Furthermore, the inhibition of TREM2 shedding using an antibody directed against an epitope close to the ADAM10/17 cleavage site, stabilizes TREM2 on the cell surface, activates its signaling pathway, and leads to A β phagocytosis by microglia (Schlepckow et al., 2020). On the other hand, when the ADAM10/17 cleavage site is genetically substituted in mice to reduce TREM2 cleavage, the stabilization of membrane-bound TREM2 facilitates A β deposition and neuronal dystrophy in an AD mouse model (Dhandapani et al., 2022). Also, a gain of function of sTREM2 in 5xFAD mice by viral gene transfer or brain injection revealed its protective role in facilitating A β phagocytosis, plaque clearance, and in preventing memory deficits (Zhong et al., 2019).

Given these conflicting reports, we therefore investigated whether sTREM2 could directly impact A β phagocytosis in our microglial cell model. Our findings showed that sTREM2 treatment promotes microglial phagocytosis of A β even when administrated at a much lower level than previously reported (Zhong et al., 2019), where non-physiological levels were applied compared to human CSF (Suárez-Calvet et al., 2019). The key question is now to understand how the VEGF-induced release of microglial sTREM2 could underlie the associated increase in A β phagocytosis. The high affinity binding of TREM2 ectodomain for A β and the slow dissociation kinetics of the complex (Lessard et al., 2018) could be instrumental in the blockade of A β aggregation and in the disaggregation of preformed A β due to sTREM2 (Kober et al., 2020; Vilalta et al., 2021). Thus, the time-dependent effect of VEGF on microglial ADAM10/17 proteolytic activity may result in an early blockade of A β aggregation via sTREM2 release, followed by a subsequent TREM2-mediated increase in the phagocytosis of small oligomeric species.

Taken together our findings provide evidence that VEGF is able to promote the clearance of toxic A β species by stimulating microglial phagocytosis. They further suggest a model in which VEGF present in the A β plaque microenvironment triggers microglial recruitment to limit plaque extension by promoting phagocytosis.

V. Reference

- Amin, L., and Harris, D. A. (2021). A β receptors specifically recognize molecular features displayed by fibril ends and neurotoxic oligomers. *Nat. Commun.* 12, 3451. doi: 10.1038/s41467-021-23507-z.
- Baik, S. H., Kang, S., Son, S. M., and Mook-Jung, I. (2016). Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid β in the brain of Alzheimer's disease mouse model: A β Plaque Formation and Microglial Activation. *Glia* 64, 2274–2290. doi: 10.1002/glia.23074.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.-L., Games, D., Grajeda, H., et al. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* 6, 916–919. doi: 10.1038/78682.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., and Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Softw.* 67, 1–48. doi: 10.18637/jss.v067.i01.
- Bellenguez, C., Küçükali, F., Jansen, I. E., Klei, N., Moreno-Grau, S., Amin, N., et al. (2022). New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nat. Genet.* 54, 412–436. doi: 10.1038/s41588-022-01024-z.
- Bohlen, C. J., Bennett, F. C., and Bennett, M. L. (2019). Isolation and Culture of Microglia. *Curr. Protoc. Immunol.* 125, e70. doi: 10.1002/cpim.70.
- Brown, G. C., and St George-Hyslop, P. (2021). Does Soluble TREM2 Protect Against Alzheimer's Disease? *Front. Aging Neurosci.* 13, 834697. doi: 10.3389/fnagi.2021.834697.
- Casali, B. T., MacPherson, K. P., Reed-Geaghan, E. G., and Landreth, G. E. (2020). Microglia depletion rapidly and reversibly alters amyloid pathology by modification of plaque compaction and morphologies. *Neurobiol. Dis.* 142, 104956. doi: 10.1016/j.nbd.2020.104956.
- Castellano, J. M., Kim, J., Stewart, F. R., Jiang, H., DeMattos, R. B., Patterson, B. W., et al. (2011). Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci. Transl. Med.* 3, 89ra57. doi: 10.1126/scitranslmed.3002156.
- Cho, S.-J., Park, M. H., Han, C., Yoon, K., and Koh, Y. H. (2017). VEGFR2 alteration in Alzheimer's disease. *Sci. Rep.* 7, 17713. doi: 10.1038/s41598-017-18042-1.
- Claes, C., Van Den Daele, J., Boon, R., Schouteden, S., Colombo, A., Monasor, L. S., et al. (2019). Human stem cell-derived monocytes and microglia-like cells reveal impaired amyloid plaque clearance upon heterozygous or homozygous loss of TREM2. *Alzheimers Dement.* 15, 453–464. doi: 10.1016/j.jalz.2018.09.006.
- Colombo, A., Dinkel, L., Müller, S. A., Sebastian Monasor, L., Schifferer, M., Cantuti-Castelvetri, L., et al. (2021). Loss of NPC1 enhances phagocytic uptake and impairs lipid trafficking in microglia. *Nat. Commun.* 12, 1158. doi: 10.1038/s41467-021-21428-5.
- Condello, C., Yuan, P., Schain, A., and Grutzendler, J. (2015). Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques. *Nat. Commun.* 6, 6176. doi: 10.1038/ncomms7176.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., et al. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923. doi: 10.1126/science.8346443.
- Dagher, N. N., Najafi, A. R., Kayala, K. M. N., Elmore, M. R. P., White, T. E., Medeiros, R., et al. (2015). Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. *J. Neuroinflammation* 12, 139. doi: 10.1186/s12974-015-0366-9.

- Dhandapani, R., Neri, M., Bernhard, M., Brzak, I., Schweizer, T., Rudin, S., et al. (2022). Sustained Trem2 stabilization accelerates microglia heterogeneity and A β pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Rep.* 39, 110883. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110883.
- Doens, D., and Fernández, P. L. (2014). Microglia receptors and their implications in the response to amyloid β for Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neuroinflammation* 11, 48. doi: 10.1186/1742-2094-11-48.
- Donners, M. M. P. C., Wolfs, I. M. J., Olieslagers, S., Mohammadi-Motahhari, Z., Tchaikovski, V., Heeneman, S., et al. (2010). A Disintegrin and Metalloprotease 10 Is a Novel Mediator of Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Endothelial Cell Function in Angiogenesis and Is Associated With Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2188–2195. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.213124.
- Feuerbach, D., Schindler, P., Barske, C., Joller, S., Beng-Louka, E., Worringer, K. A., et al. (2017). ADAM17 is the main sheddase for the generation of human triggering receptor expressed in myeloid cells (hTREM2) ectodomain and cleaves TREM2 after Histidine 157. *Neurosci. Lett.* 660, 109–114. doi: 10.1016/j.neulet.2017.09.034.
- Filipello, F., Goldsbury, C., You, S. F., Locca, A., Karch, C. M., and Piccio, L. (2022). Soluble TREM2: Innocent bystander or active player in neurological diseases? *Neurobiol. Dis.* 165, 105630. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105630.
- Friker, L. L., Scheiblich, H., Hochheiser, I. V., Brinkschulte, R., Riedel, D., Latz, E., et al. (2020). β -Amyloid Clustering around ASC Fibrils Boosts Its Toxicity in Microglia. *Cell Rep.* 30, 3743–3754.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.025.
- Garcia, K. O., Ornellas, F. L. M., Martin, P. K. M., Patti, C. L., Mello, L. E., Frussa-Filho, R., et al. (2014). Therapeutic effects of the transplantation of VEGF overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells in the hippocampus of murine model of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 6. doi: 10.3389/fnagi.2014.00030.
- Gatz, M., Reynolds, C. A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J. A., Berg, S., et al. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch. Gen. Psychiatry* 63, 168–174. doi: 10.1001/archpsyc.63.2.168.
- Gratuze, M., Leyns, C. E. G., and Holtzman, D. M. (2018). New insights into the role of TREM2 in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 13. doi: 10.1186/s13024-018-0298-9.
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., et al. (2013). TREM2 Variants in Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 117–127. doi: 10.1056/NEJMoa1211851.
- Guo, H., Xia, D., Liao, S., Niu, B., Tang, J., Hu, H., et al. (2019). Vascular endothelial growth factor improves the cognitive decline of Alzheimer's disease via concurrently inducing the expression of ADAM10 and reducing the expression of β -site APP cleaving enzyme 1 in Tg2576 mice. *Neurosci. Res.* 142, 49–57. doi: 10.1016/j.neures.2018.04.003.
- Hamelin, L., Lagarde, J., Dorothée, G., Leroy, C., Labit, M., Comley, R. A., et al. (2016). Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using ¹⁸F-DPA-714 PET imaging. *Brain* 139, 1252–1264. doi: 10.1093/brain/aww017.
- Hammond, T. R., Robinton, D., and Stevens, B. (2018). Microglia and the Brain: Complementary Partners in Development and Disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 34, 523–544. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060509.
- Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356. doi: 10.1126/science.1072994.
- Hellwig, S., Masuch, A., Nestel, S., Katzmarski, N., Meyer-Luehmann, M., and Biber, K. (2015). Forebrain microglia from wild-type but not adult 5xFAD mice prevent

- amyloid- β plaque formation in organotypic hippocampal slice cultures. *Sci. Rep.* 5, 14624. doi: 10.1038/srep14624.
- Herrán, E., Pérez-González, R., Igartua, M., Pedraz, J. L., Carro, E., and Hernández, R. M. (2013). VEGF-releasing biodegradable nanospheres administered by craniotomy: A novel therapeutic approach in the APP/Ps1 mouse model of Alzheimer's disease. *J. Controlled Release* 170, 111–119. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.04.028.
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., and Shibuya, M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9349–9354.
- Hohman, T. J., Bell, S. P., and Jefferson, A. L. (2015). The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Neurodegeneration and Cognitive Decline: Exploring Interactions with Biomarkers of Alzheimer's Disease. *JAMA Neurol.* 72, 520–529. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.4761.
- Hong, W., Wang, Z., Liu, W., O'Malley, T. T., Jin, M., Willem, M., et al. (2018). Diffusible, highly bioactive oligomers represent a critical minority of soluble A β in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 136, 19–40. doi: 10.1007/s00401-018-1846-7.
- Hsia, H.-E., Tüshaus, J., Brummer, T., Zheng, Y., Scilabra, S. D., and Lichtenthaler, S. F. (2019). Functions of 'A disintegrin and metalloproteases (ADAMs)' in the mammalian nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 3055–3081. doi: 10.1007/s00018-019-03173-7.
- Huang, J., Pan, Y., Hu, G., Sun, W., Jiang, L., Wang, P., et al. (2020). SRC fine-tunes ADAM10 shedding activity to promote pituitary adenoma cell progression. *FEBS J.* 287, 190–204. doi: 10.1111/febs.15026.
- Huang, L., Jia, J., and Liu, R. (2013). Decreased serum levels of the angiogenic factors VEGF and TGF- β 1 in Alzheimer's disease and amnesic mild cognitive impairment. *Neurosci. Lett.* 550, 60–63. doi: 10.1016/j.neulet.2013.06.031.
- Huang, Y., Happonen, K. E., Burrola, P. G., O'Connor, C., Hah, N., Huang, L., et al. (2021). Microglia use TAM receptors to detect and engulf amyloid β plaques. *Nat. Immunol.* 22, 586–594. doi: 10.1038/s41590-021-00913-5.
- Jansen, I. E., Savage, J. E., Watanabe, K., Bryois, J., Williams, D. M., Steinberg, S., et al. (2019). Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat. Genet.* 51, 404–413. doi: 10.1038/s41588-018-0311-9.
- Jay, T. R., Hirsch, A. M., Broihier, M. L., Miller, C. M., Neilson, L. E., Ransohoff, R. M., et al. (2017). Disease Progression-Dependent Effects of TREM2 Deficiency in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 637–647. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2110-16.2016.
- Jay, T. R., Miller, C. M., Cheng, P. J., Graham, L. C., Bemiller, S., Broihier, M. L., et al. (2015). TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J. Exp. Med.* 212, 287–295. doi: 10.1084/jem.20142322.
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. V., Snaedal, J., et al. (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 107–116. doi: 10.1056/NEJMoa1211103.
- Kam, T.-I., Song, S., Gwon, Y., Park, H., Yan, J.-J., Im, I., et al. (2013). Fc γ R1b mediates amyloid- β neurotoxicity and memory impairment in Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* 123, 2791–2802. doi: 10.1172/JCI66827.
- Kleinberger, G., Yamanishi, Y., Suarez-Calvet, M., Czirr, E., Lohmann, E., Cuyvers, E., et al. (2014). TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Sci. Transl. Med.* 6, 243ra86–243ra86. doi: 10.1126/scitranslmed.3009093.
- Kober, D. L., Stuchell-Brereton, M. D., Kluender, C. E., Dean, H. B., Strickland, M. R., Steinberg, D. F., et al.

- (2020). Functional insights from biophysical study of TREM2 interactions with ApoE and A β 1-42. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.*, 10.1002/alz.12194. doi: 10.1002/alz.12194.
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., and Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. J.* 437, 169–183. doi: 10.1042/BJ20110301.
- Koffie, R. M., Meyer-Luehmann, M., Hashimoto, T., Adams, K. W., Mielke, M. L., Garcia-Alloza, M., et al. (2009). Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4012–4017. doi: 10.1073/pnas.0811698106.
- Lambrecht, B. N., Vanderkerken, M., and Hammad, H. (2018). The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 745–758. doi: 10.1038/s41577-018-0068-5.
- Lange, C., Storkebaum, E., de Almodóvar, C. R., Dewerchin, M., and Carmeliet, P. (2016). Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 12, 439–454. doi: 10.1038/nrneurol.2016.88.
- Lessard, C. B., Malnik, S. L., Zhou, Y., Ladd, T. B., Cruz, P. E., Ran, Y., et al. (2018). High-affinity interactions and signal transduction between A β oligomers and TREM2. *EMBO Mol. Med.* 10. doi: 10.15252/emmm.201809027.
- Liang, C.-S., Tsai, C.-L., Lin, G.-Y., Lee, J.-T., Lin, Y.-K., Chu, C.-S., et al. (2021). Better Identification of Cognitive Decline With Interleukin-2 Than With Amyloid and Tau Protein Biomarkers in Amnesic Mild Cognitive Impairment. *Front. Aging Neurosci.* 13, 670115. doi: 10.3389/fnagi.2021.670115.
- Mandrekar, S., Jiang, Q., Lee, C. Y. D., Koenigsknecht-Talboo, J., Holtzman, D. M., and Landreth, G. E. (2009). Microglia Mediate the Clearance of Soluble A β through Fluid Phase Macropinocytosis. *J. Neurosci.* 29, 4252–4262. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5572-08.2009.
- Martin, L., Bouvet, P., Chounlamountri, N., Watrin, C., Besançon, R., Pinatel, D., et al. (2021). VEGF counteracts amyloid- β -induced synaptic dysfunction. *Cell Rep.* 35, 109121. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109121.
- Mateo, I., Llorca, J., Infante, J., Rodríguez-Rodríguez, E., Fernández-Viadero, C., Peña, N., et al. (2007). Low serum VEGF levels are associated with Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 116, 56–58. doi: 10.1111/j.1600-0404.2006.00775.x.
- Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., et al. (2010). Decreased Clearance of CNS Amyloid- β in Alzheimer's Disease. *Science* 330, 1774. doi: 10.1126/science.1197623.
- Mazaheri, F., Snaidero, N., Kleinberger, G., Madore, C., Daria, A., Werner, G., et al. (2017). TREM2 deficiency impairs chemotaxis and microglial responses to neuronal injury. *EMBO Rep.* 18, 1186–1198. doi: 10.15252/embr.201743922.
- Mehta, V., Fields, L., Evans, I. M., Yamaji, M., Pellet-Many, C., Jones, T., et al. (2018). VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Induces NRP1 (Neuropilin-1) Cleavage via ADAMs (a Disintegrin and Metalloproteinase) 9 and 10 to Generate Novel Carboxy-Terminal NRP1 Fragments That Regulate Angiogenic Signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 1845–1858. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311118.
- Miners, J. S., Palmer, J. C., and Love, S. (2016). Pathophysiology of Hypoperfusion of the Precuneus in Early Alzheimer's Disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 26, 533–541. doi: 10.1111/bpa.12331.
- Ogura, S., Kurata, K., Hattori, Y., Takase, H., Ishiguro-Oonuma, T., Hwang, Y., et al. (2017). Sustained inflammation after pericyte depletion induces irreversible blood-retina barrier breakdown. *JCI Insight* 2, e90905. doi: 10.1172/jci.insight.90905.
- Parbo, P., Ismail, R., Hansen, K. V., Amidi, A., Mårup, F. H., Gottrup, H., et al. (2017).

- Brain inflammation accompanies amyloid in the majority of mild cognitive impairment cases due to Alzheimer's disease. *Brain* 140, 2002–2011. doi: 10.1093/brain/awx120.
- Portugal, C. C., Almeida, T. O., Socodato, R., and Relvas, J. B. (2022). Src family kinases (SFKs): critical regulators of microglial homeostatic functions and neurodegeneration in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *FEBS J.* 289, 7760–7775. doi: 10.1111/febs.16197.
- Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S. A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., et al. (2006). A β 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* 7, 940–946. doi: 10.1038/sj.embor.7400784.
- Reiss, K., and Bhakdi, S. (2017). The plasma membrane: Penultimate regulator of ADAM sheddase function. 6.
- Religa, P., Cao, R., Religa, D., Xue, Y., Bogdanovic, N., Westaway, D., et al. (2013). VEGF significantly restores impaired memory behavior in Alzheimer's mice by improvement of vascular survival. *Sci. Rep.* 3. doi: 10.1038/srep02053.
- Ryu, J. K., Cho, T., Choi, H. B., Wang, Y. T., and McLarnon, J. G. (2009). Microglial VEGF Receptor Response Is an Integral Chemotactic Component in Alzheimer's Disease Pathology. *J. Neurosci.* 29, 3–13. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2888-08.2009.
- Schlepckow, K., Kleinberger, G., Fukumori, A., Feederle, R., Lichtenthaler, S. F., Steiner, H., et al. (2017). An Alzheimer-associated TREM2 variant occurs at the ADAM cleavage site and affects shedding and phagocytic function. *EMBO Mol. Med.* 9, 1356–1365. doi: 10.15252/emmm.201707672.
- Schlepckow, K., Monroe, K. M., Kleinberger, G., Cantuti-Castelvetri, L., Parhizkar, S., Xia, D., et al. (2020). Enhancing protective microglial activities with a dual function TREM 2 antibody to the stalk region. *EMBO Mol. Med.* doi: 10.15252/emmm.201911227.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., and Hyman, B. T. (2011). Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a006189. doi: 10.1101/cshperspect.a006189.
- Shibuya, M. (2006). Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis* 9, 225–230; discussion 231. doi: 10.1007/s10456-006-9055-8.
- Simons, M., Gordon, E., and Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 611–625. doi: 10.1038/nrm.2016.87.
- Sosna, J., Philipp, S., Albay, R., Reyes-Ruiz, J. M., Baglietto-Vargas, D., LaFerla, F. M., et al. (2018). Early long-term administration of the CSF1R inhibitor PLX3397 ablates microglia and reduces accumulation of intraneuronal amyloid, neuritic plaque deposition and pre-fibrillar oligomers in 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 13, 11. doi: 10.1186/s13024-018-0244-x.
- Spangenberg, E. E., Lee, R. J., Najafi, A. R., Rice, R. A., Elmore, M. R. P., Blurton-Jones, M., et al. (2016). Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- β pathology. *Brain J. Neurol.* 139, 1265–1281. doi: 10.1093/brain/aww016.
- Spangenberg, E., Severson, P. L., Hohsfield, L. A., Crapser, J., Zhang, J., Burton, E. A., et al. (2019). Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nat. Commun.* 10, 3758. doi: 10.1038/s41467-019-11674-z.
- Spuch, C., Antequera, D., Portero, A., Orive, G., Hernández, R. M., Molina, J. A., et al. (2010). The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biomaterials* 31, 5608–5618. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.042.
- Suárez-Calvet, M., Morenas-Rodríguez, E., Kleinberger, G., Schlepckow, K.,

- Caballero, M. Á. A., Franzmeier, N., et al. (2019). Early increase of CSF sTREM2 in Alzheimer's disease is associated with tau related-neurodegeneration but not with amyloid- β pathology. *Mol. Neurodegener.* 14. doi: 10.1186/s13024-018-0301-5.
- Tarasoff-Conway, J. M., Carare, R. O., Osorio, R. S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., et al. (2015). Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 457–470. doi: 10.1038/nrneurol.2015.119.
- Thomas, T., Miners, S., and Love, S. (2015). Post-mortem assessment of hypoperfusion of cerebral cortex in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Brain* 138, 1059–1069. doi: 10.1093/brain/awv025.
- Thornton, P., Sevalle, J., Deery, M. J., Fraser, G., Zhou, Y., Ståhl, S., et al. (2017). TREM2 shedding by cleavage at the H157-S158 bond is accelerated for the Alzheimer's disease-associated H157Y variant. *EMBO Mol. Med.* 9, 1366–1378. doi: 10.15252/emmm.201707673.
- Tousseyn, T., Thathiah, A., Jorissen, E., Raemaekers, T., Konietzko, U., Reiss, K., et al. (2009). ADAM10, the Rate-limiting Protease of Regulated Intramembrane Proteolysis of Notch and Other Proteins, Is Processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the γ -Secretase. *J. Biol. Chem.* 284, 11738–11747. doi: 10.1074/jbc.M805894200.
- Tubi, M. A., Kothapalli, D., Hapenny, M., Feingold, F. W., Mack, W. J., King, K. S., et al. (2021). Regional relationships between CSF VEGF levels and Alzheimer's disease brain biomarkers and cognition. *Neurobiol. Aging* 105, 241–251. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2021.04.025.
- Ulrich, J. D., Finn, M. B., Wang, Y., Shen, A., Mahan, T. E., Jiang, H., et al. (2014). Altered microglial response to A β plaques in APPS1-21 mice heterozygous for TREM2. *Mol. Neurodegener.* 9, 20. doi: 10.1186/1750-1326-9-20.
- Verghese, P. B., Castellano, J. M., Garai, K., Wang, Y., Jiang, H., Shah, A., et al. (2013). ApoE influences amyloid- β (A β) clearance despite minimal apoE/A β association in physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E1807–E1816. doi: 10.1073/pnas.1220484110.
- Vilalta, A., Zhou, Y., Sevalle, J., Griffin, J. K., Satoh, K., Allendorf, D. H., et al. (2021). Wild-type sTREM2 blocks A β aggregation and neurotoxicity, but the Alzheimer's R47H mutant increases A β aggregation. *J. Biol. Chem.*, 100631. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100631.
- Wang, Y., Cella, M., Mallinson, K., Ulrich, J. D., Young, K. L., Robinette, M. L., et al. (2015). TREM2 lipid sensing sustains microglia response in an Alzheimer's disease model. *Cell* 160, 1061–1071. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.049.
- Wang, Y., Ulland, T. K., Ulrich, J. D., Song, W., Tzaferis, J. A., Hole, J. T., et al. (2016). TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J. Exp. Med.* 213, 667–675. doi: 10.1084/jem.20151948.
- Wilcock, D. M., Rojiani, A., Rosenthal, A., Levkowitz, G., Subbarao, S., Alamed, J., et al. (2004). Passive Amyloid Immunotherapy Clears Amyloid and Transiently Activates Microglia in a Transgenic Mouse Model of Amyloid Deposition. *J. Neurosci.* 24, 6144–6151. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1090-04.2004.
- Xiang, X., Werner, G., Bohrmann, B., Liesz, A., Mazaheri, F., Capell, A., et al. (2016). TREM2 deficiency reduces the efficacy of immunotherapeutic amyloid clearance. *EMBO Mol. Med.* 8, 992–1004. doi: 10.15252/emmm.201606370.
- Xu, Z., Han, K., Chen, J., Wang, C., Dong, Y., Yu, M., et al. (2017). Vascular endothelial growth factor is neuroprotective against ischemic brain injury by inhibiting scavenger receptor A expression on microglia. *J. Neurochem.* 142, 700–709. doi: 10.1111/jnc.14108.
- Yan, P., Bero, A. W., Cirrito, J. R., Xiao, Q., Hu, X., Wang, Y., et al. (2009).

- Characterizing the appearance and growth of amyloid plaques in APP/PS1 mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 10706–10714. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2637-09.2009.
- Yang, J., Fu, Z., Zhang, X., Xiong, M., Meng, L., and Zhang, Z. (2020). TREM2 ectodomain and its soluble form in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 17, 204. doi: 10.1186/s12974-020-01878-2.
- Yang, S.-P., Bae, D.-G., Kang, H. J., Gwag, B. J., Gho, Y. S., and Chae, C.-B. (2004). Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with β -amyloid in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 25, 283–290. doi: 10.1016/S0197-4580(03)00111-8.
- Yu, Y., and Ye, R. D. (2015). Microglial A β Receptors in Alzheimer's Disease. *Cell. Mol. Neurobiol.* 35, 71–83. doi: 10.1007/s10571-014-0101-6.
- Zhao, Y., Wu, X., Li, X., Jiang, L.-L., Gui, X., Liu, Y., et al. (2018). TREM2 Is a Receptor for β -Amyloid that Mediates Microglial Function. *Neuron* 97, 1023-1031.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.031.
- Zhong, L., Xu, Y., Zhuo, R., Wang, T., Wang, K., Huang, R., et al. (2019). Soluble TREM2 ameliorates pathological phenotypes by modulating microglial functions in an Alzheimer's disease model. *Nat. Commun.* 10, 1365. doi: 10.1038/s41467-019-09118-9.

VI. Figures and legends

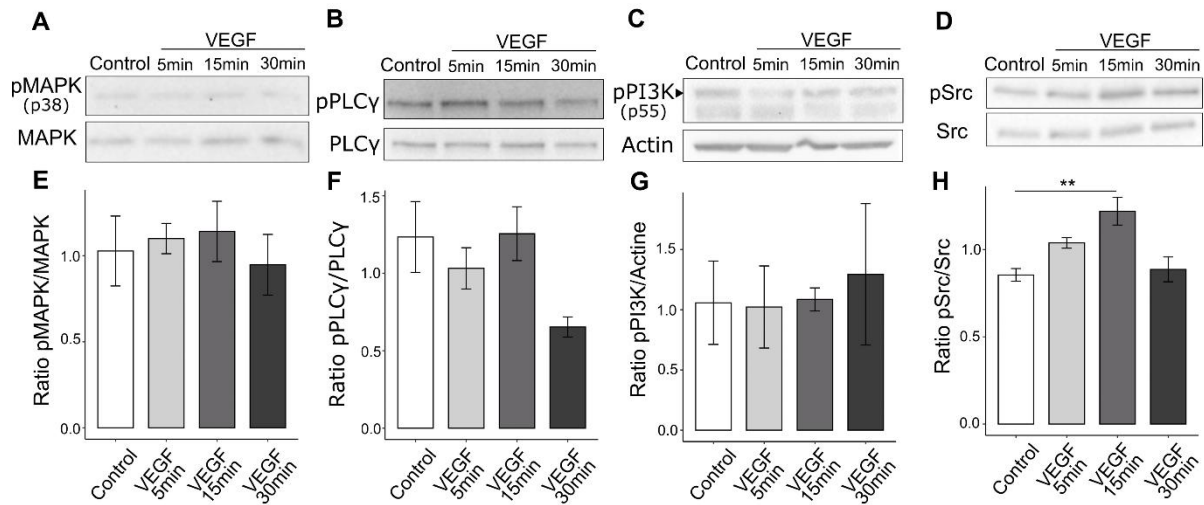


Figure 1- VEGF activates SFK pathway in microglial cells

N9 microglial cells were treated with 50 ng/ml of VEGF (gray shades) for 5, 15 or 30 minutes, or not treated (control, white), prior to cell lysis and western blotting analysis of signaling pathway activation. **(A-D)** Representative immunoblots of N9 cell lysates using antibodies against specific phosphorylated residues or total proteins for MAPK-p38 pathway (phosphoMAPK T180/182, MAPK-p38 total), PLC γ (phosphoPLC γ Y783, total PLC γ), PI3K-p55 pathway (phosphoPI3K Y199, β -Actine) and Src pathway (phosphoSrc Y416 and total Src). Arrow points to the p55 specific band **(C)**. **(E-H)** Expression ratios between phosphorylated and total proteins **(E,F,H)** or actin **(G)** show that VEGF increased SFK activation **(H, one-way ANOVA, $p=0.0015$, post-hoc $**p<0.01$, $n=5$)**, but did not change MAPK-p38 activation **(E, one-way ANOVA, $p=0.8517$, $n=5$)**, PLC γ activation **(F, one-way ANOVA: $p=0.0621$, $n=5$)**, nor PI3K-p55 regulatory subunit phosphorylation **(G, Kruskal-Wallis: $p=0.9506$, $n=5$)**.

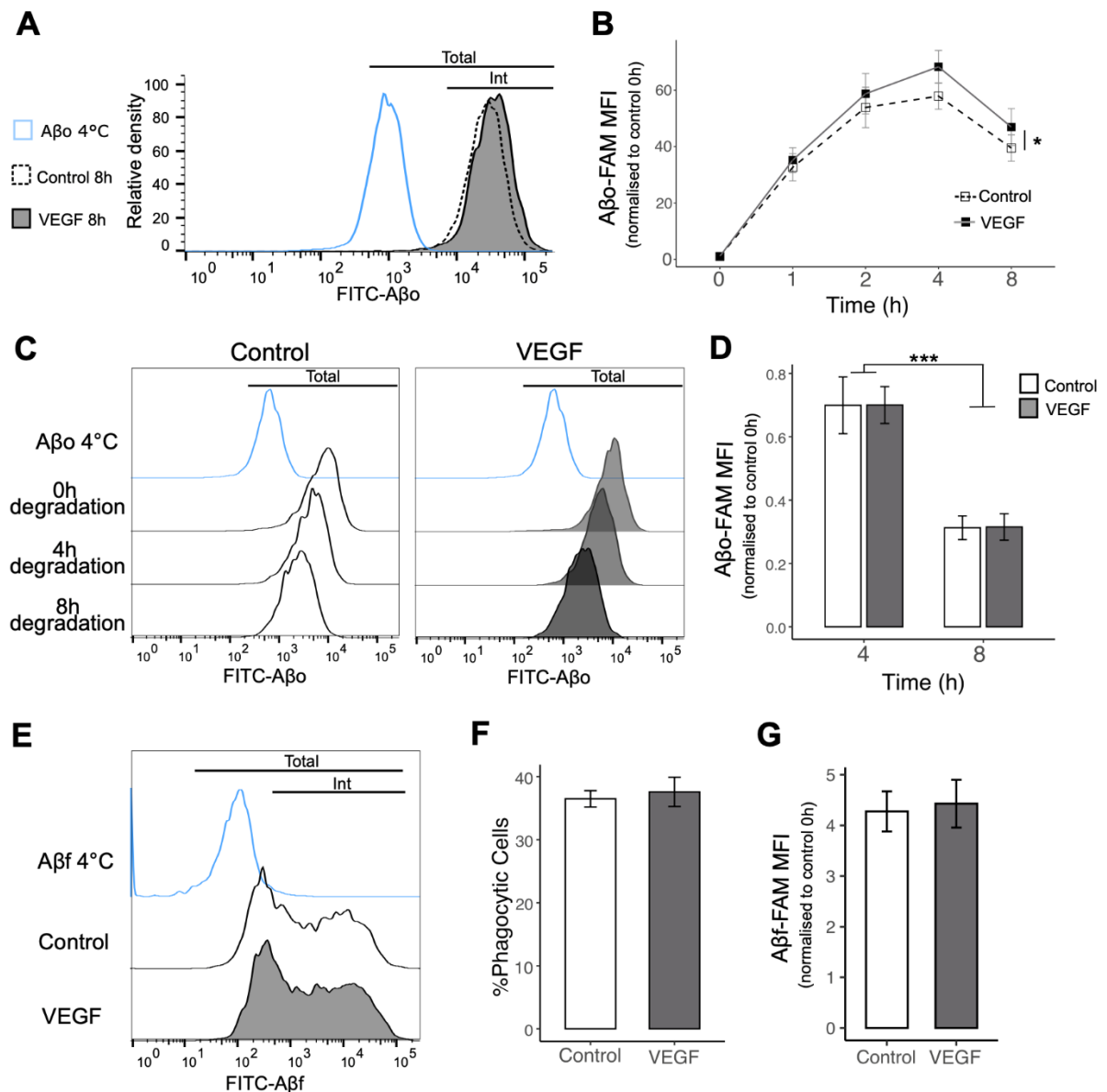


Figure 2 - VEGF increases microglial phagocytosis of A β o but not A β f

The phagocytic uptake of A β o-FAM or A β f-FAM was measured in microglial N9 cells pre-treated or not with VEGF (50 ng/ml) for 5 min prior to A β o-FAM application, and quantified by flow cytometry analysis. **(A)** Representative histogram of A β o-FAM FITC measurement in N9 cells in control condition (white, dashed line) or with VEGF (gray) treatment, after 8h of phagocytosis. The A β -4 $^{\circ}$ C condition (blue) showed a moderate cell surface binding of A β o in absence of phagocytosis and allowed to determine the FITC threshold for internalised (Int) vs total A β o amount (cell surface and internalised). **(B)** Changes in FITC fluorescence over time expressed as the normalized Mean Fluorescence Intensity (MFI) to 0h illustrating kinetics of A β o-FAM phagocytosis in control condition (white, dashed) or with VEGF (black) treatment. VEGF induced a time-dependent shift toward higher MFI values, reflecting an increase in A β o phagocytosis (linear mixed-effect model, Control-VEGF * p <0.05; 1h-2h and 1h-4h *** p <0.001,

n=8). **(C)** Changes in FITC fluorescence over time showing A β -FAM degradation for control (left, white) or VEGF (right, gray) treatment after 1h of internalisation and complete removal of the medium. Intracellular A β degradation was followed for 4 and 8h. **(D)** Quantitative analysis showing a significant reduction of normalized A β -FAM MFI after 8h compared to 4h in control and VEGF-treated conditions, indicating time-dependent degradation of internalised A β -FAM. VEGF did not change the degradation kinetics compared to control (two-way ANOVA, Control-VEGF n.s; time ***p<0.001, n=4). **(E)** Representative histograms displaying A β -FAM FITC measurements after 4h of phagocytosis in control (white) or VEGF (gray) treated condition. **(F)** Percentage of A β phagocytic microglia with or without VEGF treatment (Wilcoxon test n.s, n=6). **(G)** Quantification of internalised A β -FAM MFI, with or without VEGF treatment (Wilcoxon test n.s, n=6).

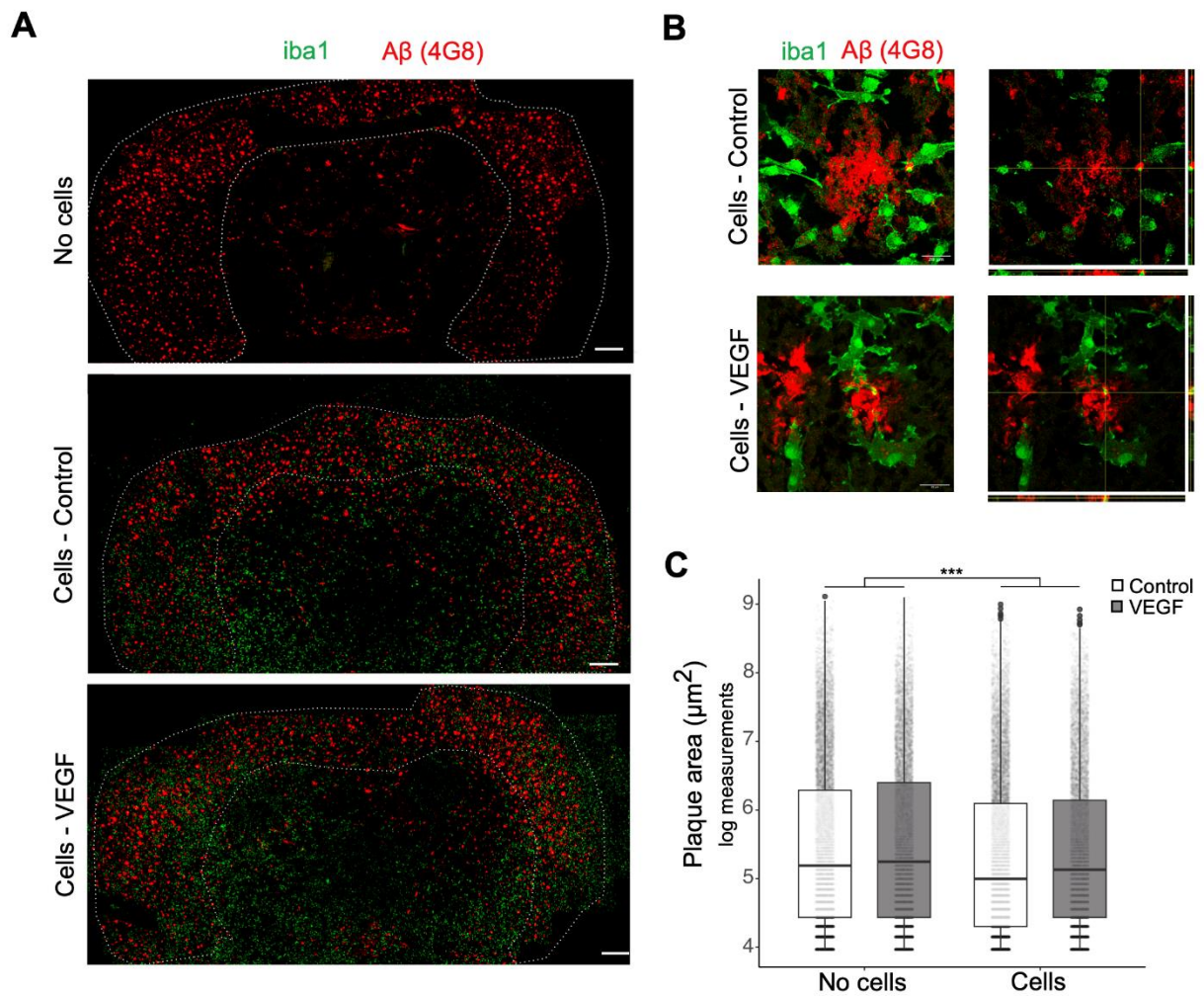


Figure 3 - VEGF doesn't change amyloid plaque clearance *ex vivo*

(A) Representative immunofluorescent staining of APP/PS1 brain sections treated with or without VEGF and replenished (cells) or not (no cells) with primary microglial cells. Mouse microglial cells were cultured on unfixed cryostat brain sections from 14-month-old APP/PS1 mice, with or without VEGF treatment (50 ng/ml) for four days. Sections were fixed and immunostained for microglia (iba1, green) and A β -plaques (4G8 antibody, red), and white dashed-lines delineate the cortex. Scale bar, 500 μm . **(B)** 3D confocal images of control or VEGF replenished APP/PS1 brain sections showing that primary microglia are localized around A β -plaques (z-stack, left panels), with processes in the same focal plane (right panel, orthogonal view). Yellow puncta depict A β internalized by microglia, as indicated by crossing white lines in the orthogonal view. Scale bar, 20 μm . **(C)** Quantitative comparison of cortical amyloid plaque area in control or VEGF-treated APP/PS1 brain sections, replenished or not with microglia. Data were transformed with natural logarithm and each dot corresponds to a plaque with boxplot representing median and quartiles (linear mixed-effect model, cells *** $p < 2.10^{-16}$, condition (Control/VEGF) n.s, condition*cells n.s, $n = 5$ slices).

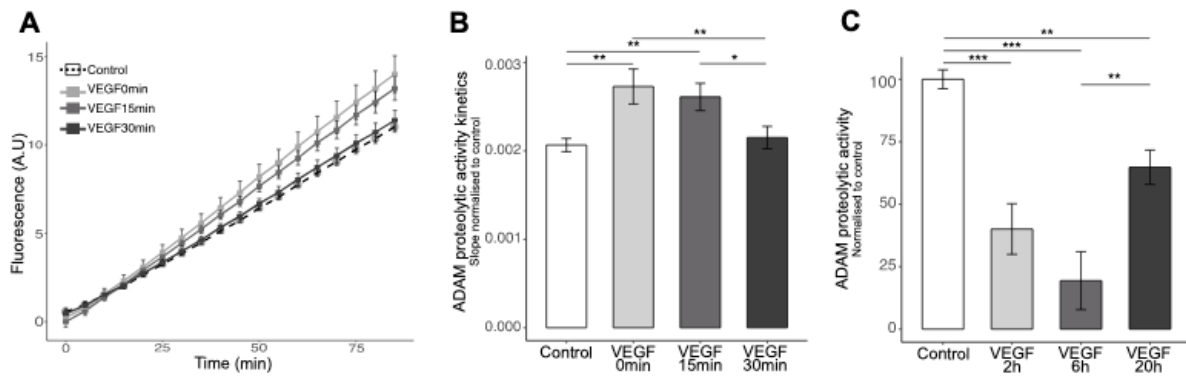


Figure 4 – Acute VEGF treatment increases microglial cell surface protease activity of ADAM10 and ADAM17

(A) Kinetics of cell surface protease activity of microglial ADAM10 and ADAM17 expressed as Relative Fluorescence Unit (RFU) per minute was assessed by incubating control or VEGF-treated N9 microglia with a soluble fluorogenic peptide substrate. N9 cells were pre-treated or not with VEGF (50 ng/ml) for 15 or 30 min prior to peptide substrate addition, or with concomitant application. Fluorescence of cleaved substrate was monitored for 90 minutes at 320 nm excitation and 390 nm emission. **(B)** Quantitative comparison from normalized slope kinetics curves shown in **(A)** indicates that VEGF triggers a time-dependent increase in ADAM proteolytic activity, only significant for acute VEGF pre-treatments (Kruskal-Wallis $p=0.0014$, Dunn post hoc with Benjamini-Hochberg correction, $*p<0.05$ and $**p<0.01$, $n=15$). **(C)** Quantitative analysis shows that longer VEGF pre-treatment duration, ranging from 2 to 6 and 20h, induces a significant reduction in cell surface protease activity of ADAM10/17, maximal after 6 hours (Kruskal-Wallis $p=6.33 \times 10^{-7}$, Dunn post hoc with Benjamini-Hochberg correction, $**p<0.01$ and $***p<0.001$, $n=15$).

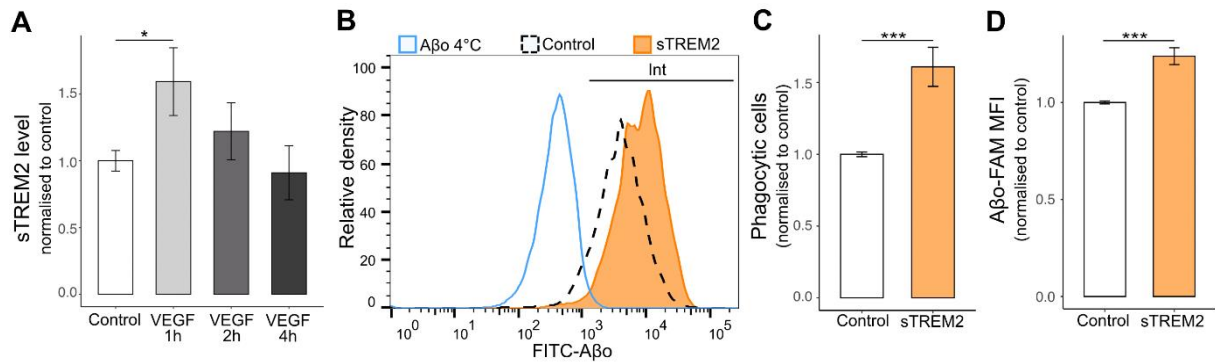


Figure 5 - VEGF promotes microglial TREM2 shedding with sTREM2 release, and sTREM2 increases Aβo phagocytosis

(A) Microglial TREM2 ectodomain shedding was assessed by measuring sTREM2 level released in the culture medium by N9 cells in control condition (white) or treated with 50 ng/ml VEGF (gray) for 1 to 4h. Quantitative comparison using an ELISA assay revealed that short VEGF treatment for 1h increased TREM2 shedding and sTREM2 release (linear mixed-effect model, control-VEGF1h * $p < 0.05$, $n = 7$). **(B)** Representative histogram of Aβo-FAM FITC measurements in N9 cells in control condition (white, dashed line) or pre-treated with 20 nM of sTREM2 (orange) for 5 min prior to Aβo-FAM application for 4 h. The Aβ-4°C condition (blue) allowed to determine the FITC threshold for internalised (Int) Aβo. Note the clear shift in FITC fluorescence in sTREM2-treated cells reflecting an increase in Aβo-FAM uptake. **(C)** Proportion of Aβo phagocytic microglia normalised to control, with or without sTREM2 treatment, showing that sTREM2 stimulates N9 cell phagocytosis (Wilcoxon test, *** $p < 0.001$, $n = 8$). **(D)** Quantification of internalised Aβf-FAM MFI normalised to control shows that sTREM2 treatment induces Aβf-FAM uptake (Wilcoxon test, *** $p < 0.001$, $n = 8$).

VII. Supplemental material

1. Western blotting of membrane protein expression

N9 microglia were serum-deprived overnight prior to treatments and HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) were cultured in wells coated with collagen I, in a medium composed of MV2 heparin-free and 1% P-S. After a quick DPBS wash, cells were incubated 10 min with lysis buffer (25 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.50% DOC, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.10% SDS, pH 7), supplemented with 2% protease inhibitor and 2% phosphatase inhibitor cocktails with 2% orthovanadate, and 0.02% Benzomase was also added for HUVEC. Cells were then scraped and collected, lysates were kept 10 min on ice prior to a centrifugation step at 10,000 g, 4°C for 10 min. Supernatants were kept at -20°C until use.

Denatured samples (30 µg of proteins) were separated using 4-12% SDS-PAGE gels, and then transferred on nitrocellulose membranes. Membrane saturation, antibody incubation and revelation were similar to the protocol described in the main material section. The primary antibodies used here are: VEGFR1 (Abcam-32152, 1/2000), VEGFR2 (Cell Signaling Technology-2479, 1/500), ADAM10 (Abcam 1997, 1/1000), ADAM17 (Sigma SAB3500367, 1/2000) and TREM2 (ThermoFisher AF1729, 1/500). Antibodies were revealed with goat anti-rabbit HRP-conjugated antibody (ThermoFisher A11034, 1/10000) or donkey anti-sheep (ThermoFisher A16041, 1/5000) HRP-conjugated antibody.

2. Phagocytosis immunofluorescence assay

Phagocytosis assay was performed to determine ability and kinetics of A β uptake by N9 microglia. Biotinylated-A β (1-42) was reconstituted as previously described (Martin et al., 2021) and aggregated at 15 µM for 2 hours at 37°C to form oligomers. N9 cells were plated in serum-free medium (60,000 cells/cm²) and treated with 1 µM of biotinylated-A β for 0 to 8 hours of phagocytosis. Cells were then quickly washed with DPBS and fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1M PB at RT for 15 min. For immunostaining, a permeabilizing step was performed in PBS-0,3%Triton-1%BSA and anti-iba1 (Wako 19741, 1/500) antibody was incubated overnight. Secondary anti-rabbit-Alexa 647 antibody was applied (ThermoFisher A21244, 1/300), with streptavidin-488 (ThermoFisher S11223, 1/500) and phalloidin-Alexa 555 (1/500, ThermoFisher 34055), prior to DAPI (1 µg/ml) counterstaining. 3D Images were acquired with a Zeiss-880 confocal microscope and deconvolved with Huygens Professional software (CIQLE platform, Lyon).

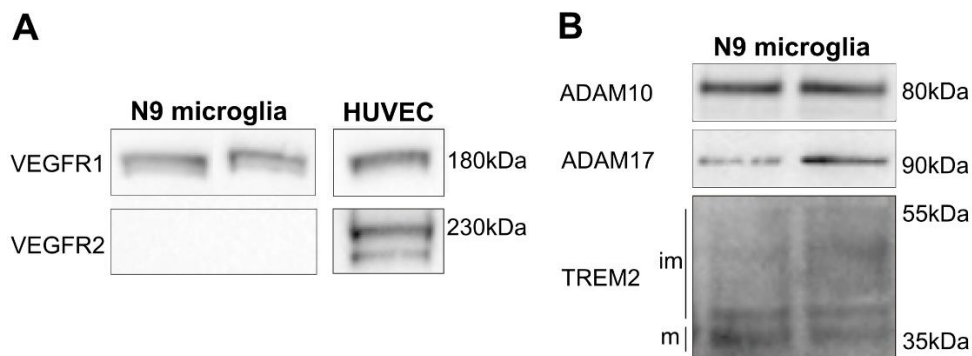
3. Validation of the *ex vivo* phagocytosis assay

Prior to the quantitative plaque analysis shown in Figure 3, we first validated (1) the impact of primary microglia on plaque phagocytosis and (2) the influence of cell seeding and distribution variability on brain sections. All the analyses were performed only on the cortex.

The detection of A β plaque fluorescence intensity, number and area (>50 μm^2) was expressed as a ratio to the overall cortical area, allowing to illustrate the data as A β intensity, relative A β area (Area A β /Total Area) and mean plaque area.

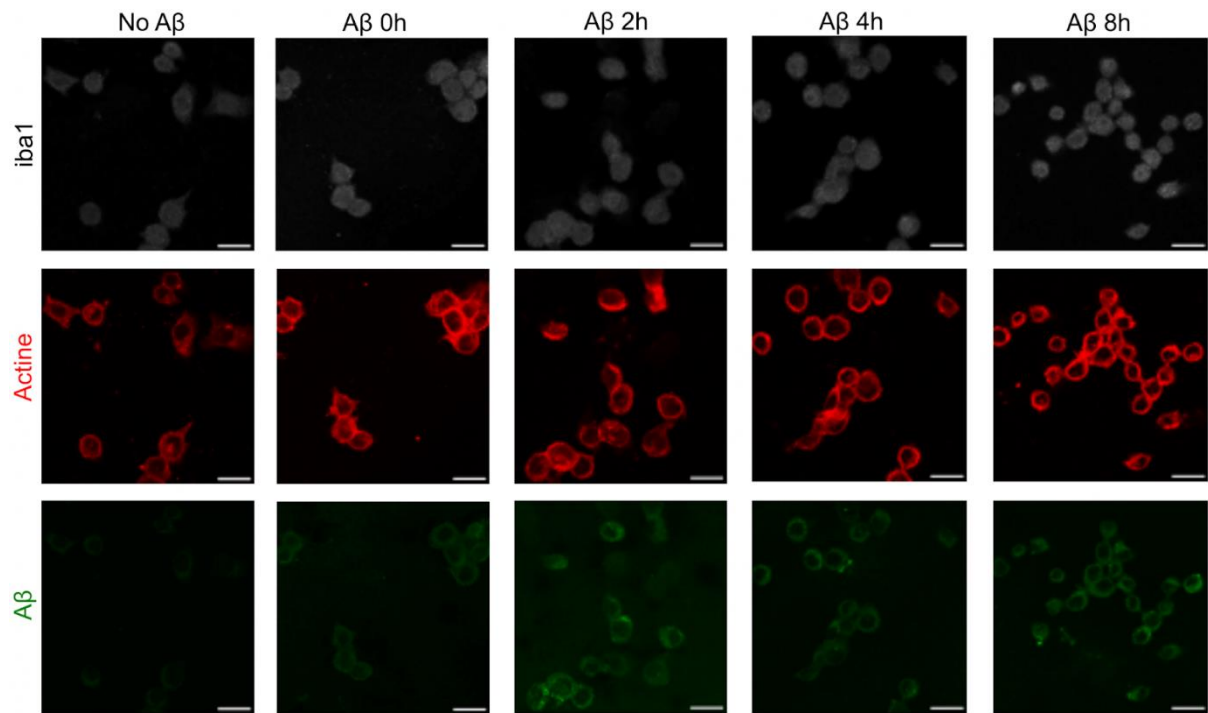
To check if microglia heterogeneous distribution on section could influence the data, a regional analysis was carried out on control slices only. Cortical region of interest (ROI) of 600 μm^2 were randomly selected and A β plaques as well as microglial surface were measured. Cortical ROIs placed at the same location between replenished and non-replenished sections were used to calculate the change in relative A β area. Three categories of microglial coverage (in μm^2) reflecting microglial density were defined per ROI, [1000; 30000[, [30000; 50000[and [50000; maximum [, and the relative A β area in each ROI was expressed as a function of cell density. A mixed model analysis was used with density categories as fixed effect and a random intercept for slice section and for ROI.

VIII. Supplemental figures



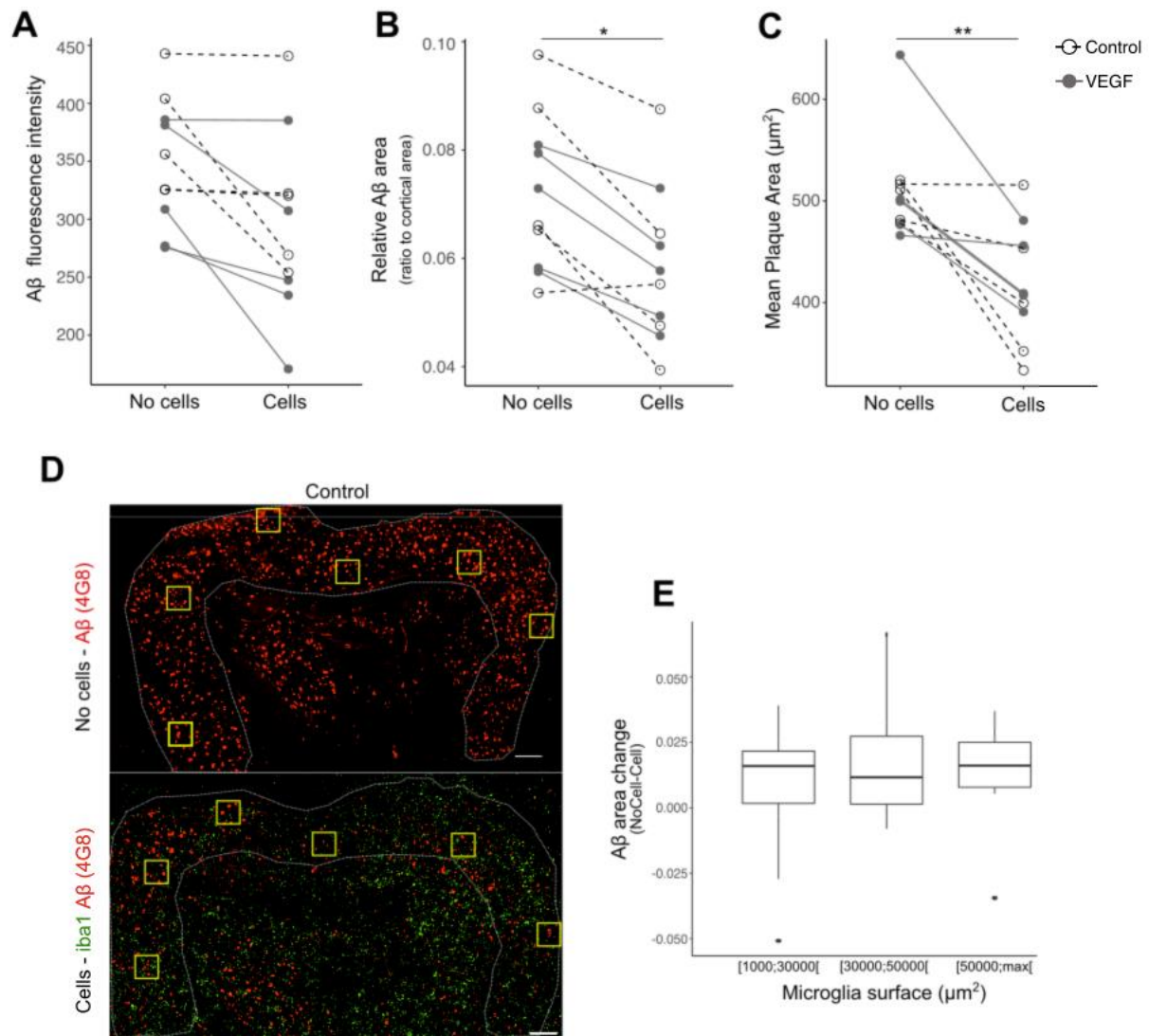
Supplemental Figure 1 - N9 microglia express VEGFR1, ADAM10 and ADAM17

(A) Representative immunoblot from N9 microglia and HUVEC lysates showing that microglia express only VEGFR1 and not VEGFR2, while endothelial cells express both receptors. **(B)** Immunoblot of N9 microglial cell lysate illustrating ADAM10, ADAM17 and TREM2 expression.



Supplemental Figure 2 – Phagocytic A β uptake by N9 microglia

Representative 3D confocal images of N9 microglia immunostainings showing biotinylated A β phagocytosis over time, up to 8 h. Intracellular microglial compartment was identified with iba1 (white) and Phalloidin-Actin (red) combined stainings and validated A β internalisation (green). Scale bar, 20 μ m.



Supplemental Figure 3 - Validation of the ex vivo model of Aβ plaque clearance

(A-C) Quantitative analysis of total cortical Aβ immunostaining in brain sections with or without primary microglia replenishment. Each point represents a brain section in control (dashed-lines) or VEGF (50 ng/ml, solid lines) treated condition. **(A)** Aβ mean fluorescence intensity was reduced in presence of primary microglial cells (Wilcoxon test, $p=0.05243$, $n=5$). **(B)** Note that the ratio of Aβ immunostaining area to the total cortical area is decreased in the presence of microglial cells (Wilcoxon test, $*p=0.0433$, $n=5$). **(C)** The mean Aβ plaque size is also decreased in the presence of cells (Wilcoxon test, $**p=0.0015$, $n=5$). **(D)** Region of interest (ROI) analysis used to assess the impact of microglial cell density on Aβ plaque size. Representative confocal images of Aβ (4G8, red) and microglia (iba1, green) immunostainings with ROI delineated by yellow squares. Cortical ROI were analysed at the same location on two consecutive brain sections, with or without primary microglia seeding, and microglial density as well as Aβ immunostaining areas were measured per ROI. **(E)** Quantitative

comparison of A β area changes between No cell and Cell ROI according to microglial density category. Cell density doesn't impact A β plaque size (linear mixed-effect model, density category, p=0.6314 (41 ROI, n=5 slices)).

Discussion

Le VEGF est associé à la MA car ses niveaux dans le LCR sont significativement plus faibles chez des patient.e.s atteints de la maladie que chez des individus contrôles (Guo et al., 2013; Provias and Jeynes, 2014; Leung et al., 2015). Or, chez des patient.e.s ayant des biomarqueurs de la MA, des taux élevés de VEGF dans le LCR sont associés à un déclin cognitif plus modéré, qui caractérise un ralentissement de la progression de la maladie (Hohman et al., 2015; Tubi et al., 2021). En condition physiologique, l'étude de modèles murins a montré un effet bénéfique du VEGF sur la transmission synaptique et la cognition (Licht et al., 2011; De Rossi et al., 2016). Parallèlement, un gain de fonction du VEGF dans des souris modèles de MA conduit à une amélioration de l'angiogenèse, une diminution de la charge amyloïde et une amélioration des fonctions cognitives (Spuch et al., 2010; Wang et al., 2011; Herrán et al., 2013; Garcia et al., 2014). Cependant, cet effet positif du VEGF dans la MA est limité par sa séquestration au niveau des plaques amyloïdes (Yang et al., 2004; Thomas et al., 2015; Martin et al., 2021).

Le VEGF interagit aussi avec les microglies, stimulant leur prolifération (Forstreuter et al., 2002; Kreisel et al., 2019), leur migration (Forstreuter et al., 2002) et leur phagocytose d'éléments inertes (Mosher et al., 2012). Dans le contexte de la MA, Ryu et al. ont mis en évidence son rôle dans la chimio attraction des microglies vers les plaques amyloïdes (Ryu et al., 2009). Les cellules microgliales s'organisent ensuite en barrière autour de ces plaques, visant ainsi à contenir et dégrader l'A β (Condello et al., 2015; Bouvier et al., 2016).

Jusqu'à présent, l'effet du VEGF sur la capacité des microglies à phagocyter et à dégrader l'A β n'a pas été caractérisé. Or ces deux protéines, l'A β comme le VEGF, sont présentes dans les plaques amyloïdes, où la réponse microgliale est cruciale pour contrôler la pathologie amyloïde.

Effet du VEGF sur la microglie

Mon premier objectif de thèse était donc de caractériser l'action du VEGF sur la microglie confrontée à la toxicité de l'A β . J'ai confirmé que les microglies expriment seulement le VEGFR1, mais pas le VEGFR2 (Forstreuter et al., 2002). Or, le VEGFR1 une fois activé par le VEGF, présente une activité tyrosine kinase nettement plus faible que celle de VEGFR2 (Huang et al., 2001). A ma connaissance, une seule étude a analysé les voies de signalisation en aval du VEGFR1 dans les microglies, et n'a observé aucune variation de l'activation des voies MAP kinases, p38 et ERK1/2, ni de la voie AKT (Forstreuter et al., 2002). La majorité

des études sur la signalisation VEGF/VEGFR1 a été réalisée sur des cellules exprimant les deux types de récepteurs au VEGF (VEGFR1 et VEGFR2), avec la mise en jeu des voies PI3K, PLC γ , protéine kinase C (PKC), MAPK ou SRC, (Sawano et al., 1997; Huang et al., 2001; Lesslie et al., 2006). Cependant, le VEGF est capable d'induire la migration de monocytes n'exprimant que le VEGFR1, via l'activation des voies PI3-kinase, p38, AKT et ERK1/2 (Tchaikovski et al., 2008). Une approche computationnelle a modélisé la signalisation du VEGFR1 dans les macrophages, et a prédit une activation préférentielle des voies PLC γ , PI3K et SRC (Weddell et al., 2017). C'est en considérant l'ensemble de ces résultats que nous nous sommes focalisés sur l'activation par le VEGF des voies Plc γ , Pi3k, p38 Mapk et Src dans les microglies. Seule la voie Src a été activée par une stimulation de 15 minutes au VEGF. Or cette voie est connue pour être mise en jeu dans la réactivité microgliale, la production de molécules inflammatoires, mais aussi dans la phagocytose d'éléments inertes ou de protéines toxiques comme l'A β (Socodato et al., 2015; Cai et al., 2021; Ding et al., 2022). L'effet de SRC sur la phagocytose de l'A β par les microglies est potentiellement dû à sa capacité de phosphorylation de différents motifs ITAM, présents au niveau des récepteurs Fc γ ou de DAP12, qui induisent alors l'activation de la voie SYK (El-Hillal et al., 1997; Zou et al., 2008; Lowell, 2011).

Nous avons donc caractérisé la capacité de phagocytose microgliale des A β ₀ (oligomères et protofibrilles solubles) et de l'A β _f *in vitro*, et montré une augmentation spécifique de la phagocytose des A β ₀ après un traitement au VEGF. Les A β ₀ étant considérés comme la forme la plus toxique d'A β dans la MA (Shankar et al., 2008; Koffie et al., 2009; Hong et al., 2018), ce résultat souligne l'impact bénéfique du VEGF dans leur élimination et le contrôle de la pathologie amyloïde. De plus, l'absence d'effet du VEGF sur la phagocytose des A β _f suggère la mise en jeu d'acteurs spécifiques de l'internalisation des oligomères.

Dans la MA, les formes solubles et insolubles d'A β cohabitent dans le parenchyme et s'organisent dans le microenvironnement des plaques amyloïdes. Celles-ci ont des morphologies variées, mais présentent fréquemment un cœur dense d'A β fibrillaire, entouré d'une couronne d'oligomères (Röhr et al., 2020). Afin de caractériser l'effet du VEGF en présence de plaques amyloïdes, nous avons réalisé un essai *ex vivo*, de repeuplement en microglies de coupes de cerveaux de souris APP/PS1 âgées de 12 mois, présentant de nombreuses plaques. Ce modèle a été développé par Bard et al., proposant ainsi une méthode de caractérisation de la réponse microgliale à l'A β naturel, avec lequel il est facile d'effectuer des traitements et d'avoir un suivi (Bard et al., 2000). Cette technique a ensuite été employée et optimisée par d'autres groupes, démontrant notamment la nécessité d'opsoniser les coupes de cerveau, une étape consistant à recouvrir les plaques amyloïdes d'anticorps anti-A β , pour y favoriser le recrutement des microglies (Xiang et al., 2016; Colombo et al., 2021). Nous

avons pu observer qu'un traitement long au VEGF (4 jours) des microglies primaires ajoutées aux coupes, ne changeait pas leur capacité de clairance des plaques amyloïdes. Ce résultat indique que la phagocytose des plaques amyloïdes, comme celle de l'A β fibrillaire *in vitro*, n'est pas influencée par le VEGF.

Une particularité de cet essai est la nécessité d'opsoniser les plaques pour favoriser leur reconnaissance par les cellules microgliales. Or, ces anticorps sont reconnus par les récepteurs Fc (Fc γ RI, Fc γ RII) des microglies et entraînent une phagocytose par des voies d'activation spécifiques des complexes antigènes-anticorps, qui sont inhabituelles dans la MA (Bard et al., 2000; Xiang et al., 2016). Ces récepteurs sont notamment mis à contribution dans les essais d'immunothérapie passive anti-A β , où les anticorps ciblent la protéine amyloïde et stimulent les Fc γ R et la phagocytose des complexes Anticorps-A β (Katsinelos et al., 2019; Illouz et al., 2021). Bien que ces récepteurs puissent être activés par la voie SRC-SYK (El-Hillal et al., 1997), l'absence d'effet du VEGF semble indiquer que la voie des Fc γ R n'est pas modulée par ce facteur. Il est important de préciser qu'il ne s'agit pas là de l'unique voie mise en jeu dans le modèle *ex vivo*. En effet, Xiang et al. ont observé que des microglies primaires déficientes en Trem2 perdent environ 25% de leur capacité de clairance des plaques, tandis que les 75% restants peuvent être réalisés via de nombreux récepteurs dont les FcR (Xiang et al., 2016). Enfin, l'activation des Fc γ R par l'opsonisation pourrait être responsable d'une augmentation de la production de la forme soluble de VEGFR1, sVEGFR1, comme cela a été observé dans des monocytes circulants stimulés avec des IgG (Justiniano et al., 2013). Sachant que le sVEGFR1 est considéré comme un leurre et un antagoniste de la voie du VEGF (Kendall and Thomas, 1993; Licht et al., 2011), l'effet du VEGF sur la phagocytose microgliale dans l'essai *ex vivo* pourrait être contrebalancé par une libération de sVEGFR1 médiée par les récepteurs Fc γ .

Les microglies sont capables d'internaliser l'A β situé au niveau des plaques dans différents modèles expérimentaux, mais sa dégradation est lente et l'A β s'accumule dans les lysosomes (Baik et al., 2016). Les cellules vont alors compacter et relarguer l'A β dès le 2^{ème} jour à proximité des plaques. Ainsi, l'A β situé en périphérie des plaques, qui contient les formes les plus solubles, se retrouve compacté en fibrilles. Ce processus est donc potentiellement bénéfique car il diminue la quantité d'A β soluble et limite la fixation de nouveaux oligomères d'A β aux plaques (Condello et al., 2015). Cette dynamique de phagocytose et de relargage de l'A β se produit après 24h de contact entre les microglies et la plaque. Il est donc possible que ce processus ait eu lieu dans l'essai *ex vivo*. Selon cette hypothèse, si le VEGF a augmenté l'internalisation d'A β soluble, sa transformation en fibrilles et leur libération dans le milieu pourrait masquer les effets du VEGF sur les espèces d'A β soluble. Il serait alors intéressant de quantifier séparément les espèces fibrillaires (par marquage Methoxy-X04) et l'A β total (immunomarquage anti-A β 6E10 ou 4G8).

VEGF modulateur des ADAM10/17

Pour expliquer l'effet différentiel du VEGF sur la phagocytose des A β o et de l'A β f, nous avons cherché à identifier les mécanismes mis en jeu par ce facteur. Des travaux plus anciens ont montré que le VEGF modifie l'expression et l'activité d'ADAM10 (Donners et al., 2010; Guo et al., 2019). Sur des cellules endothéliales, exprimant le VEGFR1 et le VEGFR2, ou *in vivo* chez des souris Tg2576 modèle de la MA, le VEGF augmente l'expression et l'activité d'ADAM10. De plus, une forme constitutivement active de SRC est capable à elle seule d'induire l'activité d'ADAM17 dans des kératinocytes (Maretzky et al., 2011b). Cependant, l'impact du VEGF sur l'activité des ADAM10/17 n'a jamais été étudié dans des cellules n'exprimant que le VEGFR1, et nous avons donc réalisé cette analyse sur des cellules microgliales, par l'analyse du clivage d'un substrat soluble. Nos résultats indiquent qu'un traitement aigu au VEGF induit une augmentation transitoire de l'activité d'ADAM10/17 ; mais à l'inverse, des traitements prolongés diminuent drastiquement et durablement leur activité protéolytique.

Comment expliquer cette variation du clivage ? L'activité des ADAM présentes à la membrane est régulée par plusieurs facteurs, dont les phosphatidylsérines (PhosSer) membranaires, et leur translocation dans le feuillet externe de la membrane est nécessaire à l'activation d'ADAM17 (Sommer et al., 2016). Ce transfert lipidique peut être stimulé par la reconnaissance de ligands et l'activation de voies intracellulaires. Les PhosSer se lient au domaine MPD (membrane proximal domain) d'ADAM17 et changent la conformation de la protéase, en rendant son site de clivage accessible aux substrats. D'autres mécanismes membranaires influencent l'activité enzymatique des ADAM, comme par exemple la composition en cholestérol et en céramide, qui régulent l'accessibilité de la protéase aux substrats et la fluidité membranaire (Reiss and Bhakdi, 2017). Cependant, ces phénomènes n'interviennent pas dans le clivage peptidolytique de substrats solubles, car les différentes conformations des ADAM ne changent pas leur accessibilité aux substrats présents en solution. Cela suggère donc que le VEGF, qui est capable d'augmenter le clivage peptidolytique des ADAM10 et ADAM17, ne joue pas sur ces états d'activation membranaire.

Une part importante de la régulation des ADAM10 et ADAM17 a lieu lors de leur trafic intracellulaire. Leur transport du réticulum endoplasmique, puis transgolgien à la membrane, est régulé principalement par les tétraspanines et rhomboïdes (iRhom2), mais aussi par la phosphorylation des ADAM et d'iRhom2 (ex: via ERK et SRC) (Cavadas et al., 2017; Lambrecht et al., 2018; Zhao et al., 2019). Une fois exprimé à la membrane, leur maintien dépend de leur activité. C'est ce qui a été montré pour ADAM10, où l'inhibition de la protéase conduit à son endocytose clathrine-dépendante puis sa dégradation lysosomale (Seifert et al.,

2021). De manière intéressante, 24 heures après l'arrêt de l'inhibition, une synthèse *de novo* est nécessaire pour rétablir une expression et une activité basale d'ADAM10. Ce retour à la normale à 24h post-traitement est assez semblable à ce que nous observons après 20h de traitement au VEGF. On peut penser que les ADAM10/17 ont été internalisées faute d'activité, suite à la stimulation au VEGF, puis dégradées. Mais d'après ce raisonnement, il reste à déterminer pourquoi l'activité des ADAM10/17 a diminué.

La diminution d'activité des ADAMs pourrait être due à une diminution d'activité du VEGF. Après stimulation des cellules endothéliales au VEGF, il est connu que le complexe VEGF-VEGFR2 est internalisé, ce qui participe à la continuité de sa signalisation et de son effet (Lampugnani et al., 2006; Nakayama et al., 2013). Cette endocytose post-activation a aussi été rapportée pour le VEGFR1, suivie de sa dégradation (Kobayashi et al., 2004). Il est ainsi possible que le traitement des cellules microgliales au VEGF induise une internalisation massive des récepteurs VEGFR1 membranaires, et que leur ré-adressage à la membrane soit plus progressive. La voie VEGF/VEGFR1 pourrait aussi être interrompue par le clivage du récepteur par les ADAM10/17 (Raikwar et al., 2014), comme cela a été observé pour le VEGFR2 (Swendeman et al., 2008; Donners et al., 2010). L'étude de ce processus de clivage est possible grâce au suivi des niveaux de sVEGFR1 libéré dans le milieu de culture après traitement des microglies au VEGF.

Nous proposons donc que l'augmentation rapide de l'activation des ADAM10/17 suivie de leur inhibition prolongée soit due à une induction transitoire de la voie VEGF/VEGFR1, puis à l'internalisation des ADAM10/17 devenues inactives.

Cependant, l'absence d'activité des ADAM10/17 n'est pas forcément associée à une perte de fonction microgliale. En effet, deux études ont montré que l'activation des ADAM10/17 peut aussi conduire à une diminution de la phagocytose microgliale (Sommer et al., 2019; Shu et al., 2023). Sommer et al. ont observé que les microglies invalidées pour ADAM17, mais pas les macrophages, expriment plus de récepteurs phagocytaires CD36 et internalisent une fraction plus importante de cellules apoptotiques, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Sommer et al., 2019). La seconde étude de Shu et al. montre que l'activation d'Adam10 par l'inflammasome Nlrp3 entraîne le clivage de Trem2, et est associé à une plus faible clairance d'agrégats protéiques Poly-Gly-Ala dans un modèle murin de Sclérose Latérale Amyotrophique (Shu et al., 2023).

De nombreux travaux pointent le rôle de TREM2 et de sa forme sTREM2, clivée par les ADAM10/17, dans la modulation de la fonction microgliale dans la MA (Brown and St George-Hyslop, 2021). Nous nous sommes donc intéressés à la modulation de cette voie, et en particulier au clivage et à la libération de sTREM2, par le VEGF.

Implication de sTREM2

L'identification de polymorphismes de TREM2 comme facteurs de risque dans les sMA (Guerreiro et al., 2013b; Jonsson et al., 2013) a focalisé l'attention sur ce récepteur microglial à l'A β ainsi que sur son clivage par les ADAM10/17 (Feuerbach et al., 2017; Schlepckow et al., 2017; Zhao et al., 2018). Le suivi des niveaux de sTREM2 dans le LCR de patient.e.s atteints de la MA a révélé l'intérêt de ce facteur comme biomarqueur de l'activité microgliale associé à une diminution des troubles et du déclin cognitif (Gispert et al., 2016; Suárez-Calvet et al., 2016; Ewers et al., 2019). Ces observations suggèrent que le clivage de TREM2 en sTREM2, qui reflète une activation préalable du récepteur, pourrait être bénéfique dans l'évolution de la MA. Cela a conduit Zhong et al. à caractériser l'effet direct de sTREM2 par transfert viral du gène, via l'injection d'AAV-sTREM2 chez des souris 5xFAD nouveaux-nés ou âgées de 7 mois, et à évaluer la progression de la pathologie respectivement à 6 mois ou 7 jours post-injection (Zhong et al., 2019). Par ces deux approches, le groupe a observé une diminution de la charge amyloïde, une prolifération et une migration plus importantes des microglies vers les plaques, et une amélioration des performances cognitives.

Nous avons donc cherché à déterminer si la stimulation brève des ADAM10/17 par le VEGF pourrait se traduire par un clivage de sTREM2. Nos données montrent que le VEGF augmente le niveau de sTrem2 de manière transitoire, ce qui correspondrait donc à l'activation rapide des ADAM10/17. A des temps plus tardifs, sTrem2 revient à un niveau d'expression basal, suggérant que le clivage du récepteur en réponse au VEGF est achevé. Les mécanismes responsables de cette dynamique ne sont pas connus, mais des processus d'internalisation de TREM2, décrits dans les macrophages (Wu et al., 2015), et/ou une dégradation enzymatique (Berner et al., 2020) pourraient avoir lieu ici.

Les conséquences d'un traitement des microglies primaires au sTREM2 ont été évaluées dans la littérature à de fortes concentration (160 nM) et sur une longue durée (12h), induisant une augmentation de la phagocytose de l'A β (Zhong et al., 2019). Afin de déterminer si ce mécanisme pouvait expliquer l'effet du VEGF, nous avons choisi d'utiliser une concentration de sTREM2 8 fois plus faible, et des conditions de traitement brèves semblables à celle du VEGF, c'est-à-dire avec une pré-stimulation de 5 minutes avant l'ajout d'A β o. Nous montrons qu'un traitement aigu au sTREM2 suffit pour augmenter la phagocytose microgliale, et pourrait ainsi expliquer l'effet fonctionnel observé avec le VEGF.

Plusieurs hypothèses existent quant au mécanisme d'action de sTREM2 (Filipello et al., 2022). Il a notamment été proposé que sTREM2 soit un leurre qui antagonise l'effet du récepteur TREM2 membranaire, mais cela n'a été suggéré uniquement par des observations faites après blocage du clivage de TREM2 (par un inhibiteur des ADAM, ou un anticorps anti-

TREM2) (Kleinberger et al., 2014; Schlepckow et al., 2020). Dans ces cas de figure, l'augmentation de la signalisation TREM2 membranaire, induite par la fixation de l'anticorps anti-TREM2, pourrait être à l'origine de l'effet positif observé. Enfin, d'après nos résultats, sTREM2 n'agit pas comme un leurre antagoniste, mais potentialise la phagocytose microgliale de l'A β .

Le mécanisme d'action de sTREM2 fait l'objet de nombreuses recherches car le/les récepteurs responsables de son effet ne sont pas connus. Sur des macrophages et des microglies traitées au sTREM2, une augmentation de la survie cellulaire a été mise en évidence à la fois chez des souris sauvages (TREM2^{+/+}) ou déficientes en TREM2 (TREM2^{-/-}) (Wu et al., 2015; Zhong et al., 2017). L'action de sTREM2 serait donc indépendante de TREM2 membranaire, mais les récepteurs et les voies impliqués restent à caractériser. Comme sTREM2 a la capacité de lier les neurones dans le modèle 5xFAD de la MA, l'existence d'une liaison en trans sur des récepteurs autres que TREM2 est possible (Song et al., 2018).

Un autre mode d'action de sTREM2 concerne son rôle dans la régulation de l'agrégation de l'A β . Plusieurs groupes ont caractérisé les capacités de liaison de sTREM2 à l'A β , grâce à son domaine Ig-like conservé (Lessard et al., 2018; Zhong et al., 2018; Vilalta et al., 2021; Belsare et al., 2022). En particulier, deux de ces groupes ont mis en évidence que sTREM2 diminue l'oligomérisation et la fibrillation de l'A β (Vilalta et al., 2021; Belsare et al., 2022). Vilalta et al. ont notamment montré qu'un ratio de sTREM2:A β de 1:50 suffisait à réduire significativement l'oligomérisation de l'A β après 3h d'incubation, et qu'un ratio de 1:100 était capable d'inhiber la fibrillation après 1h. Dans l'essai de phagocytose après stimulation au sTREM2, nous avons respecté ce ratio de 1:50, qui pourrait donc agir en freinant l'oligomérisation de l'A β .

Ce mode d'action permettrait d'expliquer en partie l'effet du VEGF car la liaison et la phagocytose des oligomères et des protofibrilles d'A β par les microglies est plus élevée que celle des fibrilles (Liu et al., 2010; Paranjape et al., 2013; Lučiūnaitė et al., 2020). D'après ces observations, la brève augmentation de sTREM2 induite par le VEGF pourrait donc conduire à une liaison de sTREM2 aux espèces solubles d'A β . Cette liaison ralentirait ensuite la formation de plus gros agrégats, et stabiliserait les petits oligomères, facilitant *in fine* la phagocytose microgliale.

On peut noter que la demi-vie de TREM2 à la surface de la cellule est de moins d'une heure, et son clivage constitutif est suivi d'un ré-adressage du récepteur à la membrane de manière dynamique (Thornton et al., 2017). Or, un clivage réduit de sTREM2 permet d'augmenter la phagocytose microgliale de bactéries (Kleinberger et al., 2014), de myéline (Beckmann et al., 2023) et d'A β (Schlepckow et al., 2020). On peut donc supposer qu'après le clivage précoce de TREM2 induit par le VEGF, un nouveau pool de récepteurs revienne à

la membrane, au moment où l'activité des ADAM10/17 se réduit. Ainsi, l'effet tardif du VEGF permettrait de stabiliser le récepteur TREM2 à la membrane. Nous proposons donc que les deux formes, TREM2 et sTREM2, sont impliquées dans l'augmentation de la phagocytose des oligomères et protofibrilles d'A β par le VEGF.

Effet d'une administration continue de VEGF ?

Notre étude a montré que le VEGF augmente la phagocytose d'oligomères et de protofibrilles d'A β à court terme. Cela pose la question de son effet à plus long terme. Le VEGF peut être considéré comme un médiateur de l'inflammation, dont la synthèse coïncide avec la libération de cytokines microgliales dans plusieurs contextes de neurodégénérescence et de neuroinflammation (Lange et al., 2016). Or, la production de molécules inflammatoires est aujourd'hui envisagée comme néfaste dans la progression de la MA (Leng and Edison, 2021b). Les études caractérisant l'effet du VEGF sur la production cytokinique microgliale sont assez contradictoires, car l'ajout de VEGF comme son inhibition entraîne des sécrétions de cytokines anti-inflammatoires (Doloff and Waxman, 2012; Park et al., 2019). De plus, chez des souris APPPS1dE9 modèles de la MA recevant du VEGF, il a été observé une diminution de l'immunoréactivité astrocytaire et microgliale (Garcia et al., 2014). On peut supposer qu'en cas d'application régulière du VEGF, la concentration présente conditionnera la réponse microgliale et il est donc difficile de prédire la réactivité et la réponse microgliale au VEGF à long terme.

Un autre aspect à considérer, est que le VEGF est un facteur primordial dans la régulation du système vasculaire. Son administration peut donc moduler le fonctionnement des vaisseaux, et a historiquement été décrite comme altérant l'intégrité de la BHE (Zhang et al., 2000). Récemment, deux études sur des souris APP/PS1 modèles de la MA ont rapporté des effets opposés du VEGF périphérique (Ali et al., 2022; Qi et al., 2023). Ali et al. ont observé qu'un traitement intraveineux antagoniste du VEGF (anticorps anti-VEGF) rétablit le flux sanguin cérébral chez ces souris. En revanche, l'administration de sérum de souris WT à des souris APP/PS1 provoque une augmentation des niveaux du VEGF qui permet de diminuer l'infiltration de cellules immunes périphérique par la BHE et d'améliorer les fonctions cognitives de ces souris (Qi et al., 2023). D'autre part, dans des modèles de surexpression prolongée de VEGF par les neurones chez des souris âgées ou modèles de la MA, aucun défaut de perméabilité vasculaire n'a été rapporté (Religa et al., 2013; Licht et al., 2020). Cependant, la production astrocytaire de Vegf dans un contexte inflammatoire peut être responsable de la

rupture de la BHE (Argaw et al., 2012). L'effet du VEGF périphérique et central dans l'intégrité de la BHE sur des modèles de MA est donc débattu.

L'effet du VEGF exogène dans des modèles murins de la MA a été étudié sur différents fonds génétiques, mais il s'agissait généralement d'effet à court terme après une seule administration (Wang et al., 2011; Herrán et al., 2013; Garcia et al., 2014). Chez ces souris ayant reçu une administration aiguë de VEGF, des améliorations nettes de la pathologie ont été rapportées, mais le design expérimental ne permet pas d'extrapoler aux effets à plus long terme comme cela serait le cas avec des prises répétées dans une approche thérapeutique. Le modèle développé par le groupe d'Eli Keshet, avec un système de surexpression inducible du VEGF On/Off chez la souris adulte, révèle une augmentation drastique de l'angiogenèse et de la neurogénèse, en lien avec une amélioration de la mémoire des souris après 1 mois de surexpression du VEGF (Licht et al., 2011). Dans la continuité de cette étude, le groupe a mis en évidence qu'une surexpression prolongée du VEGF (de 1 à 7 mois) entraîne certes une augmentation de la neurogenèse, mais aussi une neurotoxicité importante, en particulier dans le gyrus denté (Licht et al., 2020). Cette perte neuronale qui pourrait provenir d'une activation dérégulée des cellules microgliales (Kreisel et al., 2019; Licht et al., 2020), est réversible avec l'arrêt du traitement VEGF, mais pas pour des souris âgées.

Étant donné les risques inflammatoires, de perméabilité sanguine et de neurotoxicité, l'usage direct du VEGF dans la MA semble complexe à développer dans une perspective thérapeutique. Sachant que le VEGF produit de manière endogène est séquestré dans les plaques amyloïdes au cours de la MA (Yang et al., 2004; Thomas et al., 2015; Martin et al., 2021), une approche alternative serait de prévenir cette séquestration et de rétablir une homeostasie du VEGF cérébral pour rétablir son action neuroprotectrice. C'est cette approche que nous avons choisie d'explorer en libérant le VEGF lié à l'A β . Pour cela, nous nous sommes basés sur la séquence d'interaction entre ces deux protéines (Martin et al., 2021), et avons développé un peptide bloquant dont la séquence correspond au site de liaison du VEGF. L'analyse de l'effet de ce peptide *in vitro* a montré qu'il peut bloquer l'agrégation de l'A β , diminuer la fixation des A β o toxiques aux synapses, et rétablir de manière prolongée la plasticité synaptique sur des tranches aiguës d'hippocampe de souris APP/PS1 (Annexe) (Bouvet et al. 2023). De plus, ce peptide bloquant a la capacité d'empêcher la liaison de l'A β au VEGF *in vitro*. L'usage de ce peptide *in vivo* dans des modèles de la MA permettrait ainsi de rétablir l'effet protecteur du VEGF sur l'angiogenèse, la neurogénèse et éventuellement de stimuler l'action microgliale. Dans cette optique, nous envisageons de développer une méthode de vectorisation du peptide pour des essais pré-cliniques chez des souris APP/PS1. Cette approche devrait nous permettre d'évaluer le potentiel thérapeutique de cet outil.

Conclusion

Nous avons donc démontré que le VEGF module l'activité phagocytaire des microglies, en augmentant spécifiquement la phagocytose des espèces solubles d'A β , sans affecter celle des fibrilles, ni l'élimination des plaques amyloïdes.

A partir de nos résultats et des données de la littérature, nous proposons un modèle pour expliquer la dynamique de l'effet du VEGF sur la microglie (Figure 27). Initialement, le VEGF induit une augmentation précoce et transitoire de l'activité membranaire des ADAM10/17, qui se traduit par un clivage important de TREM2. Après cette activation initiale, une baisse d'activité de la voie VEGF/VEGFR1 (par clivage ou internalisation du récepteur), pourrait conduire à l'internalisation des ADAM10/17 inactives et à leur inhibition prolongée. D'autre part, le sTREM2 libéré stabilise les petites formes solubles d'A β en bloquant leur agrégation et facilite ainsi leur internalisation par des récepteurs non connus à ce jour. Enfin, la dynamique de TREM2 et l'inhibition prolongée des ADAM10/17 par le VEGF permet le ré-adressage du récepteur à la membrane et sa stabilisation qui potentialise la phagocytose des oligomères d'A β .

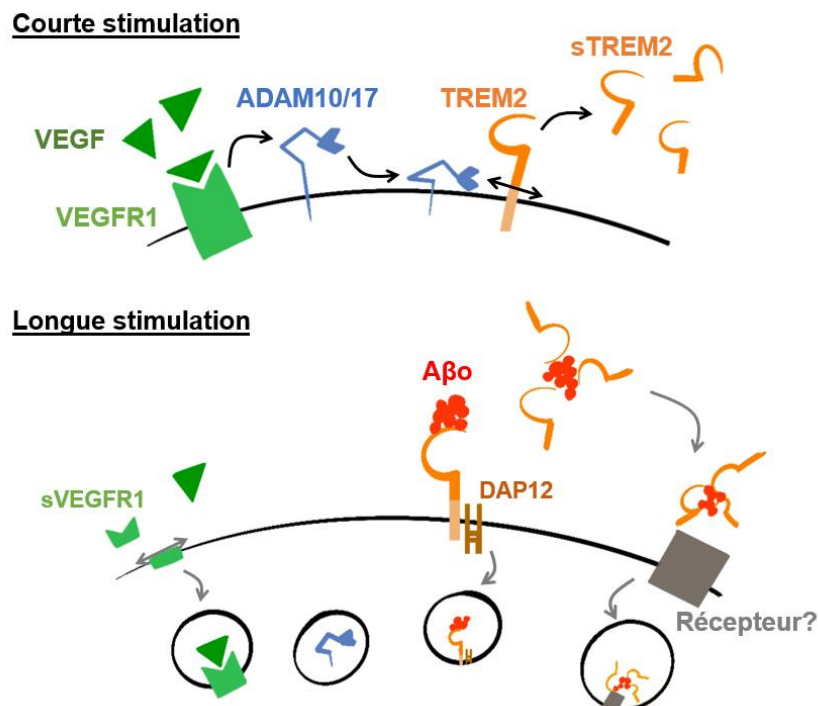


Figure 27 - Schéma récapitulatif de l'effet du VEGF sur la microglie et autres mécanismes potentiels.

Le VEGF a un effet dynamique sur la microglie. Après une courte stimulation (0-15 min), le VEGF augmente l'activité des ADAM10/17 et provoque une importante libération de sTREM2. Après cette activation initiale, la baisse d'activité de la voie VEGF/VEGFR1 conduirait à inhiber les ADAM10/17. TREM2 et sTREM2 seraient ensuite responsables de l'augmentation de la phagocytose des oligomères d'A β . Flèches noires : montré ; flèches grises : hypothèses.

Références

- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., et al. (2010). Structural conversion of neurotoxic amyloid- β 1–42 oligomers to fibrils. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 561–567. doi: 10.1038/nsmb.1799.
- Akhter, R., Shao, Y., Formica, S., Khrestian, M., and Bekris, L. M. (2021). TREM2 alters the phagocytic, apoptotic and inflammatory response to A β 42 in HMC3 cells. *Mol. Immunol.* 131, 171–179. doi: 10.1016/j.molimm.2020.12.035.
- Akiyoshi, R., Wake, H., Kato, D., Horiuchi, H., Ono, R., Ikegami, A., et al. (2018). Microglia Enhance Synapse Activity to Promote Local Network Synchronization. *eNeuro* 5, ENEURO.0088-18.2018. doi: 10.1523/ENEURO.0088-18.2018.
- Ali, M., Falkenhain, K., Njiru, B. N., Murtaza-Ali, M., Ruiz-Urbe, N. E., Haft-Javaherian, M., et al. (2022). VEGF signalling causes stalls in brain capillaries and reduces cerebral blood flow in Alzheimer's mice. *Brain* 145, 1449–1463. doi: 10.1093/brain/awab387.
- Alonso, A. del C., Zaidi, T., Novak, M., Grundke-Iqbal, I., and Iqbal, K. (2001). Hyperphosphorylation induces self-assembly of τ into tangles of paired helical filaments/straight filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 6923–6928. doi: 10.1073/pnas.121119298.
- Alves de Lima, K., Rustenhoven, J., and Kipnis, J. (2020). Meningeal Immunity and Its Function in Maintenance of the Central Nervous System in Health and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 38, 597–620. doi: 10.1146/annurev-immunol-102319-103410.
- Amin, L., and Harris, D. A. (2021). A β receptors specifically recognize molecular features displayed by fibril ends and neurotoxic oligomers. *Nat. Commun.* 12, 3451. doi: 10.1038/s41467-021-23507-z.
- Arevalo-Rodriguez, I., Smailagic, N., Roqué-Figuls, M., Ciapponi, A., Sanchez-Perez, E., Giannakou, A., et al. (2021). Mini-Mental State Examination (MMSE) for the early detection of dementia in people with mild cognitive impairment (MCI). *Cochrane Database Syst. Rev.* 7, CD010783. doi: 10.1002/14651858.CD010783.pub3.
- Argaw, A. T., Asp, L., Zhang, J., Navrazhina, K., Pham, T., Mariani, J. N., et al. (2012). Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J. Clin. Invest.* 122, 2454–2468. doi: 10.1172/JCI60842.
- Armstrong, R. A. (1995). Beta-Amyloid Deposition in the Medial Temporal Lobe in Elderly Non-Demented Brains and in Alzheimer's Disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 6, 121–125. doi: 10.1159/000106933.
- Arnsten, A. F. T., Datta, D., Tredici, K. D., and Braak, H. (2021). Hypothesis: Tau pathology is an initiating factor in sporadic Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 17, 115–124. doi: 10.1002/alz.12192.
- Arriagada, P. V., Marzloff, K., and Hyman, B. T. (1992). Distribution of Alzheimer-type pathologic changes in nondemented elderly individuals matches the pattern in Alzheimer's disease. *Neurology* 42, 1681–1688. doi: 10.1212/wnl.42.9.1681.
- Arvanitakis, Z., Capuano, A. W., Leurgans, S. E., Bennett, D. A., and Schneider, J. A. (2016). Relation of Cerebral Vessel Disease to Alzheimer's Disease Dementia and Cognitive Function in Older Persons: A Cross-sectional Study. *Lancet Neurol.* 15, 934–943. doi: 10.1016/S1474-4422(16)30029-1.
- Arvanitakis, Z., Leurgans, S. E., Wang, Z., Wilson, R. S., Bennett, D. A., and Schneider, J. A. (2011). Cerebral Amyloid Angiopathy Pathology and Cognitive Domains in Older Persons. *Ann. Neurol.* 69, 320–327. doi: 10.1002/ana.22112.

- Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., et al. (2015). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat. Neurosci.* 18, 1584–1593. doi: 10.1038/nn.4132.
- Ashe, K. H. (2020). The biogenesis and biology of amyloid β oligomers in the brain. *Alzheimers Dement.* 16, 1561–1567. doi: 10.1002/alz.12084.
- Askew, K., Li, K., Olmos-Alonso, A., Garcia-Moreno, F., Liang, Y., Richardson, P., et al. (2017). Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Rep.* 18, 391–405. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.041.
- Aspelund, A., Antila, S., Proulx, S. T., Karlsen, T. V., Karaman, S., Detmar, M., et al. (2015). A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J. Exp. Med.* 212, 991–999. doi: 10.1084/jem.20142290.
- Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D., Kranz, A., Moons, L., Lambrechts, D., et al. (2003). Role of PIGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.* 9, 936–943. doi: 10.1038/nm884.
- Bagaria, J., Nho, K., and An, S. S. A. (2021). Importance of GWAS in finding un-targeted genetic association of sporadic Alzheimer's disease. *Mol. Cell. Toxicol.* 17, 233–244. doi: 10.1007/s13273-021-00130-z.
- Baik, S. H., Kang, S., Son, S. M., and Mook-Jung, I. (2016). Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid β in the brain of Alzheimer's disease mouse model: A β Plaque Formation and Microglial Activation. *Glia* 64, 2274–2290. doi: 10.1002/glia.23074.
- Bailey, C. H., and Kandel, E. R. (1993). Structural Changes Accompanying Memory Storage. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 397–426. doi: 10.1146/annurev.ph.55.030193.002145.
- Barbier, P., Zejneli, O., Martinho, M., Lasorsa, A., Belle, V., Smet-Nocca, C., et al. (2019). Role of Tau as a Microtubule-Associated Protein: Structural and Functional Aspects. *Front. Aging Neurosci.* 11. Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2019.00204> [Accessed April 4, 2023].
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.-L., Games, D., Grajeda, H., et al. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat. Med.* 6, 916–919. doi: 10.1038/78682.
- Barnes, D. E., and Yaffe, K. (2011). The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol.* 10, 819–828. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70072-2.
- Barthélemy, N. R., Li, Y., Joseph-Mathurin, N., Gordon, B. A., Hassenstab, J., Benzinger, T. L. S., et al. (2020). A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid and the evolution of stages of dominantly inherited Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 26, 398–407. doi: 10.1038/s41591-020-0781-z.
- Beckmann, N., Neuhaus, A., Zurbrugg, S., Volkmer, P., Patino, C., Joller, S., et al. (2023). Genetic models of cleavage-reduced and soluble TREM2 reveal distinct effects on myelination and microglia function in the cuprizone model. *J. Neuroinflammation* 20, 29. doi: 10.1186/s12974-022-02671-z.
- Belsare, K. D., Wu, H., Mondal, D., Bond, A., Castillo, E., Jin, J., et al. (2022). Soluble TREM2 inhibits secondary nucleation of A β fibrillization and enhances cellular uptake of fibrillar A β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 119, e2114486119. doi: 10.1073/pnas.2114486119.
- Benedet, A. L., Brum, W. S., Hansson, O., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Karikari, T. K., Zimmer, E. R., et al. (2022). The accuracy and robustness of plasma biomarker models for amyloid PET positivity. *Alzheimers Res. Ther.* 14, 26. doi: 10.1186/s13195-021-00942-0.

- Benilova, I., Karran, E., and De Strooper, B. (2012). The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* 15, 349–357. doi: 10.1038/nn.3028.
- Bennett, D. A., Schneider, J. A., Arvanitakis, Z., Kelly, J. F., Aggarwal, N. T., Shah, R. C., et al. (2006). Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology* 66, 1837–1844. doi: 10.1212/01.wnl.0000219668.47116.e6.
- Bennett, M. L., Bennett, F. C., Liddelov, S. A., Ajami, B., Zamanian, J. L., Fernhoff, N. B., et al. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E1738–E1746. doi: 10.1073/pnas.1525528113.
- Bentahir, M., Nyabi, O., Verhamme, J., Tolia, A., Horr , K., Wiltfang, J., et al. (2006). Presenilin clinical mutations can affect γ -secretase activity by different mechanisms. *J. Neurochem.* 96, 732–742. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03578.x.
- Berner, D. K., Wessolowski, L., Armbrust, F., Schneppenheim, J., Schlepckow, K., Koudelka, T., et al. (2020). Meprin β cleaves TREM2 and controls its phagocytic activity on macrophages. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 34, 6675–6687. doi: 10.1096/fj.201902183R.
- Bi, C., Bi, S., and Li, B. (2019). Processing of Mutant β -Amyloid Precursor Protein and the Clinicopathological Features of Familial Alzheimer's Disease. *Aging Dis.* 10, 383. doi: 10.14336/AD.2018.0425.
- Bisht, K., Sharma, K. P., Lecours, C., Sánchez, M. G., El Hajj, H., Milior, G., et al. (2016). Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states. *Glia* 64, 826–839. doi: 10.1002/glia.22966.
- Bitan, G., Fradinger, E. A., Spring, S. M., and Teplow, D. B. (2005). Neurotoxic protein oligomers--what you see is not always what you get. *Amyloid Int. J. Exp. Clin. Investig. Off. J. Int. Soc. Amyloidosis* 12, 88–95. doi: 10.1080/13506120500106958.
- Bitan, G., Kirkitadze, M. D., Lomakin, A., Vollers, S. S., Benedek, G. B., and Teplow, D. B. (2003). Amyloid β -protein (A β) assembly: A β 40 and A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 330–335. doi: 10.1073/pnas.222681699.
- Bittner, T., Burgold, S., Dorostkar, M. M., Fuhrmann, M., Wegenast-Braun, B. M., Schmidt, B., et al. (2012). Amyloid plaque formation precedes dendritic spine loss. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 124, 797–807. doi: 10.1007/s00401-012-1047-8.
- Boche, D., Perry, V. H., and Nicoll, J. A. R. (2013). Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain: Microglia in human brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 39, 3–18. doi: 10.1111/nan.12011.
- Bohlen, C. J., Bennett, F. C., Tucker, A. F., Collins, H. Y., Mulinyawe, S. B., and Barres, B. A. (2017). Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and Function Revealed by Defined-Medium Cultures. *Neuron* 94, 759–773.e8. doi: 10.1016/j.neuron.2017.04.043.
- Bolmont, T., Haiss, F., Eicke, D., Radde, R., Mathis, C. A., Klunk, W. E., et al. (2008). Dynamics of the Microglial/Amyloid Interaction Indicate a Role in Plaque Maintenance. *J. Neurosci.* 28, 4283–4292. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4814-07.2008.
- Bol s, M., Llorens-Martín, M., Perea, J. R., Jurado-Arjona, J., R bano, A., Hernández, F., et al. (2017). Absence of CX3CR1 impairs the internalization of Tau by microglia. *Mol. Neurodegener.* 12, 59. doi: 10.1186/s13024-017-0200-1.
- Boon, B. D. C., Bulk, M., Jonker, A. J., Morrema, T. H. J., van den Berg, E., Popovic, M., et al. (2020). The coarse-grained plaque: a divergent A β plaque-type in early-onset Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 140, 811–830. doi: 10.1007/s00401-020-02198-8.

- Boon, B. D. C., Hoozemans, J. J. M., Lopuhaä, B., Eigenhuis, K. N., Scheltens, P., Kamphorst, W., et al. (2018). Neuroinflammation is increased in the parietal cortex of atypical Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 15, 170. doi: 10.1186/s12974-018-1180-y.
- Böttcher, C., Schlickeiser, S., Sneeboer, M. A. M., Kunkel, D., Knop, A., Paza, E., et al. (2019). Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nat. Neurosci.* 22, 78–90. doi: 10.1038/s41593-018-0290-2.
- Bouvier, D. S., Jones, E. V., Quesseveur, G., Davoli, M. A., A. Ferreira, T., Quirion, R., et al. (2016). High Resolution Dissection of Reactive Glial Nets in Alzheimer's Disease. *Sci. Rep.* 6, 24544. doi: 10.1038/srep24544.
- Bowen, D. M., and Davison, A. N. (1980). Biochemical changes in the cholinergic system of the ageing brain and in senile dementia. *Psychol. Med.* 10, 315–319. doi: 10.1017/S003329170004407X.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 82, 239–259. doi: 10.1007/BF00308809.
- Braak, H., and Del Tredici, K. (2012). Where, when, and in what form does sporadic Alzheimer's disease begin?: *Curr. Opin. Neurol.* 25, 708–714. doi: 10.1097/WCO.0b013e32835a3432.
- Brase, L., You, S.-F., D'Oliveira Albanus, R., Del-Aguila, J. L., Dai, Y., Novotny, B. C., et al. (2023). Single-nucleus RNA-sequencing of autosomal dominant Alzheimer disease and risk variant carriers. *Nat. Commun.* 14, 2314. doi: 10.1038/s41467-023-37437-5.
- Breier, G., Albrecht, U., Sterrer, S., and Risau, W. (1992). Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development.* doi: 10.1242/dev.114.2.521.
- Brelstaff, J., Mason, M., Katsinelos, T., McEwan, W. A., Ghetti, B., Tolkovsky, A. M., et al. (2021). Microglia become hypofunctional and release metalloproteases and tau seeds when phagocytosing live neurons with P301S tau aggregates. *Sci. Adv.* 7, eabg4980. doi: 10.1126/sciadv.abg4980.
- Brelstaff, J., Tolkovsky, A. M., Ghetti, B., Goedert, M., and Spillantini, M. G. (2018). Living Neurons with Tau Filaments Aberrantly Expose Phosphatidylserine and Are Phagocytosed by Microglia. *Cell Rep.* 24, 1939-1948.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.072.
- Brosseron, F., Krauthausen, M., Kummer, M., and Heneka, M. T. (2014). Body Fluid Cytokine Levels in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: a Comparative Overview. *Mol. Neurobiol.* 50, 534–544. doi: 10.1007/s12035-014-8657-1.
- Brown, G. C., and St George-Hyslop, P. (2021). Does Soluble TREM2 Protect Against Alzheimer's Disease? *Front. Aging Neurosci.* 13, 834697. doi: 10.3389/fnagi.2021.834697.
- Bürger, S., Noack, M., Kirazov, L. P., Kirazov, E. P., Naydenov, C. L., Kouznetsova, E., et al. (2009). Vascular endothelial growth factor (VEGF) affects processing of amyloid precursor protein and β -amyloidogenesis in brain slice cultures derived from transgenic Tg2576 mouse brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 517–523. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.06.011.
- Bürger, S., Yafai, Y., Bigl, M., Wiedemann, P., and Schliebs, R. (2010). Effect of VEGF and its receptor antagonist SU-5416, an inhibitor of angiogenesis, on processing of the β -amyloid precursor protein in primary neuronal cells derived from brain tissue of Tg2576 mice. *Int. J. Dev. Neurosci.* 28, 597–604. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2010.07.231.
- Bussi re, T., Giannakopoulos, P., Bouras, C., Perl, D. P., Morrison, J. H., and Hof, P. R. (2003). Progressive degeneration of nonphosphorylated neurofilament protein-enriched pyramidal neurons predicts cognitive impairment in Alzheimer's disease: stereologic analysis of prefrontal cortex area 9. *J. Comp. Neurol.* 463, 281–302. doi: 10.1002/cne.10760.

- Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., et al. (2014). Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat. Neurosci.* 17, 131–143. doi: 10.1038/nn.3599.
- Buttgereit, A., Lelios, I., Yu, X., Vrohligs, M., Krakoski, N. R., Gautier, E. L., et al. (2016). Sall1 is a transcriptional regulator defining microglia identity and function. *Nat. Immunol.* 17, 1397–1406. doi: 10.1038/ni.3585.
- Cai, J., Chen, Z., Ruan, Q., Han, S., Liu, L., Qi, X., et al. (2011). γ -Secretase and Presenilin Mediate Cleavage and Phosphorylation of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1*. *J. Biol. Chem.* 286, 42514–42523. doi: 10.1074/jbc.M111.296590.
- Cai, X., Li, Y., Zheng, X., Hu, R., Li, Y., Xiao, L., et al. (2021). Propofol suppresses microglial phagocytosis through the downregulation of MFG-E8. *J. Neuroinflammation* 18, 18. doi: 10.1186/s12974-020-02061-3.
- Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D. S., Liu, Y., Fong, D. M., Young, D., et al. (2004). VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat. Genet.* 36, 827–835. doi: 10.1038/ng1395.
- Carcaillon-Bentata, L. (2016). Peut-on estimer la prévalence de la maladie d'Alzheimer et autres démences à partir des bases de données médico-administratives ? Comparaison aux données de cohortes populationnelles. *Bull. Epidémiologique Hebd.*, 459–67.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435–439. doi: 10.1038/380435a0.
- Cavadas, M., Oikonomidi, I., Gaspar, C. J., Burbridge, E., Badenes, M., Félix, I., et al. (2017). Phosphorylation of iRhom2 Controls Stimulated Proteolytic Shedding by the Metalloprotease ADAM17/TACE. *Cell Rep.* 21, 745–757. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.074.
- Chatani, E., and Yamamoto, N. (2018). Recent progress on understanding the mechanisms of amyloid nucleation. *Biophys. Rev.* 10, 527–534. doi: 10.1007/s12551-017-0353-8.
- Chen, X., Hu, Y., Cao, Z., Liu, Q., and Cheng, Y. (2018). Cerebrospinal Fluid Inflammatory Cytokine Aberrations in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Immunol.* 9, 2122. doi: 10.3389/fimmu.2018.02122.
- Chiarini, A., Whitfield, J., Bonafini, C., Chakravarthy, B., Armato, U., and Dal Prà, I. (2010). Amyloid- β 25–35, an Amyloid- β 1–42 Surrogate, and Proinflammatory Cytokines Stimulate VEGF-A Secretion by Cultured, Early Passage, Normoxic Adult Human Cerebral Astrocytes. *J. Alzheimers Dis.* 21, 915–926. doi: 10.3233/JAD-2010-100471.
- Chyung, J. H., and Selkoe, D. J. (2003). Inhibition of Receptor-mediated Endocytosis Demonstrates Generation of Amyloid β -Protein at the Cell Surface. *J. Biol. Chem.* 278, 51035–51043. doi: 10.1074/jbc.M304989200.
- Clavaguera, F., Tolnay, M., and Goedert, M. (2017). The Prion-Like Behavior of Assembled Tau in Transgenic Mice. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7, a024372. doi: 10.1101/cshperspect.a024372.
- Clayton, K., Delpesch, J. C., Herron, S., Iwahara, N., Ericsson, M., Saito, T., et al. (2021). Plaque associated microglia hyper-secrete extracellular vesicles and accelerate tau propagation in a humanized APP mouse model. *Mol. Neurodegener.* 16, 18. doi: 10.1186/s13024-021-00440-9.
- Cohen, S. I. A., Linse, S., Luheshi, L. M., Hellstrand, E., White, D. A., Rajah, L., et al. (2013). Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9758–9763. doi: 10.1073/pnas.1218402110.

- Colombo, A., Dinkel, L., Müller, S. A., Sebastian Monasor, L., Schifferer, M., Cantuti-Castelvetri, L., et al. (2021). Loss of NPC1 enhances phagocytic uptake and impairs lipid trafficking in microglia. *Nat. Commun.* 12, 1158. doi: 10.1038/s41467-021-21428-5.
- Condello, C., Yuan, P., Schain, A., and Grutzendler, J. (2015). Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques. *Nat. Commun.* 6, 6176. doi: 10.1038/ncomms7176.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., et al. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921–923. doi: 10.1126/science.8346443.
- Cruts, M., Dermaut, B., Rademakers, R., Van den Broeck, M., Stögbauer, F., and Van Broeckhoven, C. (2003). Novel APP mutation V715A associated with presenile Alzheimer's disease in a German family. *J. Neurol.* 250, 1374–1375. doi: 10.1007/s00415-003-0182-5.
- Cserép, C., Pósfai, B., and Dénes, Á. (2021). Shaping Neuronal Fate: Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions. *Neuron* 109, 222–240. doi: 10.1016/j.neuron.2020.11.007.
- Cummings, J., Rabinovici, G. D., Atri, A., Aisen, P., Apostolova, L. G., Hendrix, S., et al. (2022). Aducanumab: Appropriate Use Recommendations Update. *J. Prev. Alzheimers Dis.* 9, 221–230. doi: 10.14283/jpad.2022.34.
- Cunningham, C. L., Martínez-Cerdeño, V., and Noctor, S. C. (2013). Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* 33, 4216–4233. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3441-12.2013.
- Davies, D. S., Ma, J., Jegathees, T., and Goldsbury, C. (2017). Microglia show altered morphology and reduced arborization in human brain during aging and Alzheimer's disease: Microglial changes in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 27, 795–808. doi: 10.1111/bpa.12456.
- Davies, P., and Maloney, A. J. F. (1976). SELECTIVE LOSS OF CENTRAL CHOLINERGIC NEURONS IN ALZHEIMER'S DISEASE. *The Lancet* 308, 1403. doi: 10.1016/S0140-6736(76)91936-X.
- Davignus, M. L., Bell, C. C., Berrettini, W., Bowen, P. E., Connolly, E. S., Cox, N. J., et al. (2010). National Institutes of Health State-of-the-Science Conference Statement: Preventing Alzheimer Disease and Cognitive Decline. *Ann. Intern. Med.* 153, 176–181. doi: 10.7326/0003-4819-153-3-201008030-00260.
- De Rossi, P., Harde, E., Dupuis, J. P., Martin, L., Chounlamountri, N., Bardin, M., et al. (2016). A critical role for VEGF and VEGFR2 in NMDA receptor synaptic function and fear-related behavior. *Mol. Psychiatry* 21, 1768–1780. doi: 10.1038/mp.2015.195.
- Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M. B., et al. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid β peptide clearance from mouse brain. *J. Clin. Invest.* 118, 4002–4013. doi: 10.1172/JCI36663.
- Deaton, C. A., and Johnson, G. V. W. (2020). Presenilin 1 Regulates Membrane Homeostatic Pathways that are Dysregulated in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 77, 961–977. doi: 10.3233/JAD-200598.
- Deczkowska, A., Weiner, A., and Amit, I. (2020). The Physiology, Pathology, and Potential Therapeutic Applications of the TREM2 Signaling Pathway. *Cell* 181, 1207–1217. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.003.
- Delaère, P., Duyckaerts, C., He, Y., Piette, F., and Hauw, J. J. (1991). Subtypes and differential laminar distributions of A β 4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 81, 328–335. doi: 10.1007/BF00305876.

- DeTure, M. A., and Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 14, 32. doi: 10.1186/s13024-019-0333-5.
- Dhandapani, R., Neri, M., Bernhard, M., Brzak, I., Schweizer, T., Rudin, S., et al. (2022). Sustained Trem2 stabilization accelerates microglia heterogeneity and A β pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Rep.* 39, 110883. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110883.
- Dickson, T. C., and Vickers, J. C. (2001). The morphological phenotype of beta-amyloid plaques and associated neuritic changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 105, 99–107. doi: 10.1016/s0306-4522(01)00169-5.
- Ding, D., Zhang, L., Liu, X., Sun, C., He, J., Li, J., et al. (2022). Chemokine CCL18 Promotes Phagocytosis Through Its Receptor CCR8 Rather than P1T1PNM3 in Human Microglial Cells. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 42, 19–28. doi: 10.1089/jir.2021.0123.
- Doloff, J. C., and Waxman, D. J. (2012). VEGF receptor inhibitors block the ability of metronomically dosed cyclophosphamide to activate innate immunity-induced tumor regression. *Cancer Res.* 72, 1103–1115. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3380.
- Donners, M. M. P. C., Wolfs, I. M. J., Olieslagers, S., Mohammadi-Motahhari, Z., Tchaikovski, V., Heeneman, S., et al. (2010). A Disintegrin and Metalloprotease 10 Is a Novel Mediator of Vascular Endothelial Growth Factor–Induced Endothelial Cell Function in Angiogenesis and Is Associated With Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2188–2195. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.213124.
- Dos Santos, S. E., Medeiros, M., Porfirio, J., Tavares, W., Pessôa, L., Grinberg, L., et al. (2020). Similar Microglial Cell Densities across Brain Structures and Mammalian Species: Implications for Brain Tissue Function. *J. Neurosci.* 40, 4622–4643. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2339-19.2020.
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Hampel, H., Molinuevo, J. L., Blennow, K., et al. (2014). Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria. *Lancet Neurol.* 13, 614–629. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70090-0.
- Dubois, B., Villain, N., Frisoni, G. B., Rabinovici, G. D., Sabbagh, M., Cappa, S., et al. (2021). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: recommendations of the International Working Group. *Lancet Neurol.* 20, 484–496. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00066-1.
- Duwat, C., Léal, P., Vautheny, A., Aurégan, G., Joséphine, C., Gaillard, M.-C., et al. (2023). Development of an AAV-based model of tauopathy targeting retinal ganglion cells and the mouse visual pathway to study the role of microglia in Tau pathology. *Neurobiol. Dis.* 181, 106116. doi: 10.1016/j.nbd.2023.106116.
- Edison, P., Archer, H. A., Gerhard, A., Hinz, R., Pavese, N., Turkheimer, F. E., et al. (2008). Microglia, amyloid, and cognition in Alzheimer's disease: An [11C](R)PK11195-PET and [11C]PIB-PET study. *Neurobiol. Dis.* 32, 412–419. doi: 10.1016/j.nbd.2008.08.001.
- El-Hillal, O., Kurosaki, T., Yamamura, H., Kinet, J.-P., and Scharenberg, A. M. (1997). syk kinase activation by a src kinase-initiated activation loop phosphorylation chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 1919–1924. doi: 10.1073/pnas.94.5.1919.
- Ewers, M., Franzmeier, N., Suárez-Calvet, M., Morenas-Rodríguez, E., Caballero, M. A. A., Kleinberger, G., et al. (2019). Increased soluble TREM2 in cerebrospinal fluid is associated with reduced cognitive and clinical decline in Alzheimer's disease. *Sci. Transl. Med.* 11, eaav6221. doi: 10.1126/scitranslmed.aav6221.
- Feuerbach, D., Schindler, P., Barske, C., Joller, S., Beng-Louka, E., Worringer, K. A., et al. (2017). ADAM17 is the main sheddase for the generation of human triggering receptor expressed in myeloid cells (hTREM2) ectodomain and cleaves TREM2 after Histidine 157. *Neurosci. Lett.* 660, 109–114. doi: 10.1016/j.neulet.2017.09.034.

- Filipello, F., Goldsbury, C., You, S. F., Locca, A., Karch, C. M., and Piccio, L. (2022). Soluble TREM2: Innocent bystander or active player in neurological diseases? *Neurobiol. Dis.* 165, 105630. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105630.
- Folstein, M. F., Folstein, S. E., and McHugh, P. R. (1975). "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 12, 189–198. doi: 10.1016/0022-3956(75)90026-6.
- Fong, G.-H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66–70. doi: 10.1038/376066a0.
- Forstreuter, F., Lucius, R., and Mentlein, R. (2002). Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. *J. Neuroimmunol.* 132, 93–98. doi: 10.1016/S0165-5728(02)00315-6.
- Francis, P., Palmer, A., Snape, M., and Wilcock, G. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 66, 137–147.
- Frisoni, G. B., Altomare, D., Thal, D. R., Ribaldi, F., van der Kant, R., Ossenkoppele, R., et al. (2022). The probabilistic model of Alzheimer disease: the amyloid hypothesis revised. *Nat. Rev. Neurosci.* 23, 53–66. doi: 10.1038/s41583-021-00533-w.
- Frisoni, G. B., Prestia, A., Zanetti, O., Galluzzi, S., Romano, M., Cotelli, M., et al. (2009). Markers of Alzheimer's disease in a population attending a memory clinic. *Alzheimers Dement.* 5, 307–317. doi: 10.1016/j.jalz.2009.04.1235.
- Fuh, G., Garcia, K. C., and de Vos, A. M. (2000). The Interaction of Neuropilin-1 with Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor Flt-1. *J. Biol. Chem.* 275, 26690–26695. doi: 10.1016/S0021-9258(19)61431-6.
- Garcia, K. O., Ornellas, F. L. M., Martin, P. K. M., Patti, C. L., Mello, L. E., Frussa-Filho, R., et al. (2014). Therapeutic effects of the transplantation of VEGF overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells in the hippocampus of murine model of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 6. doi: 10.3389/fnagi.2014.00030.
- Gerber, H.-P., Condorelli, F., Park, J., and Ferrara, N. (1997). Differential Transcriptional Regulation of the Two Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Genes. *J. Biol. Chem.* 272, 23659–23667. doi: 10.1074/jbc.272.38.23659.
- Gerrits, E., Brouwer, N., Kooistra, S. M., Woodbury, M. E., Vermeiren, Y., Lambourne, M., et al. (2021). Distinct amyloid- β and tau-associated microglia profiles in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 141, 681–696. doi: 10.1007/s00401-021-02263-w.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., et al. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 330, 841–845. doi: 10.1126/science.1194637.
- Gispert, J. D., Suárez-Calvet, M., Monté, G. C., Tsucholka, A., Falcon, C., Rojas, S., et al. (2016). Cerebrospinal fluid sTREM2 levels are associated with gray matter volume increases and reduced diffusivity in early Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 12, 1259–1272. doi: 10.1016/j.jalz.2016.06.005.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 349, 704–706. doi: 10.1038/349704a0.
- Goedert, M., Wischik, C. M., Crowther, R. A., Walker, J. E., and Klug, A. (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, 4051–4055. doi: 10.1073/pnas.85.11.4051.
- Goldmann, T., Wieghofer, P., Jordão, M. J. C., Prutek, F., Hagemeyer, N., Frenzel, K., et al. (2016). Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat. Immunol.* 17, 797–805. doi: 10.1038/ni.3423.
- Gomes, L. A., Hipp, S. A., Rijal Upadhaya, A., Balakrishnan, K., Ospitalieri, S., Koper, M. J., et al. (2019). A β -induced acceleration of Alzheimer-related τ -pathology spreading and its association with prion protein. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 138, 913–941. doi: 10.1007/s00401-019-02053-5.
- Gomez-Nicola, D., and Boche, D. (2015). Post-mortem analysis of neuroinflammatory changes in human Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 7, 42. doi: 10.1186/s13195-015-0126-1.
- Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M. H., Clohisey, S., Baillie, J. K., Stevens, M. P., et al. (2016). Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat. Neurosci.* 19, 504–516. doi: 10.1038/nn.4222.
- Gratuze, M., Chen, Y., Parhizkar, S., Jain, N., Strickland, M. R., Serrano, J. R., et al. (2021). Activated microglia mitigate A β -associated tau seeding and spreading. *J. Exp. Med.* 218, e20210542. doi: 10.1084/jem.20210542.
- Gratuze, M., Leyns, C. E. G., Sauerbeck, A. D., St-Pierre, M.-K., Xiong, M., Kim, N., et al. (2020). Impact of TREM2R47H variant on tau pathology-induced gliosis and neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 130, 4954–4968. doi: 10.1172/JCI138179.
- Gratuze, M., Schlachetzki, J. C. M., D'Oliveira Albanus, R., Jain, N., Novotny, B., Brase, L., et al. (2023). TREM2-independent microgliosis promotes tau-mediated neurodegeneration in the presence of ApoE4. *Neuron* 111, 202-219.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2022.10.022.
- Guerreiro, R., and Bras, J. (2015). The age factor in Alzheimer's disease. *Genome Med.* 7, 106. doi: 10.1186/s13073-015-0232-5.
- Guerreiro, R., Brás, J., and Hardy, J. (2013a). SnapShot: genetics of Alzheimer's disease. *Cell* 155, 968-968.e1. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.037.
- Guerreiro, R. J., Baquero, M., Blesa, R., Boada, M., Brás, J. M., Bullido, M. J., et al. (2010). Genetic screening of Alzheimer's disease genes in Iberian and African samples yields novel mutations in presenilins and APP. *Neurobiol. Aging* 31, 725–731. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.06.012.
- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., et al. (2013b). TREM2 Variants in Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 117–127. doi: 10.1056/NEJMoa1211851.
- Guo, H., Xia, D., Liao, S., Niu, B., Tang, J., Hu, H., et al. (2019). Vascular endothelial growth factor improves the cognitive decline of Alzheimer's disease via concurrently inducing the expression of ADAM10 and reducing the expression of β -site APP cleaving enzyme 1 in Tg2576 mice. *Neurosci. Res.* 142, 49–57. doi: 10.1016/j.neures.2018.04.003.
- Guo, J. L., Narasimhan, S., Changolkar, L., He, Z., Stieber, A., Zhang, B., et al. (2016). Unique pathological tau conformers from Alzheimer's brains transmit tau pathology in nontransgenic mice. *J. Exp. Med.* 213, 2635–2654. doi: 10.1084/jem.20160833.
- Guo, L.-H., Alexopoulos, P., and Pernecky, R. (2013). Heart-type fatty acid binding protein and vascular endothelial growth factor: cerebrospinal fluid biomarker candidates for Alzheimer's disease. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 263, 553–560. doi: 10.1007/s00406-013-0405-4.
- Hampel, H., Hardy, J., Blennow, K., Chen, C., Perry, G., Kim, S. H., et al. (2021). The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Mol. Psychiatry* 26, 5481–5503. doi: 10.1038/s41380-021-01249-0.

- Han, J., Fan, Y., Zhou, K., Blomgren, K., and Harris, R. A. (2021). Uncovering sex differences of rodent microglia. *J. Neuroinflammation* 18, 74. doi: 10.1186/s12974-021-02124-z.
- Han, K.-Y., Dugas-Ford, J., Lee, H., Chang, J.-H., and Azar, D. T. (2015). MMP14 Cleavage of VEGFR1 in the Cornea Leads to a VEGF-Trap Antiangiogenic Effect. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 5450–5456. doi: 10.1167/iovs.14-16248.
- Hanseeuw, B. J., Betensky, R. A., Jacobs, H. I. L., Schultz, A. P., Sepulcre, J., Becker, J. A., et al. (2019). Association of Amyloid and Tau With Cognition in Preclinical Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 76, 915–924. doi: 10.1001/jamaneurol.2019.1424.
- Harris, R., Miners, J. S., Allen, S., and Love, S. (2018). VEGFR1 and VEGFR2 in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 61, 741–752. doi: 10.3233/JAD-170745.
- Harrison, T. M., Maass, A., Baker, S. L., and Jagust, W. J. (2018). Brain morphology, cognition, and β -amyloid in older adults with superior memory performance. *Neurobiol. Aging* 67, 162–170. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.03.024.
- Harry, G. J. (2013). Microglia During Development and Aging. *Pharmacol. Ther.* 139, 313–326. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.04.013.
- Hartley, D., Blumenthal, T., Carrillo, M., DiPaolo, G., Esralew, L., Gardiner, K., et al. (2015). Down syndrome and Alzheimer's disease: Common pathways, common goals. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 11, 700–709. doi: 10.1016/j.jalz.2014.10.007.
- Hattori, Y. (2022). The microglia-blood vessel interactions in the developing brain. *Neurosci. Res.*, S0168010222002498. doi: 10.1016/j.neures.2022.09.006.
- He, Z., Guo, J. L., McBride, J. D., Narasimhan, S., Kim, H., Changolkar, L., et al. (2018). Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nat. Med.* 24, 29–38. doi: 10.1038/nm.4443.
- Hellwig, S., Masuch, A., Nestel, S., Katzmarski, N., Meyer-Luehmann, M., and Biber, K. (2015). Forebrain microglia from wild-type but not adult 5xFAD mice prevent amyloid- β plaque formation in organotypic hippocampal slice cultures. *Sci. Rep.* 5, 14624. doi: 10.1038/srep14624.
- Hemonnot-Girard, A.-L., Meersseman, C., Pastore, M., Garcia, V., Linck, N., Rey, C., et al. (2022). Comparative analysis of transcriptome remodeling in plaque-associated and plaque-distant microglia during amyloid- β pathology progression in mice. *J. Neuroinflammation* 19, 234. doi: 10.1186/s12974-022-02581-0.
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Saecker, A., et al. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature* 493, 674–678. doi: 10.1038/nature11729.
- Herrán, E., Pérez-González, R., Igartua, M., Pedraz, J. L., Carro, E., and Hernández, R. M. (2013). VEGF-releasing biodegradable nanospheres administered by craniotomy: A novel therapeutic approach in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *J. Controlled Release* 170, 111–119. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.04.028.
- Heslegrave, A., Heywood, W., Paterson, R., Magdalinos, N., Svensson, J., Johansson, P., et al. (2016). Increased cerebrospinal fluid soluble TREM2 concentration in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 11. doi: 10.1186/s13024-016-0071-x.
- Hick, M., Herrmann, U., Weyer, S. W., Mallm, J.-P., Tschäpe, J.-A., Borgers, M., et al. (2015). Acute function of secreted amyloid precursor protein fragment APP α in synaptic plasticity. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 21–37. doi: 10.1007/s00401-014-1368-x.
- Hillaireau, H., and Couvreur, P. (2009). Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. 25.

- Hiratsuka, S., Kataoka, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Morikawa, S., Tanaka, S., et al. (2005). Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) Is Involved in Guidance of VEGF Receptor-Positive Cells to the Anterior Portion of Early Embryos. *Mol. Cell. Biol.* 25, 355–363. doi: 10.1128/MCB.25.1.355-363.2005.
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., and Shibuya, M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9349–9354.
- Hohman, T. J., Bell, S. P., and Jefferson, A. L. (2015). The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Neurodegeneration and Cognitive Decline: Exploring Interactions with Biomarkers of Alzheimer's Disease. *JAMA Neurol.* 72, 520–529. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.4761.
- Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J.-C., Carrasquillo, M. M., et al. (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 43, 429–435. doi: 10.1038/ng.803.
- Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., et al. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352, 712–716. doi: 10.1126/science.aad8373.
- Hong, W., Wang, Z., Liu, W., O'Malley, T. T., Jin, M., Willem, M., et al. (2018). Diffusible, highly bioactive oligomers represent a critical minority of soluble A β in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 136, 19–40. doi: 10.1007/s00401-018-1846-7.
- Hopperton, K. E., Mohammad, D., Trépanier, M. O., Giuliano, V., and Bazinet, R. P. (2018). Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review. *Mol. Psychiatry* 23, 177–198. doi: 10.1038/mp.2017.246.
- Hoshiko, M., Arnoux, I., Avignone, E., Yamamoto, N., and Audinat, E. (2012). Deficiency of the Microglial Receptor CX3CR1 Impairs Postnatal Functional Development of Thalamocortical Synapses in the Barrel Cortex. *J. Neurosci.* 32, 15106–15111. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1167-12.2012.
- Hou, J., Chen, Y., Grajales-Reyes, G., and Colonna, M. (2022). TREM2 dependent and independent functions of microglia in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 17, 84. doi: 10.1186/s13024-022-00588-y.
- Hristovska, I., Robert, M., Combet, K., Honnorat, J., Comte, J.-C., and Pascual, O. (2022). Sleep decreases neuronal activity control of microglial dynamics in mice. *Nat. Commun.* 13, 6273. doi: 10.1038/s41467-022-34035-9.
- Hsia, H.-E., Tüshaus, J., Brummer, T., Zheng, Y., Scilabra, S. D., and Lichtenthaler, S. F. (2019). Functions of 'A disintegrin and metalloproteases (ADAMs)' in the mammalian nervous system. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 3055–3081. doi: 10.1007/s00018-019-03173-7.
- Hu, Y., Fryatt, G. L., Ghorbani, M., Obst, J., Menassa, D. A., Martin-Estebane, M., et al. (2021). Replicative senescence dictates the emergence of disease-associated microglia and contributes to A β pathology. *Cell Rep.* 35, 109228. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109228.
- Huang, K., Andersson, C., Roomans, G. M., Ito, N., and Claesson-Welsh, L. (2001). Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 315–324. doi: 10.1016/S1357-2725(01)00019-X.
- Huang, Y., and Mahley, R. W. (2014). Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer's Diseases. *Neurobiol. Dis.* 72PA, 3–12. doi: 10.1016/j.nbd.2014.08.025.
- Huang, Y., Wang, J., Zhu, B., and Fu, P. (2020). CSF VEGF Was Positively Associated with Neurogranin Independent of β -Amyloid Pathology. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 16, 1737–1744. doi: 10.2147/NDT.S252008.

- Hung, A. Y., Koo, E. H., Haass, C., and Selkoe, D. J. (1992). Increased expression of beta-amyloid precursor protein during neuronal differentiation is not accompanied by secretory cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9439–9443. doi: 10.1073/pnas.89.20.9439.
- Igarashi, K., Isohara, T., Kato, T., Shigeta, K., Yamano, T., and Uno, I. (1998). Tyrosine 1213 of Flt-1 Is a Major Binding Site of Nck and SHP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 95–99. doi: 10.1006/bbrc.1998.8578.
- Iliff, J. J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B. A., Peng, W., Gundersen, G. A., et al. (2012). A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β . *Sci. Transl. Med.* 4, 147ra111. doi: 10.1126/scitranslmed.3003748.
- Illouz, T., Nicola, R., Ben-Shushan, L., Madar, R., Biragyn, A., and Okun, E. (2021). Maternal antibodies facilitate Amyloid- β clearance by activating Fc-receptor-Syk-mediated phagocytosis. *Commun. Biol.* 4, 329. doi: 10.1038/s42003-021-01851-6.
- Ishizawa, T., Mattila, P., Davies, P., Wang, D., and Dickson, D. W. (2003). Colocalization of Tau and Alpha-Synuclein Epitopes in Lewy Bodies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 389–397. doi: 10.1093/jnen/62.4.389.
- Ismail, R., Parbo, P., Madsen, L. S., Hansen, A. K., Hansen, K. V., Schaldemose, J. L., et al. (2020). The relationships between neuroinflammation, beta-amyloid and tau deposition in Alzheimer's disease: a longitudinal PET study. *J. Neuroinflammation* 17. doi: 10.1186/s12974-020-01820-6.
- Ito, N., Wernstedt, C., Engström, U., and Claesson-Welsh, L. (1998). Identification of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Tyrosine Phosphorylation Sites and Binding of SH2 Domain-containing Molecules. *J. Biol. Chem.* 273, 23410–23418. doi: 10.1074/jbc.273.36.23410.
- Iturria-Medina, Y., Sotero, R. C., Toussaint, P. J., Mateos-Pérez, J. M., and Evans, A. C. (2016). Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nat. Commun.* 7, 1–14. doi: 10.1038/ncomms11934.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., and Ihara, Y. (1994). Visualization of A β 42(43) and A β 40 in senile plaques with end-specific A β monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A β 42(43). *Neuron* 13, 45–53. doi: 10.1016/0896-6273(94)90458-8.
- Jack, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Feldman, H. H., Frisoni, G. B., et al. (2016). A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology* 87, 539–547. doi: 10.1212/WNL.0000000000002923.
- Jack, C. R., Knopman, D. S., Jagust, W. J., Petersen, R. C., Weiner, M. W., Aisen, P. S., et al. (2013). Update on hypothetical model of Alzheimer's disease biomarkers. *Lancet Neurol.* 12, 207–216. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70291-0.
- Jankowsky, J. L., and Zheng, H. (2017). Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 12, 89. doi: 10.1186/s13024-017-0231-7.
- Jiang, T., Tan, L., Chen, Q., Tan, M.-S., Zhou, J.-S., Zhu, X.-C., et al. (2016). A rare coding variant in TREM2 increases risk for Alzheimer's disease in Han Chinese. *Neurobiol. Aging* 42, 217.e1–3. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.02.023.
- Jiang, T., Tan, L., Zhu, X.-C., Zhou, J.-S., Cao, L., Tan, M.-S., et al. (2015). Silencing of TREM2 exacerbates tau pathology, neurodegenerative changes, and spatial learning deficits in P301S tau transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 36, 3176–3186. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.019.

- Jiang, T., Wan, Y., Zhang, Y.-D., Zhou, J.-S., Gao, Q., Zhu, X.-C., et al. (2017). TREM2 Overexpression has No Improvement on Neuropathology and Cognitive Impairment in Aging APP^{swe}/PS1^{dE9} Mice. *Mol. Neurobiol.* 54, 855–865. doi: 10.1007/s12035-016-9704-x.
- Jin, M., Shiwaku, H., Tanaka, H., Obita, T., Ohuchi, S., Yoshioka, Y., et al. (2021). Tau activates microglia via the PQBP1-cGAS-STING pathway to promote brain inflammation. *Nat. Commun.* 12, 6565. doi: 10.1038/s41467-021-26851-2.
- Jin, S. C., Benitez, B. A., Karch, C. M., Cooper, B., Skorupa, T., Carrell, D., et al. (2014). Coding variants in TREM2 increase risk for Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 23, 5838–5846. doi: 10.1093/hmg/ddu277.
- Johansson, A.-S., Berglind-Dehlin, F., Karlsson, G., Edwards, K., Gellerfors, P., and Lannfelt, L. (2006). Physicochemical characterization of the Alzheimer's disease-related peptides A β 1–42^{Arctic} and A β 1–42^{wt}. *FEBS J.* 273, 2618–2630. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05263.x.
- Jonsson, T., Atwal, J. K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P. V., Bjornsson, S., et al. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488, 96–99. doi: 10.1038/nature11283.
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. V., Snaedal, J., et al. (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 107–116. doi: 10.1056/NEJMoa1211103.
- Justiniano, S. E., Elavazhagan, S., Fatehchand, K., Shah, P., Mehta, P., Roda, J. M., et al. (2013). Fc γ Receptor-induced Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 (VEGFR-1) Production Inhibits Angiogenesis and Enhances Efficacy of Anti-tumor Antibodies. *J. Biol. Chem.* 288, 26800–26809. doi: 10.1074/jbc.M113.485185.
- Kamino, K., Orr, H. T., Payami, H., Wijsman, E. M., Alonso, Ma. E., Pulst, S. M., et al. (1992). Linkage and mutational analysis of familial Alzheimer disease kindreds for the APP gene region. *Am. J. Hum. Genet.* 51, 998–1014.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., et al. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325, 733–736. doi: 10.1038/325733a0.
- Karch, C. M., and Goate, A. M. (2015). Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol. Psychiatry* 77, 43–51. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.05.006.
- Katsinelos, T., Tuck, B. J., Mukadam, A. S., and McEwan, W. A. (2019). The Role of Antibodies and Their Receptors in Protection Against Ordered Protein Assembly in Neurodegeneration. *Front. Immunol.* 10, 1139. doi: 10.3389/fimmu.2019.01139.
- Kavanagh, T., Halder, A., and Drummond, E. (2022). Tau interactome and RNA binding proteins in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurodegener.* 17, 66. doi: 10.1186/s13024-022-00572-6.
- Kayed, R., Head, E., Sarsoza, F., Saing, T., Cotman, C. W., Neucula, M., et al. (2007). Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers. *Mol. Neurodegener.* 2, 18. doi: 10.1186/1750-1326-2-18.
- Kayed, R., and Lasagna-Reeves, C. A. (2012). Molecular Mechanisms of Amyloid Oligomers Toxicity. *J. Alzheimers Dis.* 33, S67–S78. doi: 10.3233/JAD-2012-129001.
- Kendall, R. L., and Thomas, K. A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10705–10709.

- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., et al. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* 169, 1276–1290.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.018.
- Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E. G., et al. (2013). Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat. Neurosci.* 16, 273–280. doi: 10.1038/nn.3318.
- Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., and Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* 4, 575–590. doi: 10.1016/j.trci.2018.06.014.
- Kitazawa, M., Cheng, D., Tsukamoto, M., Koike, M., Wes, P. D., Vasilevko, V., et al. (2011). Blocking Interleukin-1 Signaling Rescues Cognition, Attenuates Tau Pathology, and Restores Neuronal β -Catenin Pathway Function in an Alzheimer's Disease Model. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 187, 6539–6549. doi: 10.4049/jimmunol.1100620.
- Kleinberger, G., Yamanishi, Y., Suarez-Calvet, M., Czirr, E., Lohmann, E., Cuyvers, E., et al. (2014). TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Sci. Transl. Med.* 6, 243ra86–243ra86. doi: 10.1126/scitranslmed.3009093.
- Knowles, R. B., Wyart, C., Buldyrev, S. V., Cruz, L., Urbanc, B., Hasselmo, M. E., et al. (1999). Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural networks in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 5274–5279. doi: 10.1073/pnas.96.9.5274.
- Kobayashi, S., Sawano, A., Nojima, Y., Shibuya, M., and Maru, Y. (2004). The c-Cbl/CD2AP complex regulates VEGF-induced endocytosis and degradation of Flt-1 (VEGFR-1). *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 929–931. doi: 10.1096/fj.03-0767fje.
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., and Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. J.* 437, 169–183. doi: 10.1042/BJ20110301.
- Koffie, R. M., Meyer-Luehmann, M., Hashimoto, T., Adams, K. W., Mielke, M. L., Garcia-Alloza, M., et al. (2009). Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4012–4017. doi: 10.1073/pnas.0811698106.
- Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., et al. (2007). UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* 446, 1091–1095. doi: 10.1038/nature05704.
- Koo, E. H., and Squazzo, S. L. (1994). Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 269, 17386–17389. doi: 10.1016/S0021-9258(17)32449-3.
- Köpke, E., Tung, Y. C., Shaikh, S., Alonso, A. C., Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (1993). Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 268, 24374–24384.
- Kracht, L., Borggrewe, M., Eskandar, S., Brouwer, N., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Laman, J. D., et al. (2020). Human fetal microglia acquire homeostatic immune-sensing properties early in development. *Science* 369, 530–537. doi: 10.1126/science.aba5906.
- Kreisel, T., Wolf, B., Keshet, E., and Licht, T. (2019). Unique role for dentate gyrus microglia in neuroblast survival and in VEGF-induced activation. *Glia* 67, 594–618. doi: 10.1002/glia.23505.
- Kunkle, B. W., Grenier-Boley, B., Sims, R., Bis, J. C., Damotte, V., Naj, A. C., et al. (2019). Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nat. Genet.* 51, 414–430. doi: 10.1038/s41588-019-0358-2.

- LaFerla, F. M., Green, K. N., and Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 499–509. doi: 10.1038/nrn2168.
- Lai, K. S. P., Liu, C. S., Rau, A., Lanctôt, K. L., Köhler, C. A., Pakosh, M., et al. (2017). Peripheral inflammatory markers in Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of 175 studies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 88, 876–882. doi: 10.1136/jnnp-2017-316201.
- Lai, Y., Wahyuningtyas, R., Aui, S., and Chang, K. (2019). Autocrine VEGF signalling on M2 macrophages regulates PD-L1 expression for immunomodulation of T cells. *J. Cell. Mol. Med.* 23, 1257–1267. doi: 10.1111/jcmm.14027.
- Lalli, M. A., Bettcher, B. M., Arcila, M. L., Garcia, G., Guzman, C., Madrigal, L., et al. (2015). Whole-genome sequencing suggests a chemokine gene cluster that modifies age at onset in familial Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* 20, 1294–1300. doi: 10.1038/mp.2015.131.
- Lambert, J.-C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 41, 1094–1099. doi: 10.1038/ng.439.
- Lambrecht, B. N., Vanderkerken, M., and Hammad, H. (2018). The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 745–758. doi: 10.1038/s41577-018-0068-5.
- Lampugnani, M. G., Orsenigo, F., Gagliani, M. C., Tacchetti, C., and Dejana, E. (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *J. Cell Biol.* 174, 593–604. doi: 10.1083/jcb.200602080.
- Lane, C. A., Hardy, J., and Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* 25, 59–70. doi: 10.1111/ene.13439.
- Lange, C., Storkebaum, E., de Almodóvar, C. R., Dewerchin, M., and Carmeliet, P. (2016). Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. *Nat. Rev. Neurol.* 12, 439–454. doi: 10.1038/nrneurol.2016.88.
- Lara, E., Acurio, J., Leon, J., Penny, J., Torres-Vergara, P., and Escudero, C. (2018). Are the Cognitive Alterations Present in Children Born From Preeclamptic Pregnancies the Result of Impaired Angiogenesis? Focus on the Potential Role of the VEGF Family. *Front. Physiol.* 9, 1591. doi: 10.3389/fphys.2018.01591.
- Lau, V., Ramer, L., and Tremblay, M.-È. (2023). An aging, pathology burden, and glial senescence build-up hypothesis for late onset Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* 14, 1670. doi: 10.1038/s41467-023-37304-3.
- Lee, S.-H., Meilandt, W. J., Xie, L., Gandham, V. D., Ngu, H., Barck, K. H., et al. (2021). Trem2 restrains the enhancement of tau accumulation and neurodegeneration by β -amyloid pathology. *Neuron* 109, 1283-1301.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2021.02.010.
- Lelli, A., Gervais, A., Colin, C., Chéret, C., de Almodovar, C. R., Carmeliet, P., et al. (2013). The NADPH oxidase Nox2 regulates VEGFR1/CSF-1R-mediated microglial chemotaxis and promotes early postnatal infiltration of phagocytes in the subventricular zone of the mouse cerebral cortex: Microglial Nox2 in Development. *Glia* 61, 1542–1555. doi: 10.1002/glia.22540.
- Leng, F., and Edison, P. (2021a). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat. Rev. Neurol.* 17, 157–172. doi: 10.1038/s41582-020-00435-y.
- Leng, F., and Edison, P. (2021b). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat. Rev. Neurol.* 17, 157–172. doi: 10.1038/s41582-020-00435-y.

- Leng, F., Hinz, R., Gentleman, S., Hampshire, A., Dani, M., Brooks, D. J., et al. (2023). Neuroinflammation is independently associated with brain network dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* 28, 1303–1311. doi: 10.1038/s41380-022-01878-z.
- Lessard, C. B., Malnik, S. L., Zhou, Y., Ladd, T. B., Cruz, P. E., Ran, Y., et al. (2018). High-affinity interactions and signal transduction between A β oligomers and TREM2. *EMBO Mol. Med.* 10. doi: 10.15252/emmm.201809027.
- Lesslie, D. P., Summy, J. M., Parikh, N. U., Fan, F., Trevino, J. G., Sawyer, T. K., et al. (2006). Vascular endothelial growth factor receptor-1 mediates migration of human colorectal carcinoma cells by activation of Src family kinases. *Br. J. Cancer* 94, 1710–1717. doi: 10.1038/sj.bjc.6603143.
- Leung, Y. Y., Toledo, J. B., Nefedov, A., Polikar, R., Raghavan, N., Xie, S. X., et al. (2015). Identifying amyloid pathology-related cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease in a multicohort study. *Alzheimers Dement. Diagn. Assess. Dis. Monit.* 1, 339–348. doi: 10.1016/j.dadm.2015.06.008.
- Levine, K. S., Leonard, H. L., Blauwendraat, C., Iwaki, H., Johnson, N., Bandres-Ciga, S., et al. (2023). Virus exposure and neurodegenerative disease risk across national biobanks. *Neuron*, S0896627322011473. doi: 10.1016/j.neuron.2022.12.029.
- Levy, E., Carman, M. D., Fernandez-Madrid, I. J., Power, M. D., Lieberburg, I., van Duinen, S. G., et al. (1990). Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science* 248, 1124–1126. doi: 10.1126/science.2111584.
- Li, Y., Du, X., Liu, C., Wen, Z., and Du, J. (2012). Reciprocal Regulation between Resting Microglial Dynamics and Neuronal Activity In Vivo. *Dev. Cell* 23, 1189–1202. doi: 10.1016/j.devcel.2012.10.027.
- Lian, H., Litvinchuk, A., Chiang, A. C.-A., Aithmitti, N., Jankowsky, J. L., and Zheng, H. (2016). Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 577–589. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2117-15.2016.
- Liang, C.-S., Tsai, C.-L., Lin, G.-Y., Lee, J.-T., Lin, Y.-K., Chu, C.-S., et al. (2021). Better Identification of Cognitive Decline With Interleukin-2 Than With Amyloid and Tau Protein Biomarkers in Amnesic Mild Cognitive Impairment. *Front. Aging Neurosci.* 13, 670115. doi: 10.3389/fnagi.2021.670115.
- Licht, T., Goshen, I., Avital, A., Kreisel, T., Zubedat, S., Eavri, R., et al. (2011). Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5081–5086. doi: 10.1073/pnas.1007640108.
- Licht, T., and Keshet, E. (2013). Delineating multiple functions of VEGF-A in the adult brain. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1727–1737. doi: 10.1007/s00018-013-1280-x.
- Licht, T., Kreisel, T., Biala, Y., Mohan, S., Yaari, Y., Anisimov, A., et al. (2020). Age-Dependent Remarkable Regenerative Potential of the Dentate Gyrus Provided by Intrinsic Stem Cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 40, 974–995. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1010-19.2019.
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487. doi: 10.1038/nature21029.
- Ling, M., Quan, L., Lai, X., Lang, L., Li, F., Yang, X., et al. (2021). VEGFB Promotes Myoblasts Proliferation and Differentiation through VEGFR1-PI3K/Akt Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 13352. doi: 10.3390/ijms222413352.

- Linnartz, B., Kopatz, J., Tenner, A. J., and Neumann, H. (2012). Sialic Acid on the Neuronal Glycocalyx Prevents Complement C1 Binding and Complement Receptor-3-Mediated Removal by Microglia. *J. Neurosci.* 32, 946–952. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3830-11.2012.
- Liu, C. Y., Ohki, Y., Tomita, T., Osawa, S., Reed, B. R., Jagust, W., et al. (2017). Two Novel Mutations in the First Transmembrane Domain of Presenilin1 Cause Young-Onset Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* 58, 1035–1041. doi: 10.3233/JAD-161203.
- Liu, H., Wang, J., Wang, J., Wang, P., and Xue, Y. (2015). Paeoniflorin attenuates A β 1-42-induced inflammation and chemotaxis of microglia in vitro and inhibits NF- κ B- and VEGF/Flt-1 signaling pathways. *Brain Res.* 1618, 149–158. doi: 10.1016/j.brainres.2015.05.035.
- Liu, M., Sui, D., Dexheimer, T., Hovde, S., Deng, X., Wang, K.-W., et al. (2020). Hyperphosphorylation Renders Tau Prone to Aggregate and to Cause Cell Death. *Mol. Neurobiol.* 57, 4704–4719. doi: 10.1007/s12035-020-02034-w.
- Liu, Z., Condello, C., Schain, A., Harb, R., and Grutzendler, J. (2010). CX3CR1 in Microglia Regulates Brain Amyloid Deposition through Selective Protofibrillar Amyloid- β Phagocytosis. *J. Neurosci.* 30, 17091–17101. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4403-10.2010.
- Lizano, P. L., Yao, J. K., Tandon, N., Mothi, S. S., Montrose, D. M., and Keshavan, M. S. (2017). Association of sFlt-1 and Worsening Psychopathology in relatives at High Risk for Psychosis: A Longitudinal Study. *Schizophr. Res.* 183, 75–81. doi: 10.1016/j.schres.2016.11.015.
- Long, J. M., and Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* 179, 312–339. doi: 10.1016/j.cell.2019.09.001.
- Louveau, A., Plog, B. A., Antila, S., Alitalo, K., Nedergaard, M., and Kipnis, J. (2017). Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *J. Clin. Invest.* 127, 3210–3219. doi: 10.1172/JCI90603.
- Lowell, C. A. (2011). Src-family and Syk Kinases in Activating and Inhibitory Pathways in Innate Immune Cells: Signaling Cross Talk. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a002352. doi: 10.1101/cshperspect.a002352.
- Lučiūnaitė, A., McManus, R. M., Jankunec, M., Rácz, I., Dansokho, C., Dalgėdienė, I., et al. (2020). Soluble A β oligomers and protofibrils induce NLRP3 inflammasome activation in microglia. *J. Neurochem.* 155, 650–661. doi: 10.1111/jnc.14945.
- Luo, W., Liu, W., Hu, X., Hanna, M., Caravaca, A., and Paul, S. M. (2015). Microglial internalization and degradation of pathological tau is enhanced by an anti-tau monoclonal antibody. *Sci. Rep.* 5, 11161. doi: 10.1038/srep11161.
- Maharaj, A. S. R., Saint-Geniez, M., Maldonado, A. E., and D'Amore, P. A. (2006). Vascular Endothelial Growth Factor Localization in the Adult. *Am. J. Pathol.* 168, 639–648. doi: 10.2353/ajpath.2006.050834.
- Mahoney, E. R., Dumitrescu, L., Moore, A. M., Cambroner, F. E., De Jager, P. L., Koran, M. E. I., et al. (2021). Brain expression of the vascular endothelial growth factor gene family in cognitive aging and alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* 26, 888–896. doi: 10.1038/s41380-019-0458-5.
- Majka, S., McGuire, P. G., and Das, A. (2002). Regulation of Matrix Metalloproteinase Expression by Tumor Necrosis Factor in a Murine Model of Retinal Neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 260–266.
- Malashenkova, I. K., Khailov, N. A., Krynskii, S. A., Ogurtsov, D. P., Kazanova, G. V., Velichkovskii, B. B., et al. (2017). Levels of Proinflammatory Cytokines and Growth Factor VEGF in Patients with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Neurosci. Behav. Physiol.* 47, 694–698. doi: 10.1007/s11055-017-0457-4.

- Mandelkow, E., von Bergen, M., Biernat, J., and Mandelkow, E.-M. (2007). Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 17, 83–90. doi: 10.1111/j.1750-3639.2007.00053.x.
- Mañucat-Tan, N. B., Saadipour, K., Wang, Y.-J., Bobrovskaya, L., and Zhou, X.-F. (2019). Cellular Trafficking of Amyloid Precursor Protein in Amyloidogenesis Physiological and Pathological Significance. *Mol. Neurobiol.* 56, 812–830. doi: 10.1007/s12035-018-1106-9.
- Maretzky, T., Evers, A., Zhou, W., Swendeman, S. L., Wong, P.-M., Rafii, S., et al. (2011a). Migration of FGF7-stimulated epithelial cells and VEGF-A-stimulated HUVECs depends on EGFR transactivation by ADAM17. *Nat. Commun.* 2, 229. doi: 10.1038/ncomms1232.
- Maretzky, T., Zhou, W., Huang, X.-Y., and Blobel, C. P. (2011b). A transforming Src mutant increases the bioavailability of EGFR-ligands via stimulation of the cell surface metalloproteinase ADAM17. *Oncogene* 30, 611–618. doi: 10.1038/onc.2010.443.
- Marti, H. H., and Risau, W. (1998). Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15809–15814.
- Martin, E., and Delarasse, C. (2018). Complex role of chemokine mediators in animal models of Alzheimer's Disease. *Biomed. J.* 41, 34–40. doi: 10.1016/j.bj.2018.01.002.
- Martin, L., Bouvet, P., Chounlamountri, N., Watrin, C., Besançon, R., Pinatel, D., et al. (2021). VEGF counteracts amyloid- β -induced synaptic dysfunction. *Cell Rep.* 35, 109121. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109121.
- Masliah, E., Terry, R. D., Mallory, M., Alford, M., and Hansen, L. A. (1990). Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 137, 1293–1297.
- Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4245–4249. doi: 10.1073/pnas.82.12.4245.
- Masuda, T., Sankowski, R., Staszewski, O., Böttcher, C., Amann, L., Sagar, et al. (2019). Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* 566, 388–392. doi: 10.1038/s41586-019-0924-x.
- Matcovitch-Natan, O., Winter, D. R., Giladi, A., Vargas Aguilar, S., Spinrad, A., Sarrazin, S., et al. (2016). Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science* 353, aad8670. doi: 10.1126/science.aad8670.
- Mateo, I., Llorca, J., Infante, J., Rodríguez-Rodríguez, E., Fernández-Viadero, C., Peña, N., et al. (2007). Low serum VEGF levels are associated with Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 116, 56–58. doi: 10.1111/j.1600-0404.2006.00775.x.
- Mathys, H., AdaiKAN, C., Gao, F., Young, J. Z., Manet, E., Hemberg, M., et al. (2017). Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-Cell Resolution. *Cell Rep.* 21, 366–380. doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.039.
- Mattiace, L. A., Davies, P., Yen, S.-H., and Dickson, D. W. (1990). Microglia in cerebellar plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 80, 493–498. doi: 10.1007/BF00294609.
- Mazaheri, F., Breus, O., Durdu, S., Haas, P., Wittbrodt, J., Gilmour, D., et al. (2014). Distinct roles for BAI1 and TIM-4 in the engulfment of dying neurons by microglia. *Nat. Commun.* 5, 4046. doi: 10.1038/ncomms5046.
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Konrad Vbeyreuther, et al. (1999). Soluble pool of A β amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 46, 860–866. doi: 10.1002/1531-8249(199912)46:6<860::AID-ANA8>3.0.CO;2-M.

- McQuade, A., Kang, Y. J., Hasselmann, J., Jairaman, A., Sotelo, A., Coburn, M., et al. (2020). Gene expression and functional deficits underlie TREM2-knockout microglia responses in human models of Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* 11, 5370. doi: 10.1038/s41467-020-19227-5.
- Meesmann, H. M., Fehr, E.-M., Kierschke, S., Herrmann, M., Bilyy, R., Heyder, P., et al. (2010). Decrease of sialic acid residues as an eat-me signal on the surface of apoptotic lymphocytes. *J. Cell Sci.* 123, 3347–3356. doi: 10.1242/jcs.066696.
- Menassa, D. A., and Gomez-Nicola, D. (2018). Microglial Dynamics During Human Brain Development. *Front. Immunol.* 9, 1014. doi: 10.3389/fimmu.2018.01014.
- Mendez, M. F. (2017). Early-Onset Alzheimer's Disease. *Neurol. Clin.* 35, 263–281. doi: 10.1016/j.ncl.2017.01.005.
- Milà-Alomà, M., Ashton, N. J., Shekari, M., Salvadó, G., Ortiz-Romero, P., Montoliu-Gaya, L., et al. (2022). Plasma p-tau231 and p-tau217 as state markers of amyloid- β pathology in preclinical Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 28, 1797–1801. doi: 10.1038/s41591-022-01925-w.
- Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A. W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., et al. (2016). Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat. Commun.* 7, 12540. doi: 10.1038/ncomms12540.
- Montagne, A., Barnes, S. R., Sweeney, M. D., Halliday, M. R., Sagare, A. P., Zhao, Z., et al. (2015). Blood-Brain Barrier Breakdown in the Aging Human Hippocampus. *Neuron* 85, 296–302. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.032.
- Montagne, A., Nation, D. A., Sagare, A. P., Barisano, G., Sweeney, M. D., Chakhoyan, A., et al. (2020). APOE4 leads to blood-brain barrier dysfunction predicting cognitive decline. *Nature* 581, 71–76. doi: 10.1038/s41586-020-2247-3.
- Morenas-Rodríguez, E., Li, Y., Nuscher, B., Franzmeier, N., Xiong, C., Suárez-Calvet, M., et al. (2022). Soluble TREM2 in CSF and its association with other biomarkers and cognition in autosomal-dominant Alzheimer's disease: a longitudinal observational study. *Lancet Neurol.* 21, 329–341. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00027-8.
- Mosher, K. I., Andres, R. H., Fukuhara, T., Bieri, G., Hasegawa-Moriyama, M., He, Y., et al. (2012). Neural progenitor cells regulate microglia functions and activity. *Nat. Neurosci.* 15, 1485–1487. doi: 10.1038/nn.3233.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., et al. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat. Genet.* 1, 345–347. doi: 10.1038/ng0892-345.
- Müller, U. C., Deller, T., and Korte, M. (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 281–298. doi: 10.1038/nrn.2017.29.
- Mutations (2023). *Alzforum Nd*. Available at: <https://www.alzforum.org/mutations>.
- Naj, A. C., Jun, G., Beecham, G. W., Wang, L.-S., Vardarajan, B. N., Buross, J., et al. (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 43, 436–441. doi: 10.1038/ng.801.
- Naj, A. C., Jun, G., Reitz, C., Kunkle, B. W., Perry, W., Park, Y., et al. (2014). Age-at-Onset in Late Onset Alzheimer Disease is Modified by Multiple Genetic Loci. *JAMA Neurol.* 71, 1394–1404. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.1491.
- Nakayama, M., Nakayama, A., Van Lessen, M., Yamamoto, H., Hoffmann, S., Drexler, H. C. A., et al. (2013). Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis. *Nat. Cell Biol.* 15, 249–260. doi: 10.1038/ncb2679.

- Nelson, L. H., Warden, S., and Lenz, K. M. (2017). Sex differences in microglial phagocytosis in the neonatal hippocampus. *Brain. Behav. Immun.* 64, 11–22. doi: 10.1016/j.bbi.2017.03.010.
- Nguyen, A. T., Wang, K., Hu, G., Wang, X., Miao, Z., Azevedo, J. A., et al. (2020). APOE and TREM2 regulate amyloid responsive microglia in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 140, 477–493. doi: 10.1007/s00401-020-02200-3.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314–1318. doi: 10.1126/science.1110647.
- Noda, M., Ifuku, M., Okuno, Y., Beppu, K., Mori, Y., and Naoe, S. (2011). Neuropeptides as Attractants of Immune Cells in the Brain and their Distinct Signaling. *Adv. Neuroimmune Biol.* 1, 53–62. doi: 10.3233/NIB-2011-005.
- Nortley, R., Korte, N., Izquierdo, P., Hirunpattarasilp, C., Mishra, A., Jaunmuktane, Z., et al. (2019). Amyloid β oligomers constrict human capillaries in Alzheimer's disease via signaling to pericytes. *Science* 365, eaav9518. doi: 10.1126/science.aav9518.
- Olsson, B., Lautner, R., Andreasson, U., Öhrfelt, A., Portelius, E., Bjerke, M., et al. (2016). CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 15, 673–684. doi: 10.1016/S1474-4422(16)00070-3.
- Oosthuysen, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., Nuyens, D., Brusselmans, K., et al. (2001). Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat. Genet.* 28, 131–138. doi: 10.1038/88842.
- Ott, M.-O., and Bullock, S. (2001). A gene trap insertion reveals that amyloid precursor protein expression is a very early event in murine embryogenesis. *Dev. Genes Evol.* 211, 355–357. doi: 10.1007/s004270100158.
- Pages, G., and Pouyssegur, J. (2005). Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene? a concert of activating factors. *Cardiovasc. Res.* 65, 564–573. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.09.032.
- Pampuscenko, K., Morkuniene, R., Sneideris, T., Smirnovas, V., Budvytyte, R., Valincius, G., et al. (2020). Extracellular tau induces microglial phagocytosis of living neurons in cell cultures. *J. Neurochem.* 154, 316–329. doi: 10.1111/jnc.14940.
- Pan, X., Zhu, Y., Lin, N., Zhang, J., Ye, Q., Huang, H., et al. (2011). Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid is attenuated by oligomeric β -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 6, 45. doi: 10.1186/1750-1326-6-45.
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M.-E., Aguzzi, A., Ajami, B., et al. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron* 110, 3458–3483. doi: 10.1016/j.neuron.2022.10.020.
- Paranjape, G. S., Terrill, S. E., Gouwens, L. K., Ruck, B. M., and Nichols, M. R. (2013). Amyloid- β (1–42) Protofibrils Formed in Modified Artificial Cerebrospinal Fluid Bind and Activate Microglia. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. Neuroimmune Pharmacol.* 8, 312–322. doi: 10.1007/s11481-012-9424-6.
- Parbo, P., Ismail, R., Hansen, K. V., Amidi, A., Mårup, F. H., Gottrup, H., et al. (2017). Brain inflammation accompanies amyloid in the majority of mild cognitive impairment cases due to Alzheimer's disease. *Brain* 140, 2002–2011. doi: 10.1093/brain/awx120.
- Pardossi-Piquard, R., and Checler, F. (2012). The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J. Neurochem.* 120 Suppl 1, 109–124. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07475.x.

- Paresce, D. M., Chung, H., and Maxfield, F. R. (1997). Slow Degradation of Aggregates of the Alzheimer's Disease Amyloid β -Protein by Microglial Cells. *J. Biol. Chem.* 272, 29390–29397. doi: 10.1074/jbc.272.46.29390.
- Park, M. H., Choi, B. J., Jeong, M. S., Lee, J. Y., Jung, I. K., Park, K. H., et al. (2019). Characterization of the Subventricular-Thalamo-Cortical Circuit in the NP-C Mouse Brain, and New Insights Regarding Treatment. *Mol. Ther.* 27, 1507–1526. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.05.008.
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., Lafaille, J. J., et al. (2013). Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* 155, 1596–1609. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.030.
- Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E. H., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (1999). Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochemistry* 38, 9728–9734. doi: 10.1021/bi9906827.
- Patel, N. S., Mathura, V. S., Bachmeier, C., Beaulieu-Abdelahad, D., Laporte, V., Weeks, O., et al. (2010). Alzheimer's β -amyloid peptide blocks vascular endothelial growth factor mediated signaling via direct interaction with VEGFR-2. *J. Neurochem.* 112, 66–76. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06426.x.
- Paumier, A., Boisseau, S., Jacquier-Sarlin, M., Pernet-Gallay, K., Buisson, A., and Albrieux, M. (2022). Astrocyte–neuron interplay is critical for Alzheimer's disease pathogenesis and is rescued by TRPA1 channel blockade. *Brain* 145, 388–405. doi: 10.1093/brain/awab281.
- Pazzagli, A., and Pepeu, G. (1965). Amnesic properties of scopolamine and brain acetylcholine in the rat. *Int. J. Neuropharmacol.* 4, 291–299. doi: 10.1016/0028-3908(65)90025-0.
- Peacock, M. L., Warren, J. T., Roses, A. D., and Fink, J. K. (1993). Novel polymorphism in the A4 region of the amyloid precursor protein gene in a patient without Alzheimer's disease. *Neurology* 43, 1254–1256. doi: 10.1212/wnl.43.6.1254.
- Pelvig, D. P., Pakkenberg, H., Stark, A. K., and Pakkenberg, B. (2008). Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol. Aging* 29, 1754–1762. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.013.
- Pereira, J. B., Janelidze, S., Strandberg, O., Whelan, C. D., Zetterberg, H., Blennow, K., et al. (2022). Microglial activation protects against accumulation of tau aggregates in nondemented individuals with underlying Alzheimer's disease pathology. *Nat. Aging* 2, 1138–1144. doi: 10.1038/s43587-022-00310-z.
- Piccio, L., Deming, Y., Del-Águila, J. L., Ghezzi, L., Holtzman, D. M., Fagan, A. M., et al. (2016). Cerebrospinal fluid soluble TREM2 is higher in Alzheimer disease and associated with mutation status. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 925–933. doi: 10.1007/s00401-016-1533-5.
- Pichet Binette, A., Janelidze, S., Cullen, N., Dage, J. L., Bateman, R. J., Zetterberg, H., et al. (2022). Confounding factors of Alzheimer's disease plasma biomarkers and their impact on clinical performance. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* doi: 10.1002/alz.12787.
- Plog, B. A., and Nedergaard, M. (2018). The glymphatic system in CNS health and disease: past, present and future. *Annu. Rev. Pathol.* 13, 379–394. doi: 10.1146/annurev-pathol-051217-111018.
- Popescu, A. S., Butler, C. A., Allendorf, D. H., Piers, T. M., Mallach, A., Roewe, J., et al. (2023). Alzheimer's disease-associated R47H TREM2 increases, but wild-type TREM2 decreases, microglial phagocytosis of synaptosomes and neuronal loss. *Glia* 71, 974–990. doi: 10.1002/glia.24318.
- Provias, J., and Jaynes, B. (2014). The Role of the Blood-Brain Barrier in the Pathogenesis of Senile Plaques in Alzheimer's Disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* 2014, 191863. doi: 10.1155/2014/191863.

- Puigdellívol, M., Milde, S., Vilalta, A., Cockram, T. O. J., Allendorf, D. H., Lee, J. Y., et al. (2021). The microglial P2Y6 receptor mediates neuronal loss and memory deficits in neurodegeneration. *Cell Rep.* 37, 110148. doi: 10.1016/j.celrep.2021.110148.
- Qi, F., Zuo, Z., Hu, K., Wang, R., Wu, T., Liu, H., et al. (2023). VEGF-A in serum protects against memory impairment in APP/PS1 transgenic mice by blocking neutrophil infiltration. *Mol. Psychiatry.* doi: 10.1038/s41380-023-02097-w.
- Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S. A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., et al. (2006). A β 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* 7, 940–946. doi: 10.1038/sj.embor.7400784.
- Rahimi, N., Golde, T. E., and Meyer, R. D. (2009). Identification of Ligand-Induced Proteolytic Cleavage and Ectodomain Shedding of VEGFR-1/FLT1 in Leukemic Cancer Cells. *Cancer Res.* 69, 2607–2614. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2905.
- Rahman, M. M., and Lendel, C. (2021). Extracellular protein components of amyloid plaques and their roles in Alzheimer's disease pathology. *Mol. Neurodegener.* 16, 59. doi: 10.1186/s13024-021-00465-0.
- Raikwar, N. S., Liu, K. Z., and Thomas, C. P. (2014). N-Terminal Cleavage and Release of the Ectodomain of Flt1 Is Mediated via ADAM10 and ADAM 17 and Regulated by VEGFR2 and the Flt1 Intracellular Domain. *PLoS ONE* 9, e112794. doi: 10.1371/journal.pone.0112794.
- Raikwar, N. S., Liu, K. Z., and Thomas, C. P. (2016). Ectodomain cleavage of FLT1 regulates receptor activation and function and is not required for its downstream intracellular cleavage. *Exp. Cell Res.* 344, 103–111. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.03.020.
- Raikwar, N. S., Shibuya, M., and Thomas, C. P. (2018). VEGF-A selectively inhibits FLT1 ectodomain shedding independent of receptor activation and receptor endocytosis. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 315, C214–C224. doi: 10.1152/ajpcell.00247.2017.
- Rampon, C., Jiang, C. H., Dong, H., Tang, Y.-P., Lockhart, D. J., Schultz, P. G., et al. (2000). Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12880–12884.
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat. Neurosci.* 19, 987–991. doi: 10.1038/nn.4338.
- Reiss, K., and Bhakdi, S. (2017). The plasma membrane: Penultimate regulator of ADAM sheddase function. 6.
- Religa, P., Cao, R., Religa, D., Xue, Y., Bogdanovic, N., Westaway, D., et al. (2013). VEGF significantly restores impaired memory behavior in Alzheimer's mice by improvement of vascular survival. *Sci. Rep.* 3. doi: 10.1038/srep02053.
- Research models (2023). *Alzforum Nd*. Available at: <https://www.alzforum.org/research-models>.
- Ries, M., and Sastre, M. (2016). Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front. Aging Neurosci.* 8. doi: 10.3389/fnagi.2016.00160.
- Roberson, E. D., Scarce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., et al. (2007). Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid β -Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Science* 316, 750–754. doi: 10.1126/science.1141736.
- Robinson, C. J., and Stringer, S. E. (2001). The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J. Cell Sci.* 114, 853–865. doi: 10.1242/jcs.114.5.853.
- Röhr, D., Boon, B. D. C., Schuler, M., Kremer, K., Hoozemans, J. J. M., Bouwman, F. H., et al. (2020). Label-free vibrational imaging of different A β plaque types in Alzheimer's disease reveals

- sequential events in plaque development. *Acta Neuropathol. Commun.* 8, 222. doi: 10.1186/s40478-020-01091-5.
- Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ioannidou, S., Fujisawa, H., et al. (2002). Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.* 16, 2684–2698. doi: 10.1101/gad.242002.
- Ruiz de Almodovar, C., Coulon, C., Salin, P. A., Knevels, E., Chounlamountri, N., Poesen, K., et al. (2010). Matrix-Binding Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Isoforms Guide Granule Cell Migration in the Cerebellum via VEGF Receptor Flk1. *J. Neurosci.* 30, 15052–15066. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0477-10.2010.
- Ruiz de Almodovar, C., Lambrechts, D., Mazzone, M., and Carmeliet, P. (2009). Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol. Rev.* 89, 607–648. doi: 10.1152/physrev.00031.2008.
- Ryu, J. K., Cho, T., Choi, H. B., Wang, Y. T., and McLarnon, J. G. (2009). Microglial VEGF Receptor Response Is an Integral Chemotactic Component in Alzheimer's Disease Pathology. *J. Neurosci.* 29, 3–13. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2888-08.2009.
- Sadleir, K. R., Kandalepas, P. C., Buggia-Prévo, V., Nicholson, D. A., Thinakaran, G., and Vassar, R. (2016). Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased A β generation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 132, 235–256. doi: 10.1007/s00401-016-1558-9.
- Sahlin, C., Lord, A., Magnusson, K., Englund, H., Almeida, C. G., Greengard, P., et al. (2007). The Arctic Alzheimer mutation favors intracellular amyloid-beta production by making amyloid precursor protein less available to alpha-secretase. *J. Neurochem.* 101, 854–862. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04443.x.
- Sarlus, H., and Heneka, M. T. (2017). Microglia in Alzheimer's disease. *J. Clin. Invest.* 127, 3240–3249. doi: 10.1172/JCI90606.
- Sawano, A., Takahashi, T., Yamaguchi, S., and Shibuya, M. (1997). The Phosphorylated 1169-Tyrosine Containing Region of Flt-1 Kinase (VEGFR-1) Is a Major Binding Site for PLC γ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238.
- Sayed, F. A., Telpoukhovskaia, M., Kodama, L., Li, Y., Zhou, Y., Le, D., et al. (2018). Differential effects of partial and complete loss of TREM2 on microglial injury response and tauopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 10172–10177. doi: 10.1073/pnas.1811411115.
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., et al. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron* 74, 691–705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026.
- Schänzer, A., Wachs, F., Wilhelm, D., Acker, T., Cooper-Kuhn, C., Beck, H., et al. (2004). Direct Stimulation of Adult Neural Stem Cells In Vitro and Neurogenesis In Vivo by Vascular Endothelial Growth Factor. *Brain Pathol.* 14, 237–248. doi: 10.1111/j.1750-3639.2004.tb00060.x.
- Schlepckow, K., Kleinberger, G., Fukumori, A., Feederle, R., Lichtenthaler, S. F., Steiner, H., et al. (2017). An Alzheimer-associated TREM2 variant occurs at the ADAM cleavage site and affects shedding and phagocytic function. *EMBO Mol. Med.* 9, 1356–1365. doi: 10.15252/emmm.201707672.
- Schlepckow, K., Monroe, K. M., Kleinberger, G., Cantuti-Castelvetri, L., Parhizkar, S., Xia, D., et al. (2020). Enhancing protective microglial activities with a dual function TREM 2 antibody to the stalk region. *EMBO Mol. Med.* doi: 10.15252/emmm.201911227.

- Sebastian Monasor, L., Müller, S. A., Colombo, A. V., Tanrioever, G., König, J., Roth, S., et al. (2020). Fibrillar A β triggers microglial proteome alterations and dysfunction in Alzheimer mouse models. *eLife* 9, e54083. doi: 10.7554/eLife.54083.
- Seifert, A., Düsterhöft, S., Wozniak, J., Koo, C. Z., Tomlinson, M. G., Nuti, E., et al. (2021). The metalloproteinase ADAM10 requires its activity to sustain surface expression. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 715–732. doi: 10.1007/s00018-020-03507-w.
- Selkoe, D. J., and Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol. Med.* 8, 595–608. doi: 10.15252/emmm.201606210.
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., and Dvorak, H. F. (1983). Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites Fluid. *Science* 219, 983–985. doi: 10.1126/science.6823562.
- Serrano-Pozo, A., Das, S., and Hyman, B. T. (2021). APOE and Alzheimer's Disease: Advances in Genetics, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *Lancet Neurol.* 20, 68–80. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30412-9.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., and Hyman, B. T. (2011). Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a006189. doi: 10.1101/cshperspect.a006189.
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., et al. (2008). Amyloid β -Protein Dimers Isolated Directly from Alzheimer Brains Impair Synaptic Plasticity and Memory. *Nat. Med.* 14, 837–842. doi: 10.1038/nm1782.
- Shariati, S. A. M., and De Strooper, B. (2013). Redundancy and divergence in the amyloid precursor protein family. *FEBS Lett.* 587, 2036–2045. doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.026.
- Shu, X., Wei, C., Tu, W.-Y., Zhong, K., Qi, S., Wang, A., et al. (2023). Negative regulation of TREM2-mediated C9orf72 poly-GA clearance by the NLRP3 inflammasome. *Cell Rep.* 42, 112133. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112133.
- Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A., and Neumann, H. (2013). Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front. Cell. Neurosci.* 7. doi: 10.3389/fncel.2013.00006.
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J. P., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., et al. (2010). Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. *Cell Stem Cell* 7, 483–495. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.014.
- Simon, E., Obst, J., and Gomez-Nicola, D. (2019). The Evolving Dialogue of Microglia and Neurons in Alzheimer's Disease: Microglia as Necessary Transducers of Pathology. *Neuroscience* 405, 24–34. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.01.059.
- Singh, D. (2022). Astrocytic and microglial cells as the modulators of neuroinflammation in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 19, 206. doi: 10.1186/s12974-022-02565-0.
- Sjöstedt, E., Zhong, W., Fagerberg, L., Karlsson, M., Mitsios, N., Adori, C., et al. (2020). An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science* 367, eaay5947. doi: 10.1126/science.aay5947.
- Socodato, R., Portugal, C. C., Domith, I., Oliveira, N. A., Coreixas, V. S. M., Loiola, E. C., et al. (2015). c-Src function is necessary and sufficient for triggering microglial cell activation. *Glia* 63, 497–511. doi: 10.1002/glia.22767.
- Sommer, A., Kordowski, F., Büch, J., Maretzky, T., Evers, A., Andrä, J., et al. (2016). Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. *Nat. Commun.* 7, 11523. doi: 10.1038/ncomms11523.

- Sommer, D., Corstjens, I., Sanchez, S., Dooley, D., Lemmens, S., Van Broeckhoven, J., et al. (2019). ADAM17-deficiency on microglia but not on macrophages promotes phagocytosis and functional recovery after spinal cord injury. *Brain. Behav. Immun.* 80, 129–145. doi: 10.1016/j.bbi.2019.02.032.
- Sondag, C. M., Dhawan, G., and Combs, C. K. (2009). Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia. *J. Neuroinflammation* 6, 1. doi: 10.1186/1742-2094-6-1.
- Song, W. M., Joshita, S., Zhou, Y., Ulland, T. K., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2018). Humanized TREM2 mice reveal microglia-intrinsic and -extrinsic effects of R47H polymorphism. *J. Exp. Med.* 215, 745–760. doi: 10.1084/jem.20171529.
- Spuch, C., Antequera, D., Portero, A., Orive, G., Hernández, R. M., Molina, J. A., et al. (2010). The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biomaterials* 31, 5608–5618. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.03.042.
- St George-Hyslop, P. H., Tanzi, R. E., Polinsky, R. J., Haines, J. L., Nee, L., Watkins, P. C., et al. (1987). The Genetic Defect Causing Familial Alzheimer's Disease Maps on Chromosome 21. *Science* 235, 885–890. doi: 10.1126/science.2880399.
- Stern, S. T., Adiseshiaiah, P. P., and Crist, R. M. (2012). Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part. Fibre Toxicol.* 9, 20. doi: 10.1186/1743-8977-9-20.
- Suárez-Calvet, M., Karikari, T. K., Ashton, N. J., Lantero Rodríguez, J., Milà-Alomà, M., Gispert, J. D., et al. (2020). Novel tau biomarkers phosphorylated at T181, T217 or T231 rise in the initial stages of the preclinical Alzheimer's continuum when only subtle changes in A β pathology are detected. *EMBO Mol. Med.* 12, e12921. doi: 10.15252/emmm.202012921.
- Suárez-Calvet, M., Kleinberger, G., Caballero, M. Á. A., Brendel, M., Rominger, A., Alcolea, D., et al. (2016). sTREM2 cerebrospinal fluid levels are a potential biomarker for microglia activity in early-stage Alzheimer's disease and associate with neuronal injury markers. *EMBO Mol. Med.* 8, 466–476. doi: 10.15252/emmm.201506123.
- Sun, L., Zhou, R., Yang, G., and Shi, Y. (2017). Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A β 42 and A β 40 peptides by γ -secretase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E476–E485. doi: 10.1073/pnas.1618657114.
- Suo, Z., Humphrey, J., Kundtz, A., Sethi, F., Placzek, A., Crawford, F., et al. (1998). Soluble Alzheimers beta-amyloid constricts the cerebral vasculature in vivo. *Neurosci. Lett.* 257, 77–80. doi: 10.1016/s0304-3940(98)00814-3.
- Swendeman, S., Mendelson, K., Weskamp, G., Horiuchi, K., Deutsch, U., Scherle, P., et al. (2008). VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. *Circ. Res.* 103, 916–918. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.184416.
- Swinnen, N., Smolders, S., Avila, A., Notelaers, K., Paesen, R., Ameloot, M., et al. (2013). Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. *Glia* 61, 150–163. doi: 10.1002/glia.22421.
- Tabira, T., Chui, D. H., Nakayama, H., Kuroda, S., and Shibuya, M. (2002). Alzheimer's disease with spastic paresis and cotton wool type plaques. *J. Neurosci. Res.* 70, 367–372. doi: 10.1002/jnr.10392.
- Takahashi, K., Rochford, C. D. P., and Neumann, H. (2005). Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J. Exp. Med.* 201, 647–657. doi: 10.1084/jem.20041611.

- Tampellini, D., Rahman, N., Gallo, E. F., Huang, Z., Dumont, M., Capetillo-Zarate, E., et al. (2009). Synaptic Activity Reduces Intraneuronal A β , Promotes APP Transport to Synapses, and Protects against A β -Related Synaptic Alterations. *J. Neurosci.* 29, 9704. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2292-09.2009.
- Tan, J. Z. A., and Gleeson, P. A. (2019). The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1861, 697–712. doi: 10.1016/j.bbamem.2018.11.013.
- Tarasoff-Conway, J. M., Carare, R. O., Osorio, R. S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., et al. (2015). Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 457–470. doi: 10.1038/nrneurol.2015.119.
- Tchaikovski, V., Fellbrich, G., and Waltenberger, J. (2008). The Molecular Basis of VEGFR-1 Signal Transduction Pathways in Primary Human Monocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 322–328. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.158022.
- Teran, M., and Nugent, M. A. (2015). Synergistic Binding of Vascular Endothelial Growth Factor-A and Its Receptors to Heparin Selectively Modulates Complex Affinity. *J. Biol. Chem.* 290, 16451–16462. doi: 10.1074/jbc.M114.627372.
- Tew, D. J., Bottomley, S. P., Smith, D. P., Ciccotosto, G. D., Babon, J., Hinds, M. G., et al. (2008). Stabilization of Neurotoxic Soluble β -Sheet-Rich Conformations of the Alzheimer's Disease Amyloid- β Peptide. *Biophys. J.* 94, 2752–2766. doi: 10.1529/biophysj.107.119909.
- Thal, D. R., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Yamaguchi, H., Del Tredici, K., and Braak, H. (2002a). Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61, 282–293. doi: 10.1093/jnen/61.3.282.
- Thal, D. R., Rüb, U., Orantes, M., and Braak, H. (2002b). Phases of A β -deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology* 58, 1791–1800. doi: 10.1212/WNL.58.12.1791.
- Thal, D. R., Walter, J., Saido, T. C., and Fändrich, M. (2015). Neuropathology and biochemistry of A β and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 167–182. doi: 10.1007/s00401-014-1375-y.
- Thomas, T., Miners, S., and Love, S. (2015). Post-mortem assessment of hypoperfusion of cerebral cortex in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Brain* 138, 1059–1069. doi: 10.1093/brain/awv025.
- Thornton, P., Sevalle, J., Deery, M. J., Fraser, G., Zhou, Y., Ståhl, S., et al. (2017). TREM2 shedding by cleavage at the H157-S158 bond is accelerated for the Alzheimer's disease-associated H157Y variant. *EMBO Mol. Med.* 9, 1366–1378. doi: 10.15252/emmm.201707673.
- Tse, S. M. L., Furuya, W., Gold, E., Schreiber, A. D., Sandvig, K., Inman, R. D., et al. (2003). Differential Role of Actin, Clathrin, and Dynamin in Fc γ Receptor-mediated Endocytosis and Phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 278, 3331–3338. doi: 10.1074/jbc.M207966200.
- Tubi, M. A., Kothapalli, D., Hapenny, M., Feingold, F. W., Mack, W. J., King, K. S., et al. (2021). Regional relationships between CSF VEGF levels and Alzheimer's disease brain biomarkers and cognition. *Neurobiol. Aging* 105, 241–251. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2021.04.025.
- Um, J. W., Kaufman, A. C., Kostylev, M., Heiss, J. K., Stagi, M., Takahashi, H., et al. (2013). Metabotropic glutamate receptor 5 is a coreceptor for Alzheimer a β oligomer bound to cellular prion protein. *Neuron* 79, 887–902. doi: 10.1016/j.neuron.2013.06.036.
- van Bokhoven, P., de Wilde, A., Vermunt, L., Lefterink, P. S., Heetveld, S., Cummings, J., et al. (2021). The Alzheimer's disease drug development landscape. *Alzheimers Res. Ther.* 13, 186. doi: 10.1186/s13195-021-00927-z.

- van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., et al. (2023). Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* 388, 9–21. doi: 10.1056/NEJMoa2212948.
- Van Hove, H., Martens, L., Scheyltjens, I., De Vlaminck, K., Pombo Antunes, A. R., De Prijck, S., et al. (2019). A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment. *Nat. Neurosci.* 22, 1021–1035. doi: 10.1038/s41593-019-0393-4.
- van Lengerich, B., Zhan, L., Xia, D., Chan, D., Joy, D., Park, J. I., et al. (2023). A TREM2-activating antibody with a blood–brain barrier transport vehicle enhances microglial metabolism in Alzheimer's disease models. *Nat. Neurosci.* 26, 416–429. doi: 10.1038/s41593-022-01240-0.
- Van Zeller, M., Dias, D., Sebastião, A. M., and Valente, C. A. (2021). NLRP3 Inflammasome: A Starring Role in Amyloid- β - and Tau-Driven Pathological Events in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 83, 939–961. doi: 10.3233/JAD-210268.
- Velazquez, R., Ferreira, E., Tran, A., Turner, E. C., Belfiore, R., Branca, C., et al. (2018). Acute tau knockdown in the hippocampus of adult mice causes learning and memory deficits. *Aging Cell* 17, e12775. doi: 10.1111/accel.12775.
- Verghese, P. B., Castellano, J. M., Garai, K., Wang, Y., Jiang, H., Shah, A., et al. (2013). ApoE influences amyloid- β (A β) clearance despite minimal apoE/A β association in physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E1807–E1816. doi: 10.1073/pnas.1220484110.
- Vermunt, L., Sikkes, S. A. M., van den Hout, A., Handels, R., Bos, I., van der Flier, W. M., et al. (2019). Duration of Preclinical, Prodromal and Dementia Alzheimer Disease Stages in Relation to Age, Sex, and APOE genotype. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 15, 888–898. doi: 10.1016/j.jalz.2019.04.001.
- Verney, C., Monier, A., Fallet-Bianco, C., and Gressens, P. (2010). Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *J. Anat.* 217, 436–448. doi: 10.1111/j.1469-7580.2010.01245.x.
- Vilalta, A., Zhou, Y., Sevalle, J., Griffin, J. K., Satoh, K., Allendorf, D. H., et al. (2021). Wild-type sTREM2 blocks A β aggregation and neurotoxicity, but the Alzheimer's R47H mutant increases A β aggregation. *J. Biol. Chem.*, 100631. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100631.
- Vogel, J. W., Iturria-Medina, Y., Strandberg, O. T., Smith, R., Levitis, E., Evans, A. C., et al. (2020). Spread of pathological tau proteins through communicating neurons in human Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* 11, 2612. doi: 10.1038/s41467-020-15701-2.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., and Heldin, C. H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 269, 26988–26995.
- Wang, C., Fan, L., Khawaja, R. R., Liu, B., Zhan, L., Kodama, L., et al. (2022). Microglial NF- κ B drives tau spreading and toxicity in a mouse model of tauopathy. *Nat. Commun.* 13, 1969. doi: 10.1038/s41467-022-29552-6.
- Wang, J., Logovinsky, V., Hendrix, S. B., Stanworth, S. H., Perdomo, C., Xu, L., et al. (2016). ADCOMS: a composite clinical outcome for prodromal Alzheimer's disease trials. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 87, 993–999. doi: 10.1136/jnnp-2015-312383.
- Wang, P., Xie, Z.-H., Guo, Y.-J., Zhao, C.-P., Jiang, H., Song, Y., et al. (2011). VEGF-induced angiogenesis ameliorates the memory impairment in APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 620–626. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.07.003.

- Wang, S., Mustafa, M., Yuede, C. M., Salazar, S. V., Kong, P., Long, H., et al. (2020). Anti-human TREM2 induces microglia proliferation and reduces pathology in an Alzheimer's disease model. *J. Exp. Med.* 217, e20200785. doi: 10.1084/jem.20200785.
- Wang, Y., Cella, M., Mallinson, K., Ulrich, J. D., Young, K. L., Robinette, M. L., et al. (2015). TREM2 lipid sensing sustains microglia response in an Alzheimer's disease model. *Cell* 160, 1061–1071. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.049.
- Wang, Y., and Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 22–35. doi: 10.1038/nrn.2015.1.
- Wang, Y., and Neumann, H. (2010). Alleviation of Neurotoxicity by Microglial Human Siglec-11. *J. Neurosci.* 30, 3482–3488. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3940-09.2010.
- Warner-Schmidt, J. L., and Duman, R. S. (2007). VEGF is an essential mediator of the neurogenic and behavioral actions of antidepressants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 4647–4652. doi: 10.1073/pnas.0610282104.
- Watt, A. D., Perez, K. A., Rembach, A., Sherrat, N. A., Hung, L. W., Johanssen, T., et al. (2013). Oligomers, fact or artefact? SDS-PAGE induces dimerization of β -amyloid in human brain samples. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 125, 549–564. doi: 10.1007/s00401-013-1083-z.
- Weddell, J. C., Chen, S., and Imoukhuede, P. I. (2017). VEGFR1 promotes cell migration and proliferation through PLC γ and PI3K pathways. *Npj Syst. Biol. Appl.* 4, 1–11. doi: 10.1038/s41540-017-0037-9.
- Wesseling, H., Mair, W., Kumar, M., Schläffner, C. N., Tang, S., Beerepoot, P., et al. (2020). Tau PTM Profiles Identify Patient Heterogeneity and Stages of Alzheimer's Disease. *Cell* 183, 1699–1713.e13. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.029.
- Wild, J. R. L., Staton, C. A., Chapple, K., and Corfe, B. M. (2012). Neuropilins: expression and roles in the epithelium. *Int. J. Exp. Pathol.* 93, 81–103. doi: 10.1111/j.1365-2613.2012.00810.x.
- Winder, Z., Sudduth, T. L., Anderson, S., Patel, E., Neltner, J., Martin, B. J., et al. (2023). Examining the association between blood-based biomarkers and human *post mortem* neuropathology in the University of Kentucky Alzheimer's Disease Research Center autopsy cohort. *Alzheimers Dement.* 19, 67–78. doi: 10.1002/alz.12639.
- Wisniewski, K. E., Wisniewski, H. M., and Wen, G. Y. (1985). Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann. Neurol.* 17, 278–282. doi: 10.1002/ana.410170310.
- Wittko, I. M., Schänzer, A., Kuzmichev, A., Schneider, F. T., Shibuya, M., Raab, S., et al. (2009). VEGFR-1 Regulates Adult Olfactory Bulb Neurogenesis and Migration of Neural Progenitors in the Rostral Migratory Stream In Vivo. *J. Neurosci.* 29, 8704–8714. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5527-08.2009.
- Wittko-Schneider, I. M., Schneider, F. T., and Plate, K. H. (2013). Brain homeostasis: VEGF receptor 1 and 2—two unequal brothers in mind. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 1705–1725. doi: 10.1007/s00018-013-1279-3.
- Wong, C. W., Quaranta, V., and Glenner, G. G. (1985). Neuritic plaques and cerebrovascular amyloid in Alzheimer disease are antigenically related. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 8729–8732.
- Woolard, J., Wang, W.-Y., Bevan, H. S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R. O., et al. (2004). VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res.* 64, 7822–7835. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0934.

- World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends (n.d.).
- Wu, K., Byers, D. E., Jin, X., Agapov, E., Alexander-Brett, J., Patel, A. C., et al. (2015). TREM-2 promotes macrophage survival and lung disease after respiratory viral infection. *J. Exp. Med.* 212, 681–697. doi: 10.1084/jem.20141732.
- Wu, M., Zhang, M., Yin, X., Chen, K., Hu, Z., Zhou, Q., et al. (2021). The role of pathological tau in synaptic dysfunction in Alzheimer's diseases. *Transl. Neurodegener.* 10, 45. doi: 10.1186/s40035-021-00270-1.
- Xiang, X., Werner, G., Bohrmann, B., Liesz, A., Mazaheri, F., Capell, A., et al. (2016). TREM2 deficiency reduces the efficacy of immunotherapeutic amyloid clearance. *EMBO Mol. Med.* 8, 992–1004. doi: 10.15252/emmm.201606370.
- Xu, G., Fromholt, S. E., Chakrabarty, P., Zhu, F., Liu, X., Pace, M. C., et al. (2020). Diversity in A β deposit morphology and secondary proteome insolubility across models of Alzheimer-type amyloidosis. *Acta Neuropathol. Commun.* 8, 43. doi: 10.1186/s40478-020-00911-y.
- Xu, J., Farsad, H. L., Hou, Y., Barclay, K., Lopez, B. A., Yamada, S., et al. (2023). Human striatal glia differentially contribute to AD- and PD-specific neurodegeneration. *Nat. Aging* 3, 346–365. doi: 10.1038/s43587-023-00363-8.
- Yang, S.-P., Bae, D.-G., Kang, H. J., Gwag, B. J., Gho, Y. S., and Chae, C.-B. (2004). Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with β -amyloid in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 25, 283–290. doi: 10.1016/S0197-4580(03)00111-8.
- Yang, S.-P., Kwon, B.-O., Gho, Y. S., and Chae, C.-B. (2005). Specific interaction of VEGF165 with β -amyloid, and its protective effect on β -amyloid-induced neurotoxicity. *J. Neurochem.* 93, 118–127. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02993.x.
- Yang, S.-Z., Zhang, L.-M., Huang, Y.-L., and Sun, F.-Y. (2003). Distribution of Flk-1 and Flt-1 receptors in neonatal and adult rat brains. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 274A, 851–856. doi: 10.1002/ar.a.10103.
- Yang, T., Li, S., Xu, H., Walsh, D. M., and Selkoe, D. J. (2017). Large Soluble Oligomers of Amyloid β -Protein from Alzheimer Brain Are Far Less Neuroactive Than the Smaller Oligomers to Which They Dissociate. *J. Neurosci.* 37, 152–163. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1698-16.2016.
- Yanguas-Casás, N., Crespo-Castrillo, A., Arevalo, M., and Garcia-Segura, L. M. (2020). Aging and sex: Impact on microglia phagocytosis. *Aging Cell* 19, e13182. doi: 10.1111/accel.13182.
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T. C., et al. (2007). Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron* 53, 337–351. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.010.
- Yu, Y., and Ye, R. D. (2015). Microglial A β Receptors in Alzheimer's Disease. *Cell. Mol. Neurobiol.* 35, 71–83. doi: 10.1007/s10571-014-0101-6.
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O'Keeffe, S., et al. (2014). An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J. Neurosci.* 34, 11929–11947. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014.
- Zhang, Z. G., Zhang, L., Jiang, Q., Zhang, R., Davies, K., Powers, C., et al. (2000). VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* 106, 829–838.
- Zhao, N., Qiao, W., Li, F., Ren, Y., Zheng, J., Martens, Y. A., et al. (2022). Elevating microglia TREM2 reduces amyloid seeding and suppresses disease-associated microglia. *J. Exp. Med.* 219, e20212479. doi: 10.1084/jem.20212479.

- Zhao, Y., Wu, X., Li, X., Jiang, L.-L., Gui, X., Liu, Y., et al. (2018). TREM2 Is a Receptor for β -Amyloid that Mediates Microglial Function. *Neuron* 97, 1023-1031.e7. doi: 10.1016/j.neuron.2018.01.031.
- Zhao, Z., Kesti, T., Uğurlu, H., Baur, A. S., Fagerlund, R., and Saksela, K. (2019). Tyrosine phosphorylation directs TACE into extracellular vesicles via unconventional secretion. *Traffic Cph. Den.* 20, 202–212. doi: 10.1111/tra.12630.
- Zheng, H., Jiang, M., Trumbauer, M. E., Sirinathsinghji, D. J. S., Hopkins, R., Smith, D. W., et al. (1995). β -amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81, 525–531. doi: 10.1016/0092-8674(95)90073-X.
- Zhong, L., Chen, X.-F., Wang, T., Wang, Z., Liao, C., Wang, Z., et al. (2017). Soluble TREM2 induces inflammatory responses and enhances microglial survival. *J. Exp. Med.* 214, 597–607. doi: 10.1084/jem.20160844.
- Zhong, L., Wang, Z., Wang, D., Wang, Z., Martens, Y. A., Wu, L., et al. (2018). Amyloid-beta modulates microglial responses by binding to the triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2). *Mol. Neurodegener.* 13, 15. doi: 10.1186/s13024-018-0247-7.
- Zhong, L., Xu, Y., Zhuo, R., Wang, T., Wang, K., Huang, R., et al. (2019). Soluble TREM2 ameliorates pathological phenotypes by modulating microglial functions in an Alzheimer's disease model. *Nat. Commun.* 10, 1365. doi: 10.1038/s41467-019-09118-9.
- Zimmermann, M. R., Bera, S. C., Meisl, G., Dasadhikari, S., Ghosh, S., Linse, S., et al. (2021). Mechanism of Secondary Nucleation at the Single Fibril Level from Direct Observations of A β 42 Aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* 143, 16621–16629. doi: 10.1021/jacs.1c07228.
- Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 723–738. doi: 10.1038/nrn3114.
- Zou, W., Reeve, J. L., Liu, Y., Teitelbaum, S. L., and Ross, F. P. (2008). DAP12 Couples c-Fms Activation to the Osteoclast Cytoskeleton by Recruitment of Syk. *Mol. Cell* 31, 422–431. doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.023.



RESEARCH ARTICLE

A novel peptide derived from vascular endothelial growth factor prevents amyloid beta aggregation and toxicity

P. Bouvet^{1,2} | P. de Gea^{1,2} | M. Aimard^{1,2} | N. Chounlamountri^{1,2} | J. Honnorat^{1,2} | J. G. Delcros^{2,3,4} | P. A. Salin^{2,5} | C. Meissirel^{1,2}

¹MeLiS, Institut NeuroMyoGène (INMG), Synaptopathies and Autoantibodies, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1314, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR5284, Lyon, France

²Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

³Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Apoptosis, Cancer and Development, Institut PLAsCAN, INSERM U1052, CNRS UMR5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France

⁴Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Small Molecules for Biological Targets, INSERM U1052 – CNRS UMR5286, ISPB Rockefeller, Lyon, France

⁵Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Forgetting Processes and Cortical Dynamics, INSERM U1028, CNRS UMR5292, Bron, France

Correspondence

C. Meissirel, Laboratoire MeLiS, Institut NeuroMyoGène (INMG), Synaptopathies and Autoantibodies, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1314, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR5284, 69008 Lyon, France.

Email: claire.meissirel@inserm.fr

Funding information

Association France Alzheimer, Grant/Award Number: R22002CC; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

Abstract

Amyloid- β oligomers ($A\beta_o$) are the most pathologically relevant $A\beta$ species in Alzheimer's disease (AD), because they induce early synaptic dysfunction that leads to learning and memory impairments. In contrast, increasing VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) brain levels have been shown to improve learning and memory processes, and to alleviate $A\beta$ -mediated synapse dysfunction. Here, we designed a new peptide, the blocking peptide (BP), which is derived from an $A\beta_o$ -targeted domain of the VEGF protein, and investigated its effect on $A\beta$ -associated toxicity. Using a combination of biochemical, 3D and ultrastructural imaging, and electrophysiological approaches, we demonstrated that BP strongly interacts with $A\beta_o$ and blocks $A\beta$ fibrillar aggregation process, leading to the formation of $A\beta$ amorphous aggregates. BP further impedes the formation of structured $A\beta_o$ and prevents their pathogenic binding to synapses. Importantly, acute BP treatment successfully rescues long-term potentiation (LTP) in the APP/PS1 mouse model of AD, at an age when LTP is highly impaired in hippocampal slices. Moreover, BP is also able to block the interaction between $A\beta_o$ and VEGF, which suggests a dual mechanism aimed at both trapping $A\beta_o$ and releasing VEGF to alleviate $A\beta_o$ -induced synaptic damage. Our findings provide evidence for a neutralizing effect of the BP on $A\beta$ aggregation process and pathogenic action, highlighting a potential new therapeutic strategy.

KEYWORDS

Alzheimer's disease, amyloid beta-peptides, blocking peptide, synapses, synaptic transmission, VEGF

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; $A\beta$, Amyloid- β peptide; $A\beta_m$, Amyloid- β monomer; $A\beta_o$, Amyloid- β oligomer; APP/PS1, Amyloid precursor protein/presenilin-1 transgenic mouse; BP, Blocking peptide; CP, Control peptide; fEPSPs, Field excitatory postsynaptic potentials; HMW, High-molecular weight; KO, Knockout; LMW, Low-molecular weight; LTP, Long-term potentiation; NFT, Neurofibrillary tangles; PPF, Paired-pulse facilitation; PS1, Presenilin 1; SEM, Standard error of the mean; TBS, Theta burst stimulation; TEM, Transmission electron microscopy; ThT, Thioflavin-T; VEGF, Vascular endothelial growth factor; VEGFR2, Vascular endothelial growth factor receptor 2; WT, Wild type.

P. Bouvet and P. de Gea contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Aging Cell* published by Anatomical Society and John Wiley & Sons Ltd.



1 | INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD), the most common neurodegenerative disease, is initially characterized by a progressive memory loss and decline in cognitive abilities which leads to dementia (The Alzheimer's Association, 2021). The neuropathological process begins decades before the symptomatic phase of the disease and involves the accumulation of insoluble protein aggregates in the brain. These aggregates have been characterized as the two main histopathological markers of the disease, the neurofibrillary tangles (NFT) due to an hyperphosphorylation of the Tau protein within neurons and the amyloid β plaques caused by the accumulation of the β -amyloid peptide ($A\beta$) in the extracellular space (Long & Holtzman, 2019). Because familial forms of AD are due to gene mutations of proteins involved in $A\beta$ production, $A\beta$ plaques were first proposed to play a causal role in AD pathogenesis, leading to the amyloid hypothesis (Hardy & Higgins, 1992). However, $A\beta$ plaque formation in AD patient's brain does not correlate with cognitive symptoms, in contrast to NFT (Braak & Braak, 1991) and to brain levels of soluble $A\beta$ forms (Lambert et al., 1998; Lue et al., 1999; McLean et al., 1999), revisiting the original amyloid hypothesis (Benilova et al., 2012).

Strong evidence now indicates that soluble $A\beta$ oligomers ($A\beta_o$) produced by the self-aggregation of the two most common $A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$ isoforms of the $A\beta$ peptide are the most toxic $A\beta$ species (Mucke & Selkoe, 2012). Indeed, $A\beta_o$ derived from AD patients' brain, cell lines overexpressing human $A\beta$ or synthetic preparations have been shown to induce synaptotoxicity (Ferreira et al., 2015) and to alter hippocampal long-term potentiation (LTP), a cellular basis of learning and memory (Selkoe, 2008; Shankar et al., 2008; Walsh et al., 2002). Thus, $A\beta$ aggregation process is considered as a primary cause in AD pathogenesis. However, $A\beta_o$ are transient intermediates with a dynamic and heterogeneous nature and major efforts have been produced to identify the bioactive species responsible for neurotoxicity in AD. Notably, $A\beta_o$ have been classified by size, shape, structure, or by their reactivity to conformation-dependent antibodies (Ashe, 2020; Chen et al., 2017). High molecular weight (HMW) $A\beta_o$ over 50kDa have been shown to target synapses more efficiently than low molecular weight (LMW) $A\beta_o$ (Lacor et al., 2004, 2007) and to be the predominant soluble $A\beta$ species in AD brain (Yang et al., 2017). Although HMW $A\beta_o$ are considered less toxic for synapses than smaller species into which they can dissociate, such as dimers (Shankar et al., 2008; Yang et al., 2017), they have been shown to cause neurotoxicity and synapse dysfunction in hippocampal slices (Yasumoto et al., 2019). Thus, preventing synapse failure by targeting $A\beta_o$ toxic species and increasing synaptic protection could be a beneficial strategy to prevent cognitive decline in AD.

The Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its main receptor VEGFR2 are now considered key players in hippocampal synaptic plasticity and memory. Thus, increasing brain VEGF levels in animal models improves memory performances, while invalidating VEGFR2 in neurons impairs them (Cao et al., 2004; De Rossi et al., 2016; Licht et al., 2011). In humans, higher VEGF levels in cerebrospinal fluid have been associated with less hippocampal volume changes and cognitive decline overtime in healthy and AD patients

(Hohman et al., 2015). This potential neuroprotective role of VEGF has been confirmed in AD mouse models, where brain injections of VEGF-producing nanoparticles, microcapsules, or mesenchymal stem cells reduced brain $A\beta$ load and learning and memory impairments (Garcia et al., 2014; Herrán et al., 2013; Spuch et al., 2010). Recently, we investigated the cellular mechanisms involved in the protective role of VEGF and demonstrated that it counteracts $A\beta_o$ toxic action by preventing LTP impairment and synapse morphological and functional changes. However, this beneficial effect of VEGF might be limited in AD because we also uncovered that $A\beta_o$ directly interacts with VEGF (Martin et al., 2021). Taking advantage of this interaction, we designed a new peptide tool, named the blocking peptide (BP), mimicking part of the VEGF linear protein sequence which is specifically recognized by $A\beta_o$.

Here, we propose to use BP to specifically target $A\beta_o$ and prevent their synaptotoxicity. We showed that BP is able to bind $A\beta_o$ with high affinity and to block the process of $A\beta$ fibrillar aggregation. Moreover, we revealed that BP impedes the formation of structured $A\beta_o$ which are specifically recognized by a conformational antibody known to selectively target $A\beta_o$ toxic for synapses. Consistent with this finding, BP successfully inhibits $A\beta_o$ binding to synapses in hippocampal neurons. Importantly, we uncovered that acute BP treatment can rapidly restore LTP in slices from aged APP/PS1 mice. We finally revealed that BP prevents $A\beta_o$ -VEGF interaction, potentially releasing VEGF and restoring its protective effect on synapses and LTP.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals

Animal specimens Embryonic day 17–18 (E17–18) C57Bl/6JRj wild-type male and female mice were used for primary hippocampal cell cultures (Table S1). Electrophysiological field potential recording experiments and brain section immunostainings were performed on 8-month-old wild type and transgenic heterozygous APP/PS1-21 mice generated on a C57Bl/6 background and expressing a transgene combining human APP with the Swedish mutation (APP^{KM670/671NL}) and mutated L166P human presenilin 1 (PS1) under the *Thy1* promoter (Radde et al., 2006). Only male mice were used. Genotyping was carried out to reveal the presence or absence of APP and PS1 transgenes. The study was conducted in accordance with the European Community Council directive 2010/63/EU on the protection of animals used for experimental and scientific purposes. Animal care and treatment procedures were realized according to the guidelines approved by the French Ethical Committee of the Lyon 1 University (DR2013-47).

2.2 | $A\beta$ preparation and aggregation

Synthetic $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$, and their biotinylated forms were obtained as lyophilized samples from Bachem ($A\beta_{40}$, b- $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ and b- $A\beta_{42}$). Briefly, peptides were solubilized in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propa



nol to prevent oligomerization, then evaporated overnight under a chemical fume hood, and stored as a dried peptide film at -80°C until use, as previously described (Stine et al., 2003). $\text{A}\beta$ monomers ($\text{A}\beta_{\text{m}}$) were prepared extemporaneously by first dissolving the peptide film in 2 mM dimethyl sulfoxide (DMSO) and vortexing for 1 min. Peptides were further diluted to $100\mu\text{M}$ in ice-cold PBS. Diluted peptides were subsequently sonicated for 20 min at 4°C , centrifuged at $10,000g$ for 3 min, then the supernatant was collected and concentration of $\text{A}\beta_{\text{m}}$ measured using a micro BCA protein assay kit, prior to being aliquoted and stored at -20°C until use. Typically, this centrifugation step resulted in the loss of around 50%–60% of the initial $\text{A}\beta$ amount. $\text{A}\beta$ preparations were used either directly as monomers (for $\text{A}\beta_{40}$ Elisa assays and ThT experiments) or were subjected to different oligomerization states, enriched in high molecular weight $\text{A}\beta_{42}$ oligomers (HMW $\text{A}\beta_{\text{o}}$) or in low molecular weight $\text{A}\beta_{42}$ oligomers (LMW $\text{A}\beta_{\text{o}}$). For $\text{A}\beta$ preparations enriched in $\text{A}\beta$ fibrils, monomeric $\text{A}\beta_{42}$ peptides ($\text{A}\beta_{\text{m}}$) were incubated at a concentration of either $30\mu\text{M}$ or $15\mu\text{M}$ during 24 h at 37°C . For HMW $\text{A}\beta_{\text{o}}$, $\text{A}\beta_{\text{m}}$ was incubated at $15\mu\text{M}$ for 2 h at 37°C . For ELISA assays, we also used a LMW $\text{A}\beta_{\text{o}}$ preparation (Stine et al., 2003) by incubating biotinylated $\text{A}\beta_{\text{m}}$ at 4°C for 24 h. LMW $\text{A}\beta_{\text{o}}$ were then centrifuged at $10,000g$ for 10 min and the supernatant was collected.

In all the experiments $\text{A}\beta_{\text{o}}$ concentrations are expressed as monomer equivalent concentrations, as previously reported (Laurén et al., 2009).

2.3 | Blocking and control peptides preparation

Blocking peptide (BP) (seq: KRKKSRYKSWSVYVG) and control peptide (CP) (seq: NDYKDDDDKGA AAA) were obtained as lyophilized samples from Proteomic Solutions and stored at -20°C until reconstitution. The sequence design comes from previous peptide array experiments aimed at studying $\text{A}\beta_{\text{o}}$ -VEGF interaction (Martin et al., 2021). Based on the level of hydrophobicity and positive/negative charges, BP stock solution was prepared at 20 mM in 10% acetic acid and CP stock solution at 20 mM in 50% DMSO and 5% ammonium bicarbonate. Then, the peptides were aliquoted and stored at -80°C until use.

2.4 | ELISA assays

The binding of CP or BP to synthetic biotinylated LMW $\text{A}\beta_{\text{o}}$ (oligomerized at 4°C for 24 h) or $\text{A}\beta_{40}$ monomers ($\text{A}\beta_{\text{m}}$) was determined by indirect ELISA in which CP or BP were used as the capture antigens and the biotin tag of the biotinylated $\text{A}\beta$ peptides for the detection. 96-well clear polystyrene microplate were coated overnight at 4°C with $5\mu\text{M}$ of CP or BP in PBS, pH 7.4. After immobilization, the plate was washed three times with PBS 0.05% Tween 20, and various concentrations of biotinylated $\text{A}\beta$ peptides were added in triplicate from $0.1\mu\text{g mL}^{-1}$ to $10\mu\text{g mL}^{-1}$ (21 nM to $2.1\mu\text{M}$ for LMW $\text{A}\beta_{\text{o}}$, 22 nM to $2.2\mu\text{M}$ for $\text{A}\beta_{\text{m}}$) and incubated for

2 h at RT. After additional washes with PBS 0.05% Tween 20, HRP-conjugated streptavidin (1/40) was added for 20 min at RT, followed by a washing step and an incubation in substrate reagent containing 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) and H_2O_2 . The reaction was stopped with a solution containing H_2SO_4 . Absorbance was successively measured at 450 and 540 nm with a TECAN microplate reader and optical density values at 540 nm were subtracted from the ones at 450 nm to correct for optical imperfections of the plate. Unspecific $\text{A}\beta$ binding to the microplate was determined using non-coated wells.

2.5 | Electrophysiology

Local field potential recordings (LFP) were performed on acute coronal hippocampal slices from 8-month-old wild type and transgenic heterozygous male APP/PS1-21 mice to measure baseline synaptic response and long-term potentiation (LTP) of Schaffer collaterals to CA1 (SC-CA1) pyramidal cell synapses. Hippocampal slices ($400\mu\text{m}$ thick) were cut using a vibratome (Leica VT1200S) and incubated at room temperature in artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 124 NaCl, 10 glucose, 1.25 NaH_2PO_4 , 2.5 KCl, 26 NaHCO_3 , 1.3 MgCl_2 , and 2.5 CaCl_2 , bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2 , pH 7.4 for 1 h prior to recording. Field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded extracellularly in stratum radiatum of CA1 region of the dorsal hippocampus in presence of gamma-aminobutyric acid (GABA)-A receptor antagonist picrotoxin ($100\mu\text{M}$). Electrical stimulation was realized with a bipolar tungsten electrode placed in CA1 stratum radiatum and fEPSPs were measured using borosilicate glass microelectrodes ($\sim 1\text{--}3\text{M}\Omega$) filled with ACSF. LFP were amplified and low-pass filtered at 3 kHz using a differential amplifier ($\times 1000$, WPI) and data acquisition and analyses were carried out using a National Instrument interface coupled with Elphy software (G. Sadoc, CNRS, France). LFP were sampled at 10 kHz and fEPSPs initial slope was computed to quantify synaptic responses. Paired-pulse stimulation of evoked responses at SC-CA1 synapses was carried out using a 50 ms inter-stimulus interval. Paired-pulse stimulation of synaptic responses at short intervals evoked paired-pulse facilitation (PPF) of responses at the SC-CA1 synapses. PPF represents a form of short-term plasticity and the modulation of the paired-pulse ratio (PPR) of evoked synaptic responses has been shown to depend on presynaptic mechanisms of neurotransmitter release (i.e., modulation of the glutamate release probability at SC-CA1 synapses). For quantification, the slope of the synaptic response to the second stimulation was divided by that of the first response.

After baseline recordings of synaptic activity evoked at 0.2 Hz for at least 10 min, slices were incubated in ACSF or treated with CP or BP at $0.5\mu\text{M}$ for 40 min before inducing LTP with the theta burst stimulation (TBS). The effects of the peptides on synaptic responses were tested in a series of pilot experiments on mice of both genotypes. In contrast to the application of $2\mu\text{M}$ of BP, a 30 min administration of $0.5\mu\text{M}$ had no effect on synaptic transmission



(Figure S3A,B). The 0.5 μM concentration of BP did not induce a change in these responses during the 40 min prior to LTP induction at the SC-CA1 synapses. TBS consisted of 10 trains separated by 30 s, each train composed of 10 bursts at 5 Hz and each burst providing 4 pulses at 100 Hz. Before LTP induction, precautions were taken to ensure that approximately the same amplitude of fEPSPs was obtained in baseline for the different experiments to achieve the same level of cooperativity in each group. After LTP induction, fEPSPs were recorded for at least 60 min.

2.6 | Cell cultures and treatments

2.6.1 | Hippocampal neurons

Primary hippocampal neuron cultures were prepared from E17–18 C57Bl/6J mice. Briefly, hippocampi were removed and collected in Hank's buffered salt solution (HBSS), digested in HBSS supplemented with trypsin (0.25% v/v) for 10 min at 37°C and then rinsed in HBSS and BSA 0.2%. Next, hippocampi were triturated in Neurobasal medium without phenol red, supplemented with L-glutamine (2 mM), 2% B27, 1% penicillin/streptomycin (P/S) (10,000 U mL⁻¹). Hippocampal neurons were then plated onto poly-L-lysine coated coverslips (0.5 mg mL⁻¹) at a low density (15 × 10³ cells/cm²) for synaptic targeting experiments. Neurons were cultured in supplemented Neurobasal medium at 37°C under 5% CO₂, one-half of the medium being changed once a week.

For synaptic targeting experiments, hippocampal neuron cultures were used after 21 days in vitro (DIV) and treated for 30 min with a final concentration of 0.5 μM biotinylated A β preparations enriched in HMW A β . HMW A β enriched preparations were derived from A β m which have been incubated at 15 μM in the presence or not of equimolar concentration of CP or BP, for 2 h at 37°C.

2.7 | Western and dot blotting

2.7.1 | Western blotting

A β m was aggregated at 15 μM with or without CP or BP at equimolar concentrations, during 2 h at 37°C (enriched in HMW A β) or 24 h at 37°C (enriched in A β fibrils). After a 5 min denaturation step at 95°C in Laemmli/DDT (1,4-Dithiothreitol), A β preparations (1 μg) were subjected to immunoblotting analysis. A β assemblies were separated on 4–12% gradient SDS-PAGE gels at 120 V, with cathode and anode containing MES buffer. Gels were then transferred on 0.2 μm nitrocellulose membranes at 120 V for 1 h in 20% methanol, Tris-Glycine buffer.

After a 45 min blocking step in Tris-buffered saline, 0.1% Tween, pH 7.6, 5% milk, membranes were immunoblotted overnight at 4°C with dedicated antibodies (Table S1) diluted in Tris-buffered saline, 0.1% Tween, pH 7.6, with 2% milk. Appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were next applied for

1 h30 at RT. Proteins were visualized with an ECL detection system and band intensities quantified using a densitometric analysis with ImageJ software.

2.7.2 | Dot blotting

For dot blots, each sample including A β m, A β o, or A β aggregated from 0 to 2 h with or without BP at 15 μM , was adsorbed onto a 0.2 μm nitrocellulose membrane, blocked with 5% milk in TBS without detergent at RT for 45 min, and incubated overnight at 4°C with the anti-A β oligomer antibody A11 (kindly provided by Rakez Kaye, University of Texas, USA) in TBS with 2% milk. Following washes, a goat anti-rabbit secondary antibody conjugated to HRP was incubated for 1 h30 at RT before detection by chemiluminescence using SuperSignal™ West Pico chemiluminescent Substrate kit and ChemiDoc imaging system. For epitope mapping experiments, A β samples were adsorbed prior to an incubation with the N-terminal anti-A β _{1–16} (6E10) and/or anti-A β _{17–24} (4G8) or anti-A β _{22–35} antibody for 2 h at RT in TBS-Tween with 2% milk. After washes, biotinylated BP at 5 μM was incubated or not overnight at 4°C in TBS-Tween followed by additional washes and an incubation with an anti-biotin secondary antibody conjugated to HRP for 1 h30 at RT. Bound biotinylated BP was visualized by chemiluminescence. In some experiments, the anti-A β _{22–35} was applied overnight after the BP followed by an anti-rabbit secondary antibody conjugated to HRP to detect A β unbound to BP. Quantification of signal intensities was performed using a densitometric analysis with the ImageJ software.

2.8 | Thioflavin T assays

Thioflavin-T (ThT) assays were performed in black polystyrene 384-well plates using a Tecan microplate reader with a set of excitation/emission wavelengths of 450/490 nm. Monomeric A β ₄₂ was prepared as described above and CP or BP were used at indicated concentrations, ranging from 0.5 to 15 μM . The final concentration of ThT was 20 μM , and A β m was used at 15 μM in PBS buffer (pH 7.4), with a total reaction volume per well of 30 μL . The plate was sealed with a transparent plastic film and incubated at 37°C prior to fluorescence measurement. ThT fluorescence intensity was monitored every 5 min over 24 h at 37°C without agitation. Three replicates per condition were measured.

2.9 | Hippocampal neuron immunostaining

Treated hippocampal neuron cultures were fixed for 4 min in 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer at RT, prior to immunostaining. After a blocking step in non-permeabilizing condition (PBS, 1% BSA) surface-bound biotinylated A β was detected with fluorescently tagged streptavidin incubated for 3 h at RT. Three washes in PBS were then performed followed by a



permeabilizing step in PBS, 0.3% Triton-X-100 and 1% BSA for 1 h, prior to an overnight incubation at 4°C with antibodies directed against PSD95 and Bassoon in the permeabilizing blocking solution. After three washing steps appropriate Alexa conjugated secondary antibodies were subsequently incubated for 2 h at RT and cultures were washed, counterstained with DAPI and mounted in Fluoromount reagent.

2.10 | Immunohistochemistry

8-month-old heterozygous APP/PS1-21 and wild-type male mice were killed by decapitation after deep isoflurane gas anesthesia. Their brain was rapidly dissected, fresh frozen, and serially cut at 10 μm thick using a cryostat prior to being processed for immunostaining. Briefly, coronal brain sections were fixed in 4% PFA for 10 min, washed twice in PBS and incubated for 1 h in a non-permeabilizing buffer in PBS with 1% BSA. Subsequently, sections were incubated with the biotinylated BP at 50 nM in PBS-BSA for 2 h at RT. Next, antibodies directed against biotin and Aβ₁₇₋₂₄ were applied overnight at 4°C prior to a 2 h incubation step with fluorescently conjugated secondary antibodies. After staining, sections were counterstained with DAPI prior to mounting in Fluoromount reagent.

2.11 | Confocal acquisition and analysis

Confocal images of immunostainings were obtained using a confocal Zeiss LSM 800 or 880 AiryScan microscope equipped with two diode lasers (405, 561 nm), a laser gas argon (488 nm) and a laser gas He/Ne (633 nm), with a 63× objective and an additional zoom factor (3×). For image acquisition, identical parameters were used between genotypes or cell culture conditions by an investigator blinded to treatments. 3D confocal z-stack images were acquired and for hippocampal cell images, deconvolved using Huygens software.

Subsequent analyses of hippocampal synapse staining were performed by a blinded investigator with Icy software. To assess biotinylated Aβ expression at full synapses, regions of interest (ROIs) used to identify synapses were defined as the colocalization area between PSD95 and Bassoon positive clusters on the dendrite of hippocampal neurons. Biotinylated Aβ clusters were quantified in each ROI in collapsed Z-stacks. A published detailed version of the protocol is available following this link: <https://icy.bioimageanalysis.org/protocol/amyloid-clusters-colocalisation-on-synapses/>.

2.12 | Transmission electron microscopy

Prior to imaging, 10 μL of preparation of Aβ fibrils (30 μM) aggregated for 24 h at 37°C in the presence or absence of equimolar concentrations of CP or BP were deposited onto Formvar-coated mesh copper grids. After a 2 min incubation step at RT, grids were

rinsed with sterile dH₂O. Samples were subsequently stained using 2% uranyl acetate for 1 min in the dark to increase contrast and were allowed to air dry for 2 min. Finally, they were visualized with a Philips EM208 Transmission Electron Microscope operating at 120 kV, initially imaged at low magnification (20,000×), and thereafter at 120,000× using a Gatan Orius 600 digital camera.

2.13 | Statistical analysis

Data were expressed as mean ± SEM in ThT, Western blotting, synaptic targeting experiments and electrophysiological recordings (Table S2). Normality and variance homoscedasticity were assessed using descriptive analysis and appropriate tests. Sample size (*n*) was determined based on previous studies from the literature and pilot experiments; *n* refers to the number of ELISA, ThT or Western Blotting experiments, to coverslips or culture wells for hippocampal neuron cultures, and to mice per condition or per genotype for electrophysiological experiments. For Aβ-VEGF competitive ELISA experiments, IC₅₀ was determined by fitting the data to a three-parameter sigmoidal dose-response curve. For the analysis of Aβ-BP interaction, K_D was determined by fitting the data to a two-parameter saturation curve. For ELISA assays, Aβ+CP binding to VEGF or Aβ binding to CP were fitted using a linear model (R software). For quantitative assessment of Aβ aggregation, Aβ expression level and the percentage of synapses colocalized with Aβ, data were compared for statistical significance between groups using a Kruskal-Wallis and a Dunn's post hoc test with Holm correction (R software) (Table S3). For electrophysiological data, statistical analysis between treatments and/or genotypes were carried out using a Kruskal-Wallis followed by a Dunn's post hoc test to compare differences in fEPSP slopes (Table S3).

3 | RESULTS

3.1 | High-affinity interaction of BP with Aβ_o

Taking advantage of the characterized interaction between VEGF and Aβ_o (Martin et al., 2021), we designed a new peptide mimicking part of the VEGF protein sequence, named the blocking peptide (BP), to specifically target Aβ_o. The BP is a 15-amino acid synthetic peptide corresponding to the first heparin-binding domain of the VEGF₂₀₆ isoform. As a control peptide (CP), we produced a peptide encompassing the Flag sequence, which is not expected to bind Aβ. To determine the ability of BP or CP to bind Aβ and characterize their binding affinity, we performed an ELISA assay using increasing concentration of biotinylated Aβ₄₂ oligomers (Aβ_o) or biotinylated Aβ₄₀ monomers (Aβ_m) added to wells precoated with BP or CP. Preparations of Aβ_o enriched in low molecular species (LMW Aβ_o) (Martin et al., 2021) or Aβ_m were used at concentrations ranging from 0 to 10 μg mL⁻¹ on immobilized CP or BP. Aβ_o (Figure 1a) or Aβ_m (Figure 1b) failed to bind to the CP even at the highest concentration,



whereas A β exhibited a strong binding to BP, reaching a plateau at 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figure 1a). A saturation fitting curve equation and a Scatchard analysis were carried out to determine the A β binding affinity for BP, which was in the low nanomolar range ($K_D = 12 \text{ nM}$). In contrast, the binding ability of the A β_m for BP was much weaker, reaching a plateau at 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figure 1b), with a low affinity and a K_D value of 19 μM . Thus, oligomeric species rich in LMW A β bind BP with high affinity. To characterize the BP binding sites on A β , we then performed an epitope mapping experiment using the biochemical dot blot approach. A β_m and LMW A β aggregated for 24 h at 4°C were immobilized on nitrocellulose membranes and probed with specific antibodies directed against the N-terminal and central regions of A β . We reasoned that if an antibody interferes with the binding of biotinylated-BP on A β , this would indicate that it recognizes the same epitope as the BP, or a very near neighbor epitope. Notably, the two antibodies targeting the N-terminal (residues 1–16) and central hydrophobic core of A β (residues 17–24) abrogated the BP-A β interaction (Figure 1c, Figure S1). In contrast, BP does not bind the aggregation-prone region of A β (residues 22–35) (Figure 1c). Altogether, these findings revealed that the 1–24 epitope is the most critical region of A β for this interaction.

Having established that BP binds LMW A β with high affinity at specific epitopes, we investigated whether it can associate in situ with A β . Therefore, we incubated brain sections from the APP/PS1 mouse model of AD with biotinylated BP and identified bound-BP and amyloid plaques using anti-biotin and anti-A β immunostainings, respectively. BP allowed the staining of amyloid plaques and in particular of their periphery at low concentration (Figure 1d), indicating its association with A β oligomers reported to be present as an halo surrounding the A β plaque core (Koffie et al., 2009).

3.2 | BP disrupts A β aggregation and inhibits fibril formation

One of the key pathogenic mechanisms in AD is the toxicity resulting from A β ability to self-aggregate in species rich in β -sheet-based structure (Iadanza et al., 2018). Various aggregated assemblies are generated from A β_m during this aggregation process, from soluble

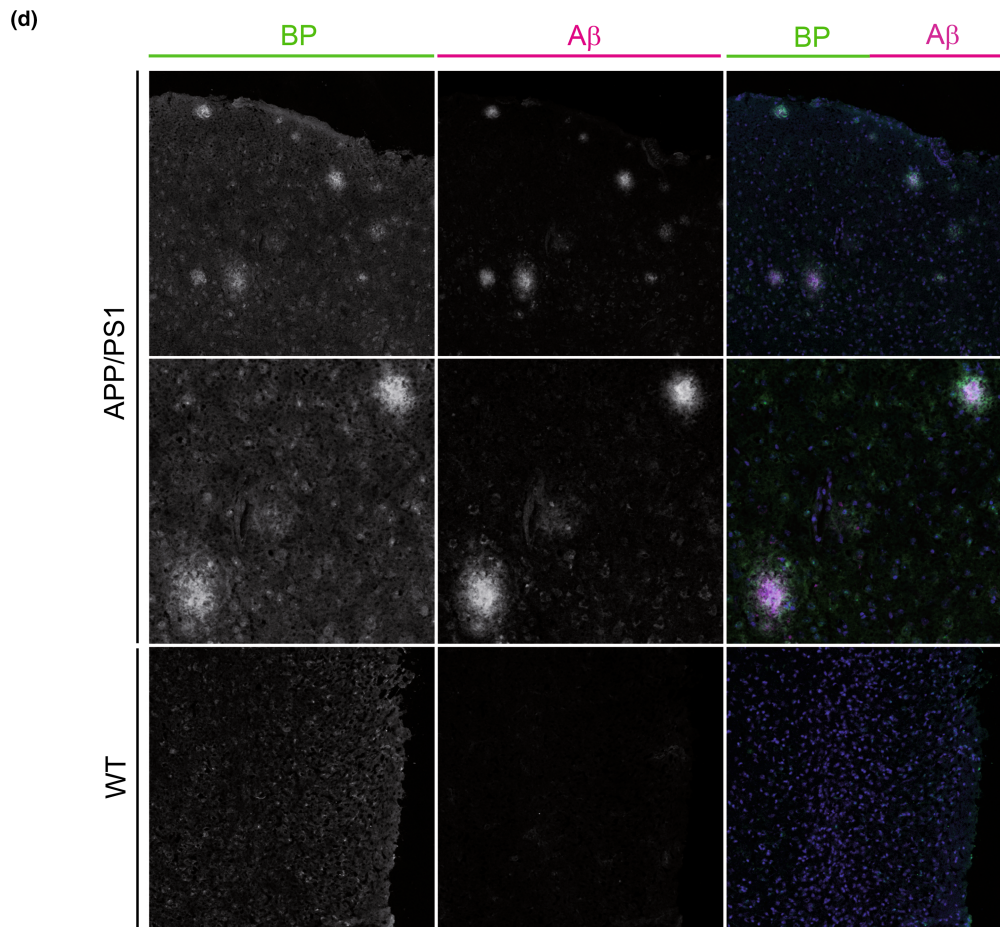
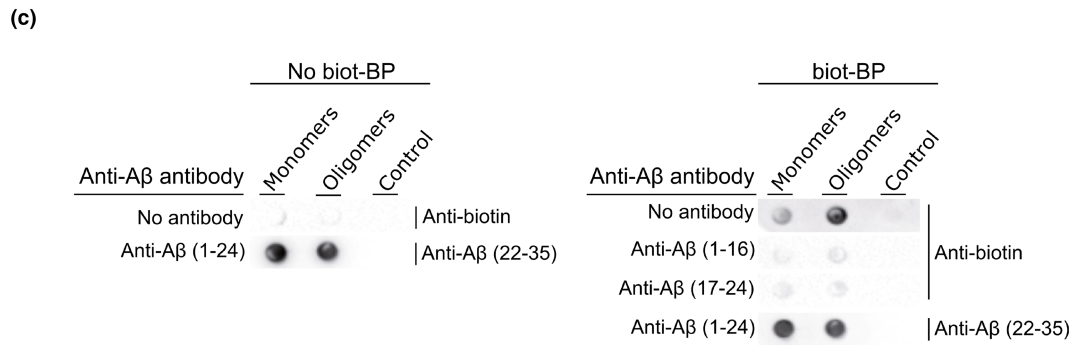
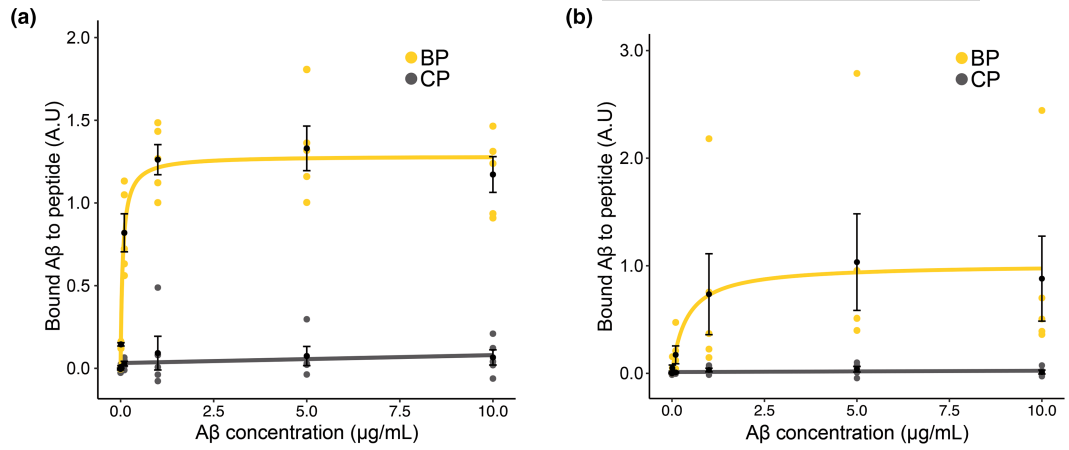
A β in the early stages to insoluble fibrils (Stine et al., 2003). To determine whether BP could interfere with the A β aggregation process and A β fibrillation kinetics, we used a Thioflavin T assay (ThT). Thioflavin T is well known to give a strong fluorescent signal proportional to the amount of β -sheets, when bound to amyloids (Xue et al., 2017). As expected, incubation of A β monomers at 15 μM induced a strong increase in ThT fluorescence, reaching a plateau after 16 h of incubation. Increasing concentrations of CP had no impact on ThT fluorescence compared to A β alone (Figure 2a,c). In contrast, BP substantially decreased the ThT fluorescence at the aggregation plateau, in a concentration-dependent manner (Figure 2b). Importantly, quantitative analyses performed at 24 h revealed that BP significantly decreases A β fibrillation by $82 \pm 1.24\%$ at 5 μM , with a maximum effect obtained using a BP concentration equimolar to that of A β ($95 \pm 2.2\%$, $n=4$, Figure 2d). Thus, BP successfully disrupted A β aggregation and inhibited fibrillation.

To confirm the BP inhibitory effect on A β fibrillation and characterize the size and structure of A β -formed aggregates, we performed transmission electron microscopy (TEM) experiments. A β was aggregated for 24 h at 30 μM , alone or in presence of CP or BP at equimolar concentrations. As expected, when aggregated alone or with CP, A β exhibited typical fibrillary structures with a characteristic twisted morphology (Figure 3a–d). In contrast, in presence of BP A β aggregation led to the formation of large amorphous aggregates associated with infrequent fibril structures (Figure 3e,f). Importantly, such amorphous aggregates were never observed in the A β or A β +CP conditions. Control experiments validated that neither CP (Figure 3g) nor BP (Figure 3h) induced 3-dimensional structures. Altogether, our findings indicate that BP promotes the formation of amorphous A β assemblies that are deviating from the aggregation/fibrillation pathway and considered as less toxic (Lieblein et al., 2020).

3.3 | BP prevents A β HMW oligomers formation

Unlike insoluble A β fibrils, smaller soluble aggregates, the A β_o , are now considered as the most bioactive and toxic A β species (Lue et al., 1999; McLean et al., 1999). Thus, it is critical to determine whether BP which prevents A β fibrillation could also affect the

FIGURE 1 BP strongly binds to A β_o with high affinity. (a) Dose-dependent binding of biotinylated A β_{42} oligomers to immobilized BP analyzed by ELISA, with a titration binding curve showing the strong binding ability of A β_o for BP. (b) ELISA assay illustrating the modest dose-dependent binding of A β_{40} monomers to immobilized BP. Note that no binding of the CP is detected to either A β_o (a) or A β_m (b). $n=5-4$ independent experiments, data represent mean \pm SEM. (c) Epitope mapping of the interaction between A β_o and BP. On the left panel, A β_m and A β_o were immobilized on a nitrocellulose membrane and probed with the anti-biotin antibody to control for non-specific binding. The anti-A β (22–35) specifically recognizes A β_m and A β_o after a preincubation step with anti-A β (1–16) and (17–24) antibodies. On the right panel, immobilized A β_m and A β_o were then incubated for 2 h with the biotinylated BP (biot-BP), and bound biot-BP was recognized by the anti-biotin antibody (top row). Note that the biot-BP preferentially binds A β_o . The BP binding epitope on A β_o was identified by signal suppression in the presence of antibodies targeting A β (1–16) or A β (17–24) incubated prior to biot-BP (middle rows). On the bottom row, co-incubation with anti-A β (1–16) and (17–24) was used to target A β (1–24) region prior to biot-BP incubation. Anti-A β (22–35) immunoblotting revealed that BP does not bind the A β (22–35) region. (d) Binding of biot-BP to A β plaques and peri-plaque area. Immunostainings of 8-month-old APP/PS1 and WT brain sections showing bound biot-BP (left, green on the merge) in relation to A β plaques identified with anti-A β immunostaining (middle, magenta on the merge). Note in the merge that biot-BP staining is found in the plaque core and in the peri-plaque surrounding the core (green halo). Scale bars, (d), 100 μm (top and low rows), 50 μm (middle row).



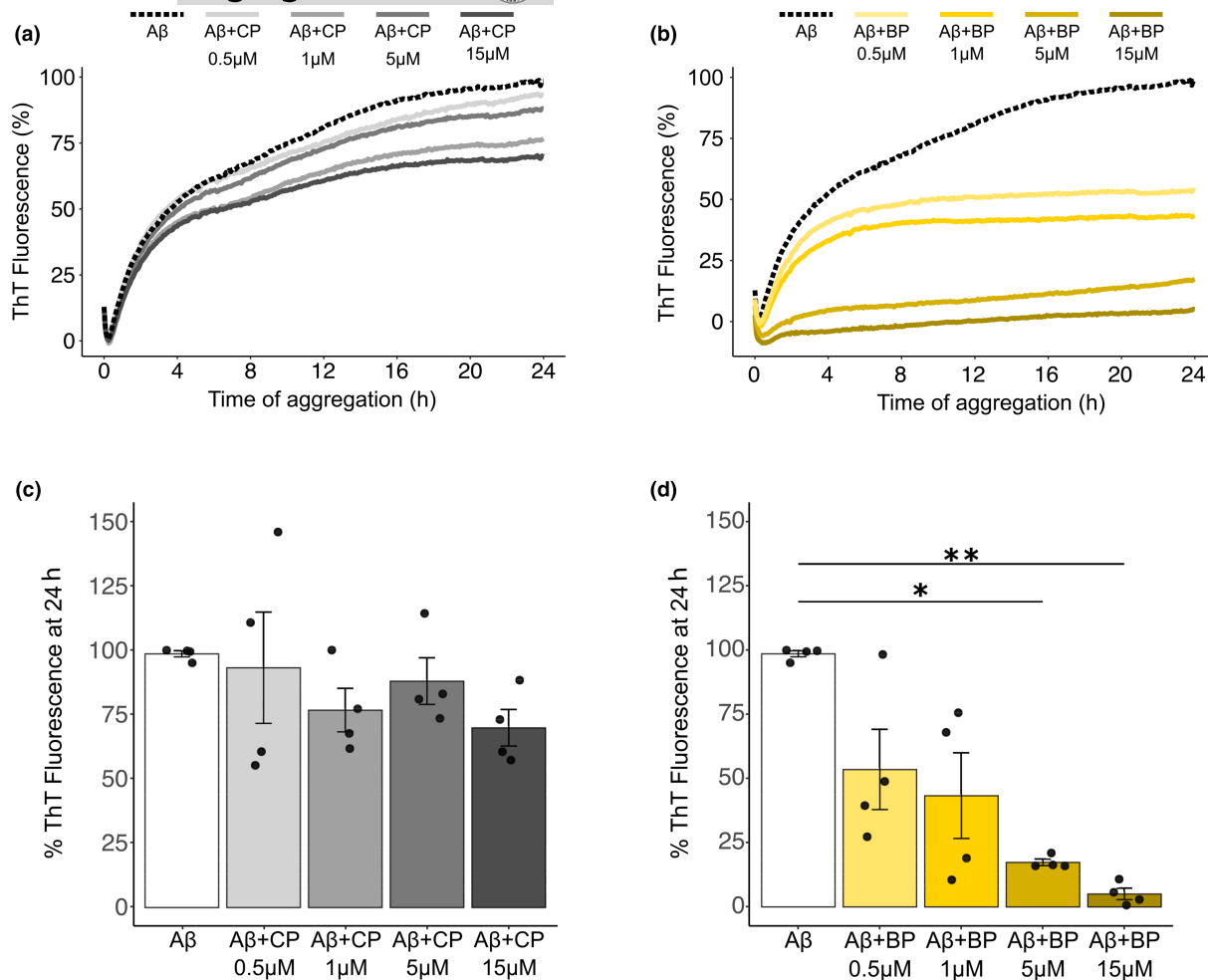


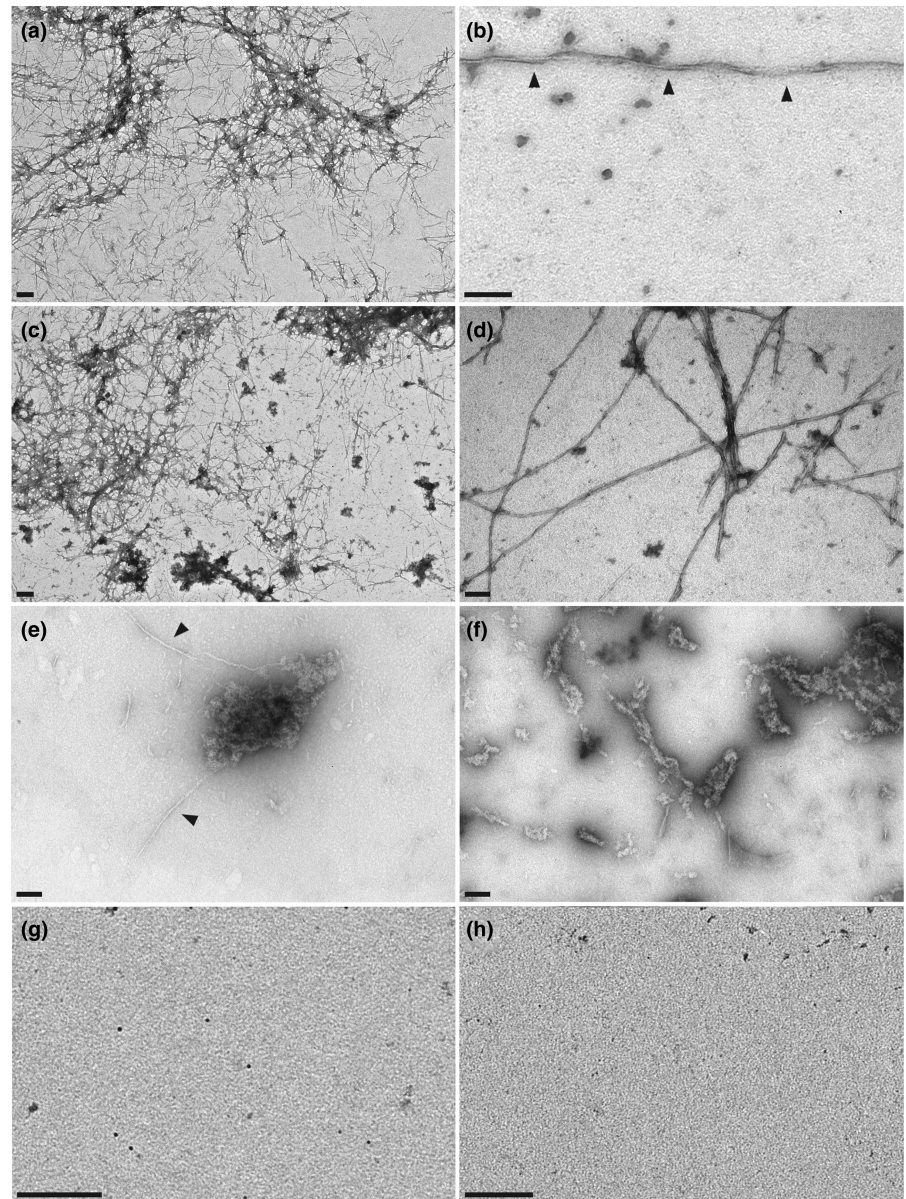
FIGURE 2 BP prevents A β fibrillation in a dose-dependent manner. (a, b) Aggregation kinetics analyzed by ThT fluorescence using 15 μ M of A β m with increasing concentration of the CP (a) or BP (b). Data represented mean values of ThT fluorescence expressed as the percentage of maximum ThT fluorescence, $n=4$ independent experiments. (c, d) Quantitative analysis of ThT fluorescence at 24 h, with the CP showing no significant effect on A β aggregation (c), in contrast to the BP efficiently preventing A β fibrillation in a dose-dependent manner (d). Kruskal-Wallis, $p=0.0038$, followed by Dunn post hoc test, $n=4$ independent experiments. * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

early stages of A β aggregation during which toxic prefibrillar A β are formed (Chiang et al., 2018). To characterize BP impact on the formation of soluble A β species, we incubated A β m for 2 h at 37°C to enrich A β species in high molecular weight (HMW) A β , or for 24 h to favor larger A β aggregates. A β m was incubated alone or in presence of equimolar concentrations of CP or BP, and the resulting pool of soluble A β m, LMW and HMW A β o was analyzed by Western Blot using the 6E10 anti-A β antibody (Figure 4a). After 2 h incubation, BP significantly reduced the fraction of HMW A β o from $78 \pm 4.4\%$ in the A β o alone condition to $59 \pm 5.6\%$ in A β o+BP condition (Figure 4b). This reduction was accompanied by an increase in LMW A β o from $10.5 \pm 2.3\%$ to $20 \pm 2.4\%$ in the A β o alone versus A β o+BP condition (Figure 4b), whereas the CP did not change the proportion of A β o species. A similar effect was obtained at 24 h, since BP also decreased the proportion of HMW A β o compared to the A β o condition (from $85 \pm 0.8\%$ to $71 \pm 0.9\%$) with a combined increase in LMW A β o (from $5 \pm 0.8\%$ to $12 \pm 1.9\%$) and A β m (from $8.6 \pm 1.1\%$ to $16 \pm 1.5\%$) (Figure 4c). Notably, we

also observed a decrease in the amount of fibrils at the top of the gel, in presence of BP, but did not take it into account in the quantitative analysis because fibrils cannot enter the gel. Taken together, these results demonstrate that BP selectively prevents the formation of HMW A β o, but not that of smaller species. This selective inhibition of BP could result from its ability to bind small A β o, which might prevent further assembly beyond LMW A β o.

Since it has been suggested that LMW A β o and A β m identified by western blotting may result from the dissolution of larger aggregates (Bitan et al., 2003), we next used a native dot blot approach probed with a conformational antibody that specifically recognize soluble A β o (Kayed et al., 2003). Notably, the A11 antibody has been shown to target a conformational structure common to toxic oligomeric proteins and block their toxicity in human neuroblastoma cells (Kayed et al., 2003). Thus, A β m alone or in presence of BP was incubated from 0 to 2 h at 37°C, and pre-fibrillar A β aggregates were analyzed using the A11 antibody. Dot blot assay demonstrated that A β oligomerization process produces an

FIGURE 3 BP inhibits A β fibril formation and promotes amorphous aggregates. (a, b) TEM photomicrographs illustrating A β fibrils formed after 24 h aggregation in the A β condition (30 μ M), with fibrils displaying a characteristic twisted morphology (b, black arrowheads). (c, d) Similar fibrillary structures were obtained when A β aggregated with equimolar concentration of the CP. (e, f) However, A β aggregates formed in presence of BP were amorphous in shape, with infrequent fibrillary structures (e, black arrowhead). (g, h) The CP (g) or BP (h) alone do not show any detectable 3D structures by TEM. Scale bars, (a, c), 200 nm; (b, d–h) 100 nm. $n = 4$ independent experiments.



increasing amount of A11 immunoreactive A β o species over time with a weak reactivity against A β m (Figure 4d,e). In contrast, A β oligomerization performed in presence of BP does not form additional A11 binding species to those detected at the start of the incubation, even after 2 h of oligomerization (Figure 4d,f). These findings suggest that A β species produced with the BP originate from an alternative pathway giving rise to species with different conformational structures. This alternative pathway probably involves A β m aggregation into unstructured or amorphous aggregates such as those identified by TEM.

3.4 | BP interferes with A β o synaptic targeting

Extensive studies now indicate that A β o induce a synaptic failure at early stages of AD by exerting their toxic effect as specific ligands for synapses (Colom-Cadena et al., 2020; Esparza

et al., 2013; Koffie et al., 2009). In hippocampal neurons, excitatory synapses have been shown to be prominently targeted by HMW A β o over LMW A β o (Lacor et al., 2004). Thus, to investigate the ability of HMW A β o formed with or without BP to target synapses, we treated mature hippocampal neuron cultures at DIV21 for 30 min with 0.5 μ M of biotinylated A β o aggregated for 2 h in presence of CP or BP. Synapses were identified by the colocalization of Bassoon and PSD95, markers of pre- and post-synaptic zones respectively, and A β immunoreactive clusters were detected with fluorescently labeled streptavidin. A β o alone or in the presence of CP showed a strong binding to hippocampal neuron surface, which specifically concentrated at Bassoon and PSD95 positive synaptic sites. On the contrary, A β o binding to neuron cell surface was strongly prevented when A β o oligomerized in presence of BP, with little colocalization with synaptic clusters (Figure 5a). Quantitative analyses of A β -bound synaptic sites indicated that around 40% of synapses were targeted by A β o alone or with the CP

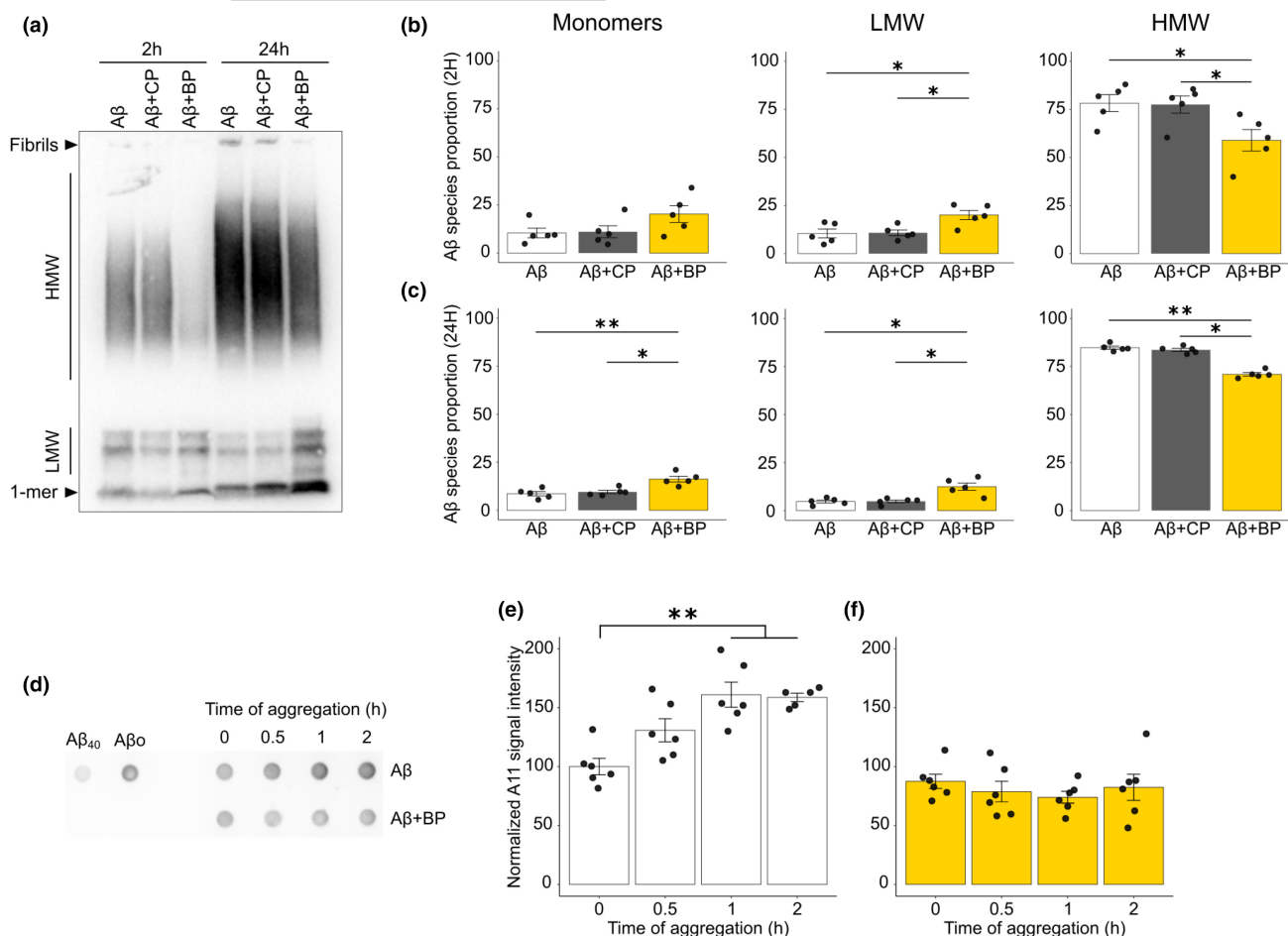


FIGURE 4 BP impedes the formation of HMW A β . (a) Representative Western Blotting experiment probed with the 6E10 anti-A β antibody showing A β aggregated for 2 h or 24 h at 37°C, alone or in presence of equimolar concentration of CP or BP. Note the change in proportion of HMW, LMW A β and monomers (1-mer) in the presence of the BP, but not with the CP. (b) Semi-quantitative analyses of the resulting pool of soluble A β species at 2 and 24 h. (c) The BP significantly decreases HMW A β fraction and increases that of LMW A β at 2 and 24 h, and A β m at 24 h. Kruskal–Wallis followed by Dunn post hoc test, $n=5$ independent experiments. (d) Representative dot blot probed with the conformational A11 antibody showing pre-fibrillar A β aggregates when A β is incubated alone or in presence of the BP, from 0 to 2 h at 37°C. (e, f) Semi-quantitative analysis of A11 signal intensity for A β alone (e) or A β +BP (f) condition, normalized to the signal obtained with A β alone at 0 h. Kruskal–Wallis followed by Dunn post hoc test, $n=5-6$ independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

(Figure 5b). Importantly, the percentage of synapses targeted by A β strongly and significantly decreased in the A β +BP condition to $4.6 \pm 3.8\%$, showing a 89% reduction in A β binding to synapses that matched the values obtained in control conditions, without A β treatment (Figure 5b). Overall, these findings demonstrated that BP prevented the specific binding of A β to synapses, supporting the view that A β formed with BP are less bioactive, with a compromised toxicity.

However, the possibility that BP could act by competing for A β binding sites on synapses cannot be ruled out. Thus, to investigate whether BP may impede A β binding to synaptic partners, we treated hippocampal neuron cultures with pre-formed A β and BP for 30 min. Confocal imaging revealed a strong A β binding to synapses in all A β treated conditions with no effect of BP (Figure S2A), which was confirmed by the quantitative analysis (Figure S2B). Collectively, our results emphasize that BP impedes the formation of bioactive A β that are no longer able to bind synapses, and

further suggest that the underlying mechanism does not involve BP-mediated blockade of putative A β receptors.

3.5 | BP rescues LTP alterations in APP/PS1 mice

Compelling evidence demonstrated that soluble A β from various sources cause a robust inhibition of the Long-Term Potentiation (LTP), a cellular correlate for learning and memory (Mucke & Selkoe, 2012). Given that BP inhibited the formation of A β oligomers that target synapses, we wondered whether it could have an impact on LTP.

Prior to LTP experiments, we explored whether BP exerts an effect on synaptic function in hippocampal neurons using electrophysiological recordings in acute hippocampal slices from WT mice, and characterized potential changes in basal synaptic transmission at various BP concentrations. BP was administrated to

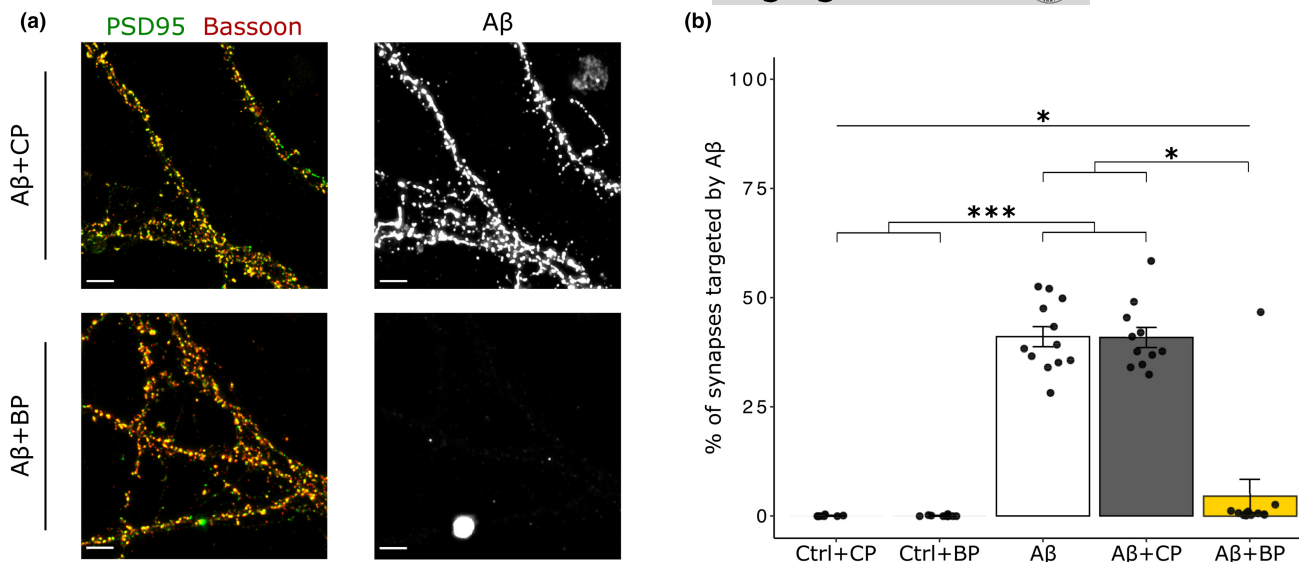


FIGURE 5 BP inhibits the formation of A β able to target synapses. (a) Confocal images of DIV21 hippocampal neuron cultures treated with biotinylated A β preincubated for 2 h at 37°C with CP or BP at equimolar concentrations. Full synapses (yellow clusters) were characterized by PSD95 (green) and Bassoon (red) marker colocalization, with neuronal cell surface A β binding shown in grey. Scale bar = 5 μ m. (b) Quantitative analysis showing the percentage of A β -bound synapses with a dramatic decrease in A β synaptic targeting in the A β + BP condition. Kruskal-Wallis ($p = 1.9e-08$) followed by Dunn post hoc test, $n = 8-12$ from 3 independent experiments, * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

slices over a range from 0.3 to 2 μ M for 30 min and changes in basal synaptic transmission were reflected as changes in EPSP slope. A significant reduction in synaptic transmission was observed at 2 μ M but did not occur at lower concentrations, such as at 0.5 μ M (Figure S3A,B). Thus, we selected the 0.5 μ M concentration to explore the acute effect of BP on LTP inhibition in the APP/PS1 mouse model of AD.

We investigated the effect of acute BP treatment in hippocampal slices derived from 8-month-old APP/PS1 mice, which have been shown to display strong LTP alterations (Gengler et al., 2010). CA1 field Excitatory Post Synaptic Potentials (fEPSP) were recorded in acute slices from WT and APP/PS1 mice before and after Theta Burst Stimulations (TBS) of Schaffer Collaterals (SC). As expected, TBS elicited a robust LTP at SC-CA1 synapses in WT slices, but failed to induce an LTP in APP/PS1 slices even 60 min after TBS (Figure 6a,b), in agreement with a previous study (Gengler et al., 2010). We then incubated WT or APP/PS1 slices with CP or BP at 0.5 μ M, at least 40 min before TBS induction. Importantly, CP treatment failed to restore LTP after TBS in APP/PS1 slices (Figure 6d), whereas BP successfully rescued LTP, which persisted for at least 60 min after TBS (Figure 6f). Notably, neither CP nor the BP impacted LTP responses in WT slices (Figure 6c,e), indicating that BP has no effect on LTP in the absence of A β aggregates. Quantitative analyses of fEPSP slopes demonstrated that LTP was strongly and significantly impaired in APP/PS1 slices treated with the CP compared to CP-treated WT slices ($119 \pm 9.1\%$ in CP-treated APP/PS1 slices versus $191.4 \pm 18.3\%$ in CP-treated WT slices, post hoc test, $p < 0.05$; $n = 7-6$, Figure 6g). In contrast, BP treatment substantially alleviated LTP impairment in APP/PS1

slices to reach LTP amplitude obtained in WT slices ($226.7 \pm 40.5\%$ in BP-treated APP/PS1 slices versus $223.8 \pm 29.3\%$ in BP-treated WT slices, post hoc test, ns; $n = 7-6$, Figure 6g).

To better understand the underlying mechanism involved in LTP rescue triggered by BP in APP/PS1 slices, we examined the paired-pulse facilitation induced by two electrical stimuli close in time (50 ms), a phenomenon known to be of presynaptic origin. The paired-pulse ratio (PPR, see Section 2.5) was assessed before and after TBS in slices from the different experimental groups. A slight decrease in PPR was observed in both WT and APP/PS1 slices instantly after TBS, but no differences were detected between groups after CP or BP application (Figure S4). Thus, these findings indicate that the restoration of LTP in BP-treated APP/PS1 group was not due to an increased probability of glutamate release at SC-CA1 synapses, involving a presynaptic mechanism.

Furthermore, we explored whether BP effect on LTP was long lasting by stimulating two independent synaptic inputs onto the same CA1 neuronal population in WT and APP/PS1 hippocampal slices. TBS was applied to the S1 pathway (Stim 1) to elicit late-LTP, whereas control synaptic responses were recorded from the independent S2 pathway (Stim 2) (Figure S5A), as previously reported (Navakkode et al., 2021). Importantly, BP treatment restored the late phase of LTP in APP/PS1 slices up to 180 min, without affecting the control pathway (Figure S5C, $261.8 \pm 45.2\%$ for the S1 pathway versus $98.6 \pm 5.2\%$ for the control pathway, $p = 0.015$, $n = 5$ mice).

Taken together, the present findings demonstrated that BP has the ability to rescue early and late LTP deficits in the APP/PS1 mouse model of AD, at an age when functional and structural synaptic alterations have already largely occurred.

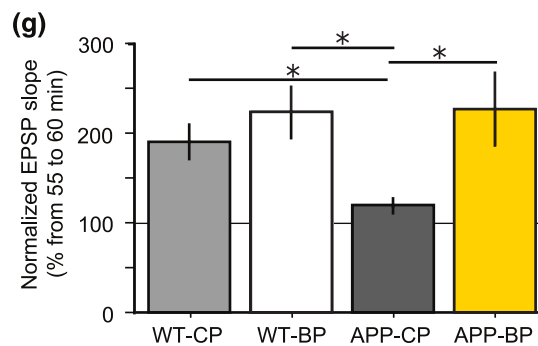
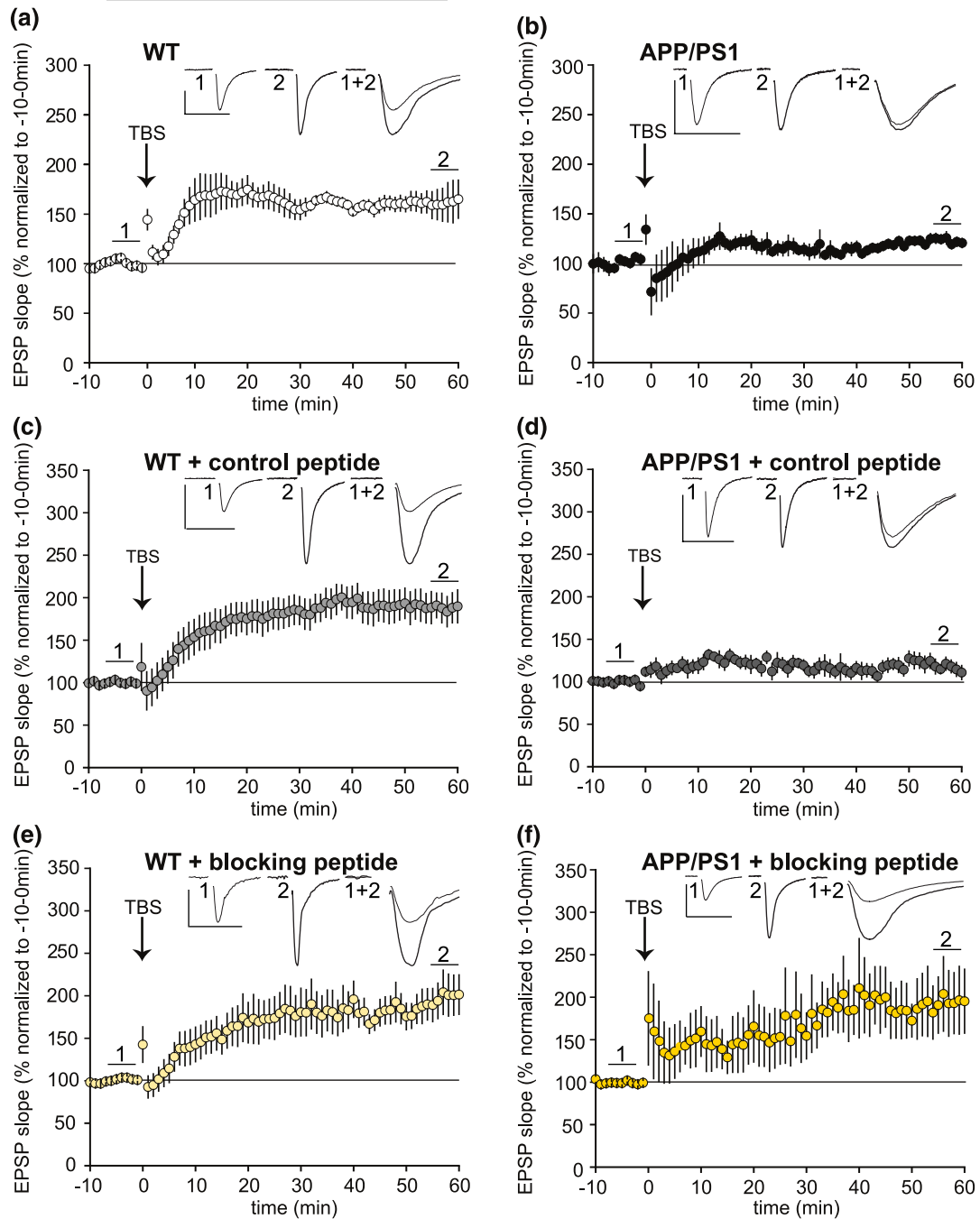




FIGURE 6 Restoration of LTP in aged APP/PS1 mice slices after BP treatment. (a–f) Time course of synaptic responses at the Schaffer collateral to CA1 synapses after inducing LTP with a Theta Burst Stimulation protocol (TBS) in slices from 8-month-old WT (a, c, e) and APP/PS1 mice (b, d, f). Representative fEPSP traces (average of 5 min recording immediately before TBS (1, thin line) and 55 min after TBS (2, thick line). Traces 1+2 represented superimposed traces 1 and 2 with a four-fold stretch of their time axis to better illustrate the fEPSP slopes. A robust LTP was induced in WT slices (a, $n=6$ mice) whereas an impaired LTP was recorded in APP/PS1 slices after TBS (b, $n=7$ mice). The incubation of CP (c, $n=6$ mice) or BP (e, $n=6$ mice) at $0.5\ \mu\text{M}$ at least 40 min before TBS did not modulate LTP in WT slices. In APP/PS1 slices, although CP failed to induce an LTP after TBS induction (d, $n=7$ mice), BP treatment restored a robust LTP response 60 min after TBS induction (f, $n=7$ mice). (g) Summary bar graph showing that LTP is significantly decreased in APP/PS1 slices incubated with the CP compared to CP-treated WT slices (LTP amplitude computed as fEPSP slope 55–60 min after TBS is decreased from $191.4 \pm 18.3\%$ in WT slices + CP to $119 \pm 9.1\%$ in APP/PS1 slices + CP, $n=7-6$ mice, Kruskal–Wallis test $p=0.01$, $\chi^2=10.73$, $df=3$, Dunn post hoc test $p<0.05$). In contrast, BP treatment rescued LTP in APP/PS1 slices compared to the CP treatment (LTP is increased from $119.8 \pm 9.1\%$ in APP/PS1 slices + CP to $226.7 \pm 40.5\%$ in APP/PS1 slices + BP, $n=7-7$, $*p<0.05$).

3.6 | BP effect on VEGF/VEGFR2 pathway and its alteration due to A β o

Our previous report has shown that VEGF has the ability to preserve synapses from dysfunction and LTP deficits caused by A β o (Martin et al., 2021). Consistent with this VEGF effect on LTP restoration, neuronal expression of VEGFR2 was shown to be mandatory in the hippocampus for allowing normal LTP expression. Thus, because BP corresponds to a part of the first Heparin Binding Domain (HBD) of the VEGF linear sequence (Martin et al., 2021), we investigated whether it could have an impact on VEGFR2 activation induced by VEGF. HUVEC cells naturally expressing VEGFR2 were treated with VEGF at $5\ \text{ng mL}^{-1}$ with or without $0.5\ \mu\text{M}$ of CP or BP for 5 min. Western Blotting analyses showed that acute application of BP or CP alone did not affect basal VEGFR2 phosphorylation level. Furthermore, they indicated that VEGF application induced a significant increase in VEGFR2 phosphorylation, which was not affected by BP or CP treatment (Figure S6A,B). Thus these data revealed that BP does not inhibit VEGFR2 signaling. We then investigated by ELISA assay whether BP could prevent the interaction between A β o and VEGF that we characterized in our previous report (Martin et al., 2021). Increasing concentrations of CP preincubated with A β o at $2.1\ \mu\text{M}$ did not affect A β o binding to immobilized VEGF, even at the highest concentration. In contrast, BP efficiently prevented A β o binding to VEGF in a concentration-dependent manner (Figure S6C). A sigmoidal dose–response curve fitting was used for data analyses which determined an EC_{50} of $350\ \text{nM}$ in the BP condition. These results showed that BP can efficiently prevent A β o–VEGF interaction and potentially release VEGF.

4 | DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that the blocking peptide (BP) mimicking part of the heparin binding domain of the VEGF protein sequence inhibits the process of A β self-aggregation, leading to the blockade of synaptic targeting by soluble A β -derived oligomers (A β o). Using a combination of biochemical, cell imaging, and electrophysiological approaches, we deciphered the mode of action of BP on molecular and cellular mechanisms underlying AD pathogenesis. First, we revealed that BP directly interacts with A β o

enriched in LMW species with a high affinity in the nanomolar range. Second, we further revealed that this direct interaction impedes A β aggregation process, with an impairment in the formation of HMW A β o at early stages, which results ultimately in fibril formation blockade. Consequently, A β o formed in the presence of the BP failed to display reactivity to the A11 conformational antibody, which has been reported to recognize highly toxic A β o. Furthermore, A β o assemblies formed with the BP lose their ability to bind to synapses, consistent with the protecting role of the BP against the disruption of synaptic plasticity observed in hippocampal slices from the APP/PS1 mouse model of AD. Together these data provided the first evidence of a key role for a VEGF-derived peptide in blocking the toxic A β aggregation process and maintaining synaptic function in AD pathology.

4.1 | Impact of the BP on A β aggregation

In AD, a key pathological process is the self-aggregation of A β m into β -sheet-rich A β o species (Lee et al., 2017). Initially, A β o are derived from a pool of unstructured A β m and proceed into larger β -sheet-rich soluble aggregates through the primary nucleation process, that ultimately leads to mature amyloid fibrils (Knowles et al., 2014; Lee et al., 2017). However, it is the fibril-catalyzed secondary nucleation process that speeds up A β oligomerization and substantially increases the amount of A β o (Cohen et al., 2013). Our kinetics study of A β aggregation using the ThT assay monitored the amount of β -sheet amyloid structures over time and demonstrated a dose-dependent inhibition of A β fibril formation in the presence of the BP. These findings imply that the inhibition in fibril formation induced by BP results from molecular interactions between BP and A β assemblies early in the aggregation process. However, we detected using an ELISA assay a low binding affinity of the BP to A β m, in sharp contrast to its high affinity for LMW A β o species, formed at 4°C for 24 h, which is in the nanomolar range. Thus, we speculated that BP preferentially binds to small LMW A β o, preventing them to further associate in β -sheet-rich aggregates and fibrils. Determination of A β o structure is challenging due to their transient nature and their high self-aggregation rate, but transmission electron microscopy remains a benchmark technique to characterize the morphology of insoluble aggregates (Gremer et al., 2017). Our data revealed that BP



promotes the formation of large amorphous A β aggregates after 24 h at 37°C, suggesting a diversion of soluble A β assemblies from the fibril forming pathway.

What are the implications of amorphous aggregates in AD pathophysiological events? Diffuse plaques with amorphous A β deposits and little or no fibrillar A β have not been associated with synapse loss or glial responses in AD brains, in contrast to dense-core plaques rich in β -sheet structures that are surrounded by dystrophic neurites and reactive glial cells (Serrano-Pozo et al., 2011). Indeed, diffuse plaques are typically observed in the brain of non-demented elderly people with cognitively intact abilities (Malek-Ahmadi et al., 2016).

4.2 | BP prevents conformational changes of A β oligomers linked to their toxicity

Convincing evidence now indicate that soluble A β rather than insoluble fibrils are the main culprit for triggering the first toxic effects on synapses in AD (Ashe, 2020; Sengupta et al., 2016). Thus, it is critical to understand how oligomers can induce toxicity and whether there is a structure-toxicity relationship. A β species have been shown to display an increase in β -sheet content as oligomerization proceeds with the formation of dimers, trimers, tetramers and so on, in contrast to A β m that are largely unstructured (Ono et al., 2009). This increase in β -sheet content is reflected at the ultrastructural level by a transition from thread-like shaped monomers to spherical A β (Ono et al., 2009). A β have a profound impact on lipid bilayers by triggering lipid dispersion and extraction, whereas A β m do not alter lipid membrane integrity (Bode et al., 2019). Similarly, cell membrane disruption has been reported for synuclein oligomers that are rich in β -sheet structures which create a rigid core penetrating the membrane and impeding its integrity (Fusco et al., 2017). Thus, β -sheet structures appear to be a key molecular basis of the oligomer-mediated cell toxicity. As we demonstrated using TEM that BP promotes A β aggregation in amorphous assemblies devoid from β -sheet structures, BP could stimulate an alternative pathway stabilizing unstructured A β . Interestingly, amorphous A β have been shown to be non-toxic due to the loss of well-defined β -sheet structure (Ehrnhoefer et al., 2008) that provide A β the ability to bind to cell membranes and/or create calcium ion-permeable channels or pore structures (Lee et al., 2017), as those formed with annular A β aggregates (Lashuel et al., 2002). To better characterize the impact of BP on toxic A β formation, we took advantages of reactivity of the A11 conformational antibody that recognizes an anti-parallel β -sheet structure rather than sequence-based epitope which are common to toxic oligomeric proteins (Kayed et al., 2003; Laganowsky et al., 2012). As A11 antibody is known to target prefibrillar A β that are formed by primary nucleation before fibril formation (Ashe, 2020; Kaye et al., 2010), we investigated A β oligomerization kinetics with A11 reactivity as a readout of A β potential toxicity. Using non-denaturing dot blot assay, we showed that there is a progressive and significant increase in A11-immunoreactive toxic A β during the oligomerization process, as

reported previously (Henning-Knechtel et al., 2020), whereas BP blocks this time-dependent increase in A11 binding to A β . Thus, BP may efficiently block the formation of toxic β -sheet structured A β in favor of unstructured A β , not recognized by the A11 conformational antibody, emphasizing the potential protective role of the BP on A β toxicity.

4.3 | Consequences of BP treatment on synaptic targeting by A β oligomers

Extensive research demonstrated that A β toxicity on synapses involves their selective binding to excitatory synapses (Mucke & Selkoe, 2012; Peng et al., 2022). High-resolution imaging techniques and single particle tracking have revealed their unique ability to target synapses in living hippocampal neurons, whether they are derived from patient's brain with AD or from synthetic preparations (Lacor et al., 2004, 2007; Renner et al., 2010). Characterizing A β species that specifically bind synapses is challenging because time, ionic strength, temperature, concentration, A β isoform and pH influence A β association kinetics (Stine et al., 2003). In addition, time, concentration and A β nature have been shown to critically impact their synaptic targeting ability because synthetic HMW A β with a MW > 50kDa predominantly bind synapses in a short time sequence of 30 min, over LMW A β (Lacor et al., 2004). Thus, we first investigated whether BP can affect the size of A β species during the oligomerization process and revealed that it substantially reduces the pool of HMW A β > 50kDa over the LMW A β . The significance of HMW A β is particularly relevant since they have been reported to be the most abundant in the brain of AD patients (Hong et al., 2018; Yang et al., 2017) and could constitute reservoirs of toxic species (Yang et al., 2017). In the present study, biochemically characterized HMW A β have been shown to target more than 40% of excitatory hippocampal synapses identified by the co-expression of the pre- and postsynaptic markers Bassoon and PSD95, in agreement with previous reports (Lacor et al., 2004). In contrast, only 5% of hippocampal synapses display A β binding, when A β is oligomerized in the presence of the BP. Thus, our findings demonstrated that BP which prevents the formation of HMW A β over LMW species, significantly impedes A β binding to synapses. Overall, they indicate that BP may have an important role in limiting the accumulation of A β at synaptic sites, raising the question of its impact on A β -mediated synaptotoxicity.

4.4 | Impact of BP on synaptic plasticity in the APP/PS1 mouse model of AD

At synapses, an increasing number of proteins have been identified as potential receptors for A β (Smith & Strittmatter, 2017), but the A β structure and size required to bind these receptors is still unknown. These specific and high affinity receptors are essential to the mechanism of A β toxicity since A β accumulation at both sides



of the synapse causes major impairments in synapse function (Koffie et al., 2012; Pickett et al., 2016; Ting et al., 2007). Notably, A β isolated from soluble fractions of AD human brain extracts, from mouse or cellular models of the disease or derived from synthetic preparations, have been shown to be bioactive and to consistently inhibit long-term potentiation (LTP), an electrophysiological correlate of learning and memory (Lambert et al., 1998; Shankar et al., 2008; Walsh et al., 2002). Here, we used LTP electrophysiological recordings as a readout for real time monitoring of A β -induced alterations in synaptic function. We confirmed that theta burst stimulation (TBS) failed to induce LTP in the CA1 region in hippocampal slices derived from 8-month-old APP/PS1 mice, as previously reported (Gengler et al., 2010). These LTP alterations were detected long after the first structural changes of CA1 hippocampal synapses were reported in 3-month-old APP/PS1 mice (Paumier et al., 2022). Despite these early alterations, we demonstrated that acute BP treatments in 8-month-old APP/PS1 hippocampal slices result in the restoration of LTP responses within 1 hour after the TBS. The kinetics underlying the rapid rescue action of the BP suggest that BP could prevent the interaction between toxic A β species and synaptic receptors, and raises the question of whether presynaptic or postsynaptic mechanisms are involved. As we found no changes in the paired-pulse ratios due to BP treatment that would likely indicate a presynaptic mechanism, we speculated that BP could modulate the activity of postsynaptic glutamate receptors in APP/PS1 hippocampal CA1 neurons. Interestingly, BP is a VEGF-derived peptide and we previously reported that VEGF plays a key role in rescuing A β -mediated impairments in hippocampal LTP, by maintaining the pool of postsynaptic AMPA receptors (Martin et al., 2021). In addition, we also highlighted the relevance of VEGFR2 receptor activity for adult hippocampal LTP (De Rossi et al., 2016) and revealed that VEGFR2 activation is blocked by A β and their interaction with VEGF (Martin et al., 2021). Therefore, we hypothesized that BP could limit VEGF trapping by interacting with A β assemblies in APP/PS1 hippocampal slices and allow VEGFR2 activation in CA1 neurons and LTP rescue. In support of this hypothesis, we further demonstrated that BP has the ability to prevent A β -VEGF interaction.

In conclusion, our findings have major implications for pathogenic mechanisms in AD since the blocking peptide binds to specific populations of A β oligomers, interferes with their toxic aggregation process and further impedes the formation of A β that prominently target synapses. Furthermore, it specifically neutralizes A β -mediated synaptotoxicity in a more complex AD model and rapidly normalizes synaptic plasticity processes that are a cellular correlate of learning and memory processes. Thus, we envision to use a chronic intranasal delivery system in vivo in APP/PS1 mice to overcome the Blood Brain Barrier and target brain A β with BP. Specific nanoformulations have already been shown to allow an efficient brain targeting with drug accumulation, due to their nanosize and chemical protective nanoenvironment (Agrawal et al., 2018). This would provide a strategy for assessing BP efficacy in preventing cognitive impairment and reducing A β load, and in limiting the development of neuritic plaques with related tau pathology in AD transgenic mice.

Therefore, the present study opens the possibility of using a novel therapeutic option for reducing amyloid seeding and neutralizing highly toxic soluble A β oligomers in AD.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PB and PdeG contributed equally to this work. PB and PdeG were involved in conception and study design, conducted experiments, analyzed and discussed data. PB was also involved in manuscript writing. MA performed experiments, analyzed and interpreted data. NC carried out culture experiments. JGD and JH discussed data and JH provided financial support. PAS contributed to study design, conducted electrophysiological experiments, analyzed and discussed data. CM conceptualized and supervised the study, wrote the manuscript and provided financial support. All authors commented on the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Elisabeth Errazuriz and Denis Ressenkoff from the Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est, Aurélie Mongope, Caroline Dumont and Jean-Michel Vicat from the Animalerie Lyon-Est Module SPF facility (University Lyon 1), as well as Sandrine Blondel from the Center for Neurosciences in Lyon for assistance. We also thank Pr. Rakez Kaye for providing the A11 anti-A β antibody. We are grateful to Alain Buisson, Nathalie Mandairon, Marie-Claude Potier, Marc Dhenain and Gael Barthet for helpful discussions. This study was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the French foundation "France Alzheimer" (to C.M. R22002CC/RAK22001CCA); P.B. and P.de G. were supported by a doctoral research contract from the French Ministry of Higher Education and Research.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available in the supplementary material of this article (Tables S2 and S3).

ORCID

C. Meissirel  <https://orcid.org/0000-0002-4964-6377>

REFERENCES

- Agrawal, M., Saraf, S., Saraf, S., Antimisiaris, S. G., Chougule, M. B., Shoyele, S. A., & Alexander, A. (2018). Nose-to-brain drug delivery: An update on clinical challenges and progress towards approval of anti-Alzheimer drugs. *Journal of Controlled Release*, 281, 139–177. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.011>
- Ashe, K. H. (2020). The biogenesis and biology of amyloid β oligomers in the brain. *Alzheimer's & Dementia*, 16, 1561–1567. <https://doi.org/10.1002/alz.12084>
- Benilova, I., Karran, E., & De Strooper, B. (2012). The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: An emperor in need of clothes. *Nature Neuroscience*, 15, 349–357. <https://doi.org/10.1038/nn.3028>
- Bitan, G., Kirkitadze, M. D., Lomakin, A., Vollers, S. S., Benedek, G. B., & Teplow, D. B. (2003). Amyloid β -protein (A) assembly: A β 40 and



- A β 42 oligomerize through distinct pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 330–335. <https://doi.org/10.1073/pnas.222681699>
- Bode, D. C., Freeley, M., Nield, J., Palma, M., & Viles, J. H. (2019). Amyloid- β oligomers have a profound detergent-like effect on lipid membrane bilayers, imaged by atomic force and electron microscopy. *The Journal of Biological Chemistry*, 294, 7566–7572. <https://doi.org/10.1074/jbc.AC118.007195>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82, 239–259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Cao, L., Jiao, X., Zuzga, D. S., Liu, Y., Fong, D. M., Young, D., & During, M. J. (2004). VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nature Genetics*, 36, 827–835. <https://doi.org/10.1038/ng1395>
- Chen, G., Xu, T., Yan, Y., Zhou, Y., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38, 1205–1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
- Chiang, A. C. A., Fowler, S. W., Reddy, R., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Sherman, M. A., Lesne, S. E., & Jankowsky, J. L. (2018). Discrete pools of Oligomeric amyloid- β track with spatial learning deficits in a mouse model of Alzheimer amyloidosis. *The American Journal of Pathology*, 188, 739–756. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.11.011>
- Cohen, S. I. A., Linse, S., Luheshi, L. M., Hellstrand, E., White, D. A., Rajah, L., Otzen, D. E., Vendruscolo, M., Dobson, C. M., & Knowles, T. P. J. (2013). Proliferation of amyloid- β 42 aggregates occurs through a secondary nucleation mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 9758–9763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218402110>
- Colom-Cadena, M., Spires-Jones, T., Zetterberg, H., Blennow, K., Caggiano, A., DeKosky, S. T., Fillit, H., Harrison, J. E., Schneider, L. S., Scheltens, P., de Haan, W., Grundman, M., van Dyck, C. H., Izzo, N. J., Catalano, S. M., & Synaptic Health Endpoints Working Group. (2020). The clinical promise of biomarkers of synapse damage or loss in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 12, 21. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00588-4>
- De Rossi, P., Harde, E., Dupuis, J. P., Martin, L., Chounlamountri, N., Bardin, M., Watrin, C., Benetollo, C., Pernet-Gallay, K., Luhmann, H. J., et al. (2016). A critical role for VEGF and VEGFR2 in NMDA receptor synaptic function and fear-related behavior. *Molecular Psychiatry*, 21, 1768–1780. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.195>
- Ehrnhoefer, D. E., Bieschke, J., Boeddrich, A., Herbst, M., Masino, L., Lurz, R., Engemann, S., Pastore, A., & Wanker, E. E. (2008). EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15, 558–566. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1437>
- Esparza, T. J., Zhao, H., Cirrito, J. R., Cairns, N. J., Bateman, R. J., Holtzman, D. M., & Brody, D. L. (2013). Amyloid-beta Oligomerization in Alzheimer dementia vs. high pathology controls. *Annals of Neurology*, 73, 104–119. <https://doi.org/10.1002/ana.23748>
- Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., & De Felice, F. G. (2015). Soluble amyloid- β oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 191. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00191>
- Fusco, G., Chen, S. W., Williamson, P. T. F., Cascella, R., Perni, M., Jarvis, J. A., Cecchi, C., Vendruscolo, M., Chiti, F., Cremades, N., Ying, L., Dobson, C. M., & de Simone, A. (2017). Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by α -synuclein oligomers. *Science*, 358, 1440–1443. <https://doi.org/10.1126/science.aan6160>
- Garcia, K. O., Ornellas, F. L. M., Martin, P. K. M., Patti, C. L., Mello, L. E., Frussa-Filho, R., Han, S. W., & Longo, B. M. (2014). Therapeutic effects of the transplantation of VEGF overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells in the hippocampus of murine model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6, 30. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00030>
- Gengler, S., Hamilton, A., & Hölscher, C. (2010). Synaptic plasticity in the hippocampus of a APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease is impaired in old but not young mice. *PLoS One*, 5, e9764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009764>
- Gremer, L., Schölzel, D., Schenk, C., Reinartz, E., Labahn, J., Ravelli, R. B. G., Tusche, M., Lopez-Iglesias, C., Hoyer, W., Heise, H., Willbold, D., & Schröder, G. F. (2017). Fibril structure of amyloid- β (1–42) by cryo-electron microscopy. *Science*, 358, 116–119. <https://doi.org/10.1126/science.aao2825>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256, 184–185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Henning-Knechtel, A., Kumar, S., Wallin, C., Król, S., Wärmländer, S. K. T. S., Jarvet, J., Esposito, G., Kirmizialtin, S., Gräslund, A., Hamilton, A. D., & Magzoub, M. (2020). Designed cell-penetrating peptide inhibitors of amyloid-beta aggregation and cytotoxicity. *Cell Reports Physical Science*, 1, 100014. <https://doi.org/10.1016/j.xcrp.2020.100014>
- Herrán, E., Ruiz-Ortega, J. Á., Aristieta, A., Igartua, M., Requejo, C., Lafuente, J. V., Ugedo, L., Pedraz, J. L., & Hernández, R. M. (2013). In vivo administration of VEGF- and GDNF-releasing biodegradable polymeric microspheres in a severe lesion model of Parkinson's disease. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85, 1183–1190. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.03.034>
- Hohman, T. J., Bell, S. P., Jefferson, A. L., & Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. (2015). The role of vascular endothelial growth factor in neurodegeneration and cognitive decline: Exploring interactions with biomarkers of Alzheimer disease. *JAMA Neurology*, 72, 520–529. <https://doi.org/10.1001/jaman.2014.4761>
- Hong, W., Wang, Z., Liu, W., O'Malley, T. T., Jin, M., Willem, M., Haass, C., Frosch, M. P., & Walsh, D. M. (2018). Diffusible, highly bioactive oligomers represent a critical minority of soluble A β in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathologica*, 136, 19–40. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1846-7>
- Iadanza, M. G., Jackson, M. P., Hewitt, E. W., Ranson, N. A., & Radford, S. E. (2018). A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19, 755–773. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0060-8>
- Kayed, R., Canto, I., Breydo, L., Rasool, S., Lukacsovich, T., Wu, J., Iii, R. A., Pensalfini, A., Yeung, S., Head, E., et al. (2010). Conformation dependent monoclonal antibodies distinguish different replicating strains or conformers of prefibrillar ab oligomers. *Molecular Neurodegeneration*, 5, 10. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-57>
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., & Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, 300, 486–489. <https://doi.org/10.1126/science.1079469>
- Knowles, T. P. J., Vendruscolo, M., & Dobson, C. M. (2014). The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15, 384–396. <https://doi.org/10.1038/nrm3810>
- Koffie, R. M., Hashimoto, T., Tai, H.-C., Kay, K. R., Serrano-Pozo, A., Joyner, D., Hou, S., Kopeikina, K. J., Frosch, M. P., Lee, V. M., Holtzman, D. M., Hyman, B. T., & Spires-Jones, T. L. (2012). Apolipoprotein E4 effects in Alzheimer's disease are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid- β . *Brain*, 135, 2155–2168. <https://doi.org/10.1093/brain/aws127>
- Koffie, R. M., Meyer-Luehmann, M., Hashimoto, T., Adams, K. W., Mielke, M. L., Garcia-Alloza, M., Micheva, K. D., Smith, S. J., Kim, M. L., Lee, V. M., Hyman, B. T., & Spires-Jones, T. L. (2009). Oligomeric amyloid β associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*



- States of America*, 106, 4012–4017. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811698106>
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Chang, L., Fernandez, S. J., Gong, Y., Viola, K. L., Lambert, M. P., Velasco, P. T., Bigio, E. H., Finch, C. E., Krafft, G. A., & Klein, W. L. (2004). Synaptic targeting by Alzheimer's-related amyloid oligomers. *The Journal of Neuroscience*, 24, 10191–10200. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3432-04.2004>
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Furlow, P. W., Sanz Clemente, A., Velasco, P. T., Wood, M., Viola, K. L., & Klein, W. L. (2007). A β oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience*, 27, 796–807. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3501-06.2007>
- Laganowsky, A., Liu, C., Sawaya, M. R., Whitelegge, J. P., Park, J., Zhao, M., Pensalfini, A., Soriaga, A. B., Landau, M., Teng, P. K., Cascio, D., Glabe, C., & Eisenberg, D. (2012). Atomic view of a toxic amyloid small oligomer. *Science*, 335, 1228–1231. <https://doi.org/10.1126/science.1213151>
- Lambert, M. P., Barlow, A. K., Chromy, B. A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T. E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K. L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C. E., Krafft, G. A., & Klein, W. L. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from A β_{1-42} are potent central nervous system neurotoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 6448–6453. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6448>
- Lashuel, H. A., Hartley, D., Petre, B. M., Walz, T., & Lansbury, P. T. (2002). Amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature*, 418, 291. <https://doi.org/10.1038/418291a>
- Laurén, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W., & Strittmatter, S. M. (2009). Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid- β oligomers. *Nature*, 457, 1128–1132. <https://doi.org/10.1038/nature07761>
- Lee, S. J. C., Nam, E., Lee, H. J., Savelieff, M. G., & Lim, M. H. (2017). Towards an understanding of amyloid- β oligomers: Characterization, toxicity mechanisms, and inhibitors. *Chemical Society Reviews*, 46, 310–323. <https://doi.org/10.1039/C6CS00731G>
- Licht, T., Goshen, I., Avital, A., Kreisel, T., Zubedat, S., Eavri, R., Segal, M., Yirmiya, R., & Keshet, E. (2011). Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 5081–5086. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007640108>
- Lieblein, T., Zangl, R., Martin, J., Hoffmann, J., Hutchison, M. J., Stark, T., Stirnal, E., Schrader, T., Schwalbe, H., & Morgner, N. (2020). Structural rearrangement of amyloid- β upon inhibitor binding suppresses formation of Alzheimer's disease related oligomers. *eLife*, 9, e59306. <https://doi.org/10.7554/eLife.59306>
- Long, J. M., & Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer disease: An update on pathobiology and treatment strategies. *Cell*, 179, 312–339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>
- Lue, L.-F., Kuo, Y.-M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J. H., Rydel, R. E., & Rogers, J. (1999). Soluble amyloid β peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, 155, 853–862. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65184-x](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65184-x)
- Malek-Ahmadi, M., Perez, S. E., Chen, K., & Mufson, E. J. (2016). Neuritic and diffuse plaque associations with memory in non-cognitively impaired elderly. *Journal of Alzheimer's Disease*, 53, 1641–1652. <https://doi.org/10.3233/JAD-160365>
- Martin, L., Bouvet, P., Chounlamountri, N., Watrin, C., Besançon, R., Pinatel, D., Meyronet, D., Honnorat, J., Buisson, A., Salin, P.-A., & Meissirel, C. (2021). VEGF counteracts amyloid- β -induced synaptic dysfunction. *Cell Reports*, 35, 109121. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109121>
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A. I., & Masters, C. L. (1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 46, 860–866. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(199912\)46:6<860::AID-ANA8>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1531-8249(199912)46:6<860::AID-ANA8>3.0.CO;2-M)
- Mucke, L., & Selkoe, D. J. (2012). Neurotoxicity of amyloid β -protein: Synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2, a006338. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006338>
- Navakkode, S., Gaunt, J. R., Pavon, M. V., Bansal, V. A., Abraham, R. P., Chong, Y. S., Ch'ng, T. H., & Sajikumar, S. (2021). Sex-specific accelerated decay in time/activity-dependent plasticity and associative memory in an animal model of Alzheimer's disease. *Aging Cell*, 20, e13502. <https://doi.org/10.1111/acer.13502>
- Ono, K., Condon, M. M., & Teplow, D. B. (2009). Structure–neurotoxicity relationships of amyloid β -protein oligomers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905127106>
- Paumier, A., Boisseau, S., Jacquier-Sarlin, M., Pernet-Gallay, K., Buisson, A., & Albrieux, M. (2022). Astrocyte–neuron interplay is critical for Alzheimer's disease pathogenesis and is rescued by TRPA1 channel blockade. *Brain*, 145, 388–405. <https://doi.org/10.1093/brain/awab281>
- Peng, L., Bestard-Lorigados, I., & Song, W. (2022). The synapse as a treatment avenue for Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 27, 2940–2949. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01565-z>
- Pickett, E. K., Koffie, R. M., Wegmann, S., Henstridge, C. M., Herrmann, A. G., Colom-Cadena, M., Lleo, A., Kay, K. R., Vaught, M., Soberman, R., Walsh, D. M., Hyman, B. T., & Spiers-Jones, T. L. (2016). Non-fibrillar oligomeric amyloid- β within synapses. *Journal of Alzheimer's Disease*, 53, 787–800. <https://doi.org/10.3233/JAD-160007>
- Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S. A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., Calhoun, M. E., Jäggi, F., Wolburg, H., Gengler, S., Haass, C., Ghetti, B., Czech, C., Hölscher, C., Mathews, P. M., & Jucker, M. (2006). A β 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Reports*, 7, 940–946. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400784>
- Renner, M., Lacor, P. N., Velasco, P. T., Xu, J., Contractor, A., Klein, W. L., & Triller, A. (2010). Deleterious effects of amyloid β oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron*, 66, 739–754. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.029>
- Selkoe, D. J. (2008). Soluble oligomers of the amyloid β -protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behavioural Brain Research*, 192, 106–113. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.016>
- Sengupta, U., Nilson, A. N., & Kaye, R. (2016). The role of amyloid- β oligomers in toxicity, propagation, and immunotherapy. *eBioMedicine*, 6, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.035>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1, a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A., Rowan, M. J., Lemere, C. A., Regan, C. M., Walsh, D. M., Sabatini, B. L., & Selkoe, D. J. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*, 14, 837–842. <https://doi.org/10.1038/nm1782>
- Smith, L. M., & Strittmatter, S. M. (2017). Binding sites for amyloid- β oligomers and synaptic toxicity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7, a024075. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024075>
- Spuch, C., Antequera, D., Portero, A., Orive, G., Hernández, R. M., Molina, J. A., Bermejo-Pareja, F., Pedraz, J. L., & Carro, E. (2010). The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biomaterials*, 31, 5608–5618. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.042>
- Stine, W. B., Dahlgren, K. N., Krafft, G. A., & LaDu, M. J. (2003). In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization



- and fibrillogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 11612–11622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210207200>
- The Alzheimer's Association. (2021). 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 17, 327–406. <https://doi.org/10.1002/alz.12328>
- Ting, J. T., Kelley, B. G., Lambert, T. J., Cook, D. G., & Sullivan, J. M. (2007). Amyloid precursor protein overexpression depresses excitatory transmission through both presynaptic and postsynaptic mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 353–358. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608807104>
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., & Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416, 535–539. <https://doi.org/10.1038/416535a>
- Xue, C., Lin, T. Y., Chang, D., & Guo, Z. (2017). Thioflavin T as an amyloid dye: Fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *Royal Society Open Science*, 4, 160696. <https://doi.org/10.1098/rsos.160696>
- Yang, T., Li, S., Xu, H., Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2017). Large soluble oligomers of amyloid β -protein from Alzheimer brain are far less neuroactive than the smaller oligomers to which they dissociate. *The Journal of Neuroscience*, 37, 152–163. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1698-16.2016>
- Yasumoto, T., Takamura, Y., Tsuji, M., Watanabe-Nakayama, T., Imamura, K., Inoue, H., Nakamura, S., Inoue, T., Kimura, A., Yano, S., Nishijo, H., Kiuchi, Y., Teplow, D. B., & Ono, K. (2019). High molecular weight amyloid β 1-42 oligomers induce neurotoxicity via plasma membrane damage. *The FASEB Journal*, 33, 9220–9234. <https://doi.org/10.1096/fj.201900604R>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Bouvet, P., de Gea, P., Aimard, M., Chounlamountri, N., Honnorat, J., Delcros, J. G., Salin, P. A., & Meissirel, C. (2023). A novel peptide derived from vascular endothelial growth factor prevents amyloid beta aggregation and toxicity. *Aging Cell*, 00, e13907. <https://doi.org/10.1111/accel.13907>

SUPPORTING MATERIALS AND METHODS

Electrophysiological recordings

Field potential recordings were performed on adult wild-type mice to determine BP effect on basal synaptic transmission as a function of BP concentration at the Schaffer collaterals-CA1 synapses. Two-pathway stimulation experiments were performed for electrophysiological field potential recordings on hippocampal slices derived from 9-month-old wild type and transgenic heterozygous *APP/PS1-21* male mice. After baseline recordings of synaptic activity evoked at 0.2 Hz for at least 10 min, slices were treated with BP at 0.5 μ M for 30 to 40 min before eliciting LTP with theta burst stimulation (TBS). TBS consisted of 10 trains separated by 30 s, each train composed of 10 bursts at 5 Hz and each burst providing 4 pulses at 100 Hz. Schematic representation of the experimental design is illustrated in Figure S5A: The recording electrode and the 2 stimulating electrodes were located in the stratum radiatum in CA1 to stimulate two independent pathways. TBS was applied to the stimulating electrode 1 (stim1) to evoke LTP in S1 pathway, whereas stimulating electrode 2 (stim2) elicited synaptic responses acting as a control pathway. Notably, a transient depression of fEPSPs was observed after TBS in the control pathway (S2).

Cell cultures and treatments

Hippocampal neurons

Primary hippocampal cell cultures prepared from E17-18 C57Bl6/6Jrj mice were used after 21 DIV for synaptic targeting experiments using LMW A β . Prior to treatments, LMW A β preparations were incubated at 5 μ M for 1h at RT with or without CP or BP at equimolar concentrations. Cultures were then treated for 30 min with a final concentration of 500 nM biotinylated A β preparations enriched in LMW A β .

HUVEC

Human umbilical vein endothelial Cells (HUVEC) were obtained from Promocell and cultured in 6 cm Petri dishes pre-coated with collagen I at 5 μ g/cm² in 20 mM glacial acetic acid. HUVEC were cultured at 7000 cells/cm² in endothelial cell growth medium MV2 heparin free (Promocell) supplemented with 1% P/S until reaching 80% confluency, and were used for up to 6 passages. The day before treatment, cell medium was replaced by a VEGF-deprived

medium. Cells were then treated for 5 min with VEGF (5 ng.mL⁻¹) with or without BP or CP at 0.5 μM. After treatments, HUVEC were washed and incubated in 600 mL of lysis buffer (Tris HCL 25 mM, EDTA 5 mM, DOC 0.5 mM, NP40 1%, SDS 0.1%, NaCl 150 mM), supplemented with cOmplete protease inhibitor cocktail 2%, Benzonase 0.02%, Orthovanadate 2%, and phosphatase inhibitors 2% for 10 min at 4°C. Cell lysates were then centrifuged at 1000 g for 10 min at 4°C to remove cellular debris, and stored at -20°C until use.

Western blotting

For immunoblotting of HUVEC cell lysates, 20 μg of proteins were separated on 3-8% gradient SDS-PAGE gels at 120V, with cathode and anode containing XT Tricine buffer. Gels were transferred on 0.2 μm nitrocellulose membranes at 120V for 2h in 5% methanol, Tris-Glycine buffer and immunoblotted. Anti-phospho-VEGFR2 (Tyr1175) and anti-VEGFR2 antibodies were used in combination with appropriate secondary antibodies (Table S1)

Competitive ELISA assays

Competitive ELISA experiments were performed to analyse the ability of the BP to impede biotinylated LMW Aβ_o binding to VEGF. For these assays, recombinant human VEGF₁₆₅ (500 ng.mL⁻¹) was immobilized in the 96-well microplate as the capture antigen and incubated overnight at 4°C. LMW Aβ_o were incubated at 10 μg.mL⁻¹ (2.1 μM) with various concentrations of CP or BP ranging from 10 nM to 100 μM for 1h at RT, and then added in triplicate on the plate after 3 washes with PBS and 0.05% Tween 20. The mix was incubated for 2h at RT, followed by a washing step, an incubation with the HRP-conjugated streptavidin for 20 min, additional rinses and finally the substrate reagent containing TMB and H₂O₂. After adding the stop solution, absorbance was measured using a TECAN microplate reader.

SUPPORTING FIGURE LEGENDS

Figure S1: BP prominently interacts with A β o at a specific binding site. Quantitative analysis showing a competitive interaction with 6E10 and 4G8 antibodies targeting the A β (1-16) and A β (17-24) epitopes respectively, that significantly blocks the binding of BP to A β m (left panel) and A β o (right panel). For A β m, Kruskal-Wallis, $p = 0,0086$, $n = 5$ independent experiments; pairwise Wilcoxon rank sum post-hoc test $*p < 0,05$; for A β o, Kruskal-Wallis, $p = 0,0081$, $n = 5$ independent experiments; pairwise Wilcoxon rank sum post-hoc test $*p < 0,05$). Data represents mean \pm SEM.

Figure S2: BP does not act by competing for A β o binding sites on synapses. A) Confocal images of DIV21 hippocampal neuron cultures treated for 30 min with biotinylated pre-formed A β o pre-incubated at RT with CP or BP at equimolar concentrations. Full synapses (yellow clusters) were characterized by PSD95 (green) and Bassoon (red) marker colocalization, with neuronal cell surface A β o binding shown in grey. Scale bar = 5 μ m. **B)** Quantitative analysis illustrating the percentage of A β -bound synapses with no effect the BP compared to the other A β - treated conditions. Kruskal Wallis ($p = 8.8e-06$) followed by Dunn post-hoc test, ns = not significant, $n = 6-11$ from 2 independent experiments.

Figure S3: BP impact on synaptic transmission. A) Time course of BP effect on fEPSP at the Schaffer collateral to CA1 synapse in WT mice. Although the application for 30 min of 2 μ M BP induces a significant decrease in the fEPSP slope (Wilcoxon, $p < 0.02$, $n = 6$), a concentration of 0.5 μ M has no effect (ns, $n = 11$). Right: the bar graph shows a significant difference in the synaptic slope measurement between the two BP concentrations (Mann-Whitney, $p < 0.02$, $n = 6-11$ mice. **B)** Dose-response curve showing BP effects on basal synaptic transmission (normalized to baseline responses before BP application). A logistic curve was used to fit fEPSP slopes as a function of BP concentrations (adjust $r^2 = 0.79$, $p = 0.002$).

Figure S4: Similar paired-pulse facilitation level in BP and CP-treated APP/PS1 and WT slices. Time course of paired-pulse ratio at the Schaffer collaterals to CA1 synapses after a Theta Burst Stimulation protocol (TBS) in slices from 8-month-old WT (**A, C**) and APP/PS1 mice (**B, D**). A slight decrease in the paired-pulse ratio was observed after TBS in BP- and CP-treated

WT and APP/PS1 slices. However, no significant differences were observed between these 4 groups ($p > 0.05$ Kruskal Wallis test).

Figure S5: BP treatment leads to restoration of Late-LTP in APP/PS1 hippocampal slices. A)

Schematic representation showing the location of the recording electrode (LFP recording) with two stimulating electrodes placed in the stratum radiatum of CA1 to stimulate two independent pathways. Theta burst (TBS) was applied to the stimulating electrode (stim1) to evoke LTP in the S1 pathway, whereas the S2 pathway stimulated by the stimulating electrode 2 (stim2) acted as a control. **B)** In the upper panel, pooled data ($n = 5$) showing the time course of LTP in WT hippocampal slices treated with BP ($0.5 \mu\text{M}$) 30 to 40 min before TBS induction. TBS applied to the S1 pathway evoked an LTP lasting at least 3 hours ($251.8 \pm 40.4\%$ from 175 to 180 min, $p = 0.019$). Below, the time course of synaptic responses is shown for the control pathway (S2) that was not potentiated ($107.1 \pm 7.8\%$). The difference in potentiation is significant between the S1 and S2 pathways ($p = 0.026$). **C)** Pooled data in the upper panel illustrate the time course of LTP in slices derived from APP/PS1 mice ($n=5$) and treated with the BP ($0.5 \mu\text{M}$) 30 to 40 min before TBS induction. TBS evoked a long-lasting LTP in S2 pathway up to at least 3 hours ($261.8 \pm 45.2\%$ from 175 to 180 min, $p = 0.023$). In contrast, the lower panel show responses from the control pathway (S2) which were not potentiated ($98.6 \pm 5.2\%$), demonstrating the specificity of the BP rescue effect on Late-LTP in APP/PS1 slices. Indeed, the difference was significant between the potentiated (S1) and control (S2) pathways ($p = 0.015$) in APP/PS1 slices, while no difference was observed between potentiated pathways in WT and APP/PS1 slices ($p = 0.87$). Scale: 200 ms, 0.5 mV.

Figure S6: Characterization of BP effect on VEGFR2 activation and A β -VEGF interaction. A)

Representative immunoblotting for pVEGFR2 and VEGFR2 expression in HUVEC cells treated with PBS (Ctrl), CP or BP for 5 min at 500 nM, in presence or absence of $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ VEGF. **B)** CP or BP show no effect on basal or VEGF-induced VEGFR2 activation. (Kruskall-Wallis, $p = 0,0013$, $n = 4$; post-hoc $*p < 0,05$, $**p < 0,01$). **C)** ELISA assay analyzed with a linear model curve fitting showing no impact of CP on A β -VEGF interaction. In contrast, a sigmoidal dose response curve fitting shows that BP efficiently prevents A β -VEGF interaction in a dose dependent manner. $n = 5$ -6 independent experiments. Error bars represents mean \pm SEM.

TABLE S1 : KEY RESOURCE TABLE

Reagent or Resource	Source	Identifier
Antibodies		
Mouse anti β -Amyloid 1-16 monoclonal antibody Dilution 1:500	Biolegend	Cat#8003002
Rabbit anti β -Amyloid monoclonal antibody (A11) Dilution 1:1000	Kindly provided by Rakez Kayed, University of Texas, USA	
Mouse purified anti β -Amyloid 1-16 monoclonal antibody (6E10) Dilution 1:2000	Biolegend	Cat#803001
Mouse purified anti β -Amyloid 17-24 monoclonal antibody (4G8) Dilution 1:2000	Biolegend	Cat#800701
Rabbit anti β -Amyloid 22-35 polyclonal antibody Dilution 1:500	MERCK Millipore	Cat#A3356
Rabbit Anti VEGF Receptor 2 monoclonal antibody. Dilution 1:500	Cell Signaling Technology	Cat#2479
Rabbit Anti VEGF Receptor 2 phospho (Tyr1175) monoclonal antibody. Dilution 1:500	Cell Signaling Technology	Cat#2478
Goat Anti Rabbit HRP polyclonal antibody Dilution 1:10,000	Jackson Immunoresearch	Cat# 111-036-003
Goat Anti Mouse HRP polyclonal antibody Dilution 1:10,000	Jackson Immunoresearch	Cat# 115-036-003
Mouse Anti-PSD95 monoclonal antibody Dilution 1:300	Invitrogen	Cat# 6G6-1C9
Rabbit Anti-Bassoon polyclonal antibody Dilution 1:500	Synaptic System	Cat# 141 003
Goat Anti Rabbit Alexa fluor 555 polyclonal antibody. Dilution 1:1000	Molecular Probes	Cat# A21429
Goat Anti Mouse Alexa fluor 488 polyclonal antibody. Dilution 1:1000	Molecular Probes	Cat# A11029
Rabbit Anti Biotin Dilution 1:10000	Abcam	Cat#ab53494
Chemicals, peptides, and recombinant proteins		
Amyloid β protein (1-42)	Bachem	Cat# H-1368
Amyloid β protein (1-40)	Bachem	Cat#4014442
Biotinyl-Amyloid β protein (1-42)	Bachem	Cat# H-5642
Biotinyl-Amyloid β protein (1-40)	Bachem	Cat# H-5914
Recombinant Human VEGF 165	R&D Systems	Cat# 293-VE
Experimental models: cell lines		

HUVEC cells (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)	Promocell	Cat# C12203
---	-----------	-------------

Experimental models: Organisms / Strains

APP/PS1-21 transgenic mice	Radde et al., 2006	N/A
C57BL/6Jrj	Janvier Labs	Cat# SC-C57J-F

Cell culture

Neurobasal medium without phenol red	ThermoFisher Scientific	Cat#12348017
B27 supplement	ThermoFisher Scientific	Cat# 17504044
Endothelial cell growth medium MV2	Promocell	Cat#C-22121
Collagen I	ThermoFisher Scientific	Cat#A1048301
Gibco L-Glutamine	ThermoFisher Scientific	Cat#25030024
Sodium Pyruvate	ThermoFisher Scientific	Cat#11530396
Gibco Penicillin-Streptomycin	ThermoFisher Scientific	Cat#11548876

Software and algorithms

Fiji - ImageJ	MCMaster Biophotonics Facility	Version
Huygens	Scientific Volume Imaging	Version 16.05
Icy Bioimage Analysis	France Bioimaging	Version
R software	R foundation for Statistical Couputing	R version
Origin Lab	Origin Lab Corp	Origin Pro Version

Other

Streptavidine Alexa fluor 647	Invitrogen	Cat# S32357
Streptavidin HRP	R&D Systems	Cat#DY998
Reagent Diluent Concentrate 2	R&D Systems	Cat#DY995
Clear polystyrene microplates	R&D Systems	Cat#DY990
Stop solution 2N Sulfuric acid	R&D Systems	Cat#DY994
Substrate Reagent Pack	R&D Systems	Cat#DY999
Bolt MES SDS Running Buffer	Thermofisher Scientific	Cat#B0002
XT Trycin Running Buffer	Bio-Rad	Cat#1610790
cOmpete protease inhibitor cocktail	MERCK Millipore	Cat# 04693159001
4-12% Criterion XT Bis-Tris Protein Gel	Bio-Rad	Cat#3450124
3-8% Criterion XT Tris-Acetate Protein Gel	Bio-Rad	Cat#3450130
SuperSignal West Pico Plus Chemiluminescent Substrate	ThermoFisher Scientific	Cat#34577
Sodium orthovanadate	MERCK Millipore	Cat#S6508
Phosphatase inhibitor cocktail	MERCK Millipore	Cat#524629
Pierce universal nuclease for cell lysis	ThermoFisher Scientific	Cat#88701

D-PBS no calcium no magnesium	ThermoFisher Scientific	Cat#D8537
Thioflavin T	Sigma-Aldrich	Cat#T3516
Dapi	Roche	Cat# 10236276001
FluorSave™ reagent	MERCK Millipore	Cat# 345789

Figure 1A: ELISA Peptides interaction with A β						
[A β] μ g/mL	0	0.01	0.1	1	5	10
A β o/CP	0.004 \pm 0.006	0.009 \pm 0.007	0.028 \pm 0.014	0.0921 \pm 0.102	0.074 \pm 0.058	0.066 \pm 0.046
A β o/BP	0.000 \pm 0.001	0.144 \pm 0.010	0.819 \pm 0.115	1.262 \pm 0.091	1.330 \pm 0.135	1.172 \pm 0.108
A β m/CP	0.000 \pm 0.003	0.002 \pm 0.002	0.009 \pm 0.006	0.031 \pm 0.017	0.038 \pm 0.026	0.012 \pm 0.018
A β m/BP	0.006 \pm 0.003	0.049 \pm 0.028	0.172 \pm 0.083	0.736 \pm 0.376	1.034 \pm 0.449	0.880 \pm 0.395

Figure 2: ThT experiment at 24h					
[Peptide] μ M	0 μ M	0.5 μ M	1 μ M	5 μ M	15 μ M
CP	98.56 \pm 1.17	93.13 \pm 21.58	76.68 \pm 8.41	87.94 \pm 9.01	69.81 \pm 7.05
BP	98.56 \pm 1.17	53.49 \pm 15.58	43.29 \pm 16.63	17.33 \pm 1.23	5.02 \pm 2.19

Figure 4B-C: Peptides impact on A β oligomer formation						
Western Blot	2h			24h		
	A β	A β +CP	A β +BP	A β	A β +CP	A β +BP
Monomers %	10.44 \pm 2.5	11.08 \pm 3.1	20.29 \pm 4.4	8.63 \pm 1.1	9.54 \pm 0.9	16.17 \pm 1.5
LMW %	10.46 \pm 2.3	10.81 \pm 1.5	20.08 \pm 2.4	4.72 \pm 0.8	4.84 \pm 0.7	12.46 \pm 1.9
HMW %	78.28 \pm 4.4	77.55 \pm 4.5	58.95 \pm 5.6	84.72 \pm 0.8	83.57 \pm 0.8	70.85 \pm 0.9

Figure 5B: Synaptic targeting	
	% Targeted synapses
Ctrl+CP	0.07 \pm 0.1
Ctrl+BP	0.08 \pm 0.1
A β	41.1 \pm 2.3
A β +CP	40.9 \pm 2.3
A β +BP	4.58 \pm 3.8

Figure 6G: LTP Experiments	
	EPSP slope %
WT+CP	191.4 \pm 18.3
WT+BP	223.8 \pm 29.3
APP+CP	119 \pm 9.1
APP+BP	226.7 \pm 40.5

Figure 4D: Peptides impact on A β oligomer formation				
Dot Blot	0h	0.5h	1h	2h
A β %	100 \pm 6.98	130.8 \pm 9.78	161.0 \pm 10.6	158.7 \pm 3.53
A β +BP %	87.4 \pm 6.05	78.7 \pm 8.8	73.9 \pm 5.1	82.4 \pm 11.1

Figure S1: Competitive interaction for BP binding to A β		
	Bound BP	
	Monomers	Oligomers
No competition	0.213 \pm 0.027	0.463 \pm 0.069
6E10	0.052 \pm 0.015	0.089 \pm 0.017
4G8	0.086 \pm 0.043	0.096 \pm 0.019

Figure S2B: Synaptic targeting	
	% Targeted synapses
Ctrl+CP	0.4 \pm 0.2
Ctrl+BP	0.7 \pm 0.3
A β	31.4 \pm 2.0
A β +CP	37.5 \pm 2.4
A β +BP	34.8 \pm 2.3

Figure S3A: Basal synaptic transmission	
	EPSP slope %
BP 0.5 μ M	102.3 \pm 10.50
BP 10 μ M	66.9 \pm 9.40

Figure S4: Paired pulse facilitation	
	EPSP slope %
WT+CP	96.9 \pm 9.60
WT+BP	88.01 \pm 12.80
APP+CP	93.9 \pm 10.20
APP+BP	94.8 \pm 17.50

Figure S5: Late-LTP experiments	
	EPSP slope %
WT+BP S1	251.8 \pm 40.4
WT+BP S2	107.1 \pm 7.8
APP+BP S1	261.8 \pm 45.2
APP+BP S2	98.6 \pm 5.2

Figure S6B: Peptide effect on VEGFR2 activation	
	VEGFR2 activation
Ctrl	0.055 \pm 0.007
Ctrl+CP	0.085 \pm 0.009
Ctrl+BP	0.154 \pm 0.014
VEGF	1.000 \pm 0.090
VEGF+CP	0.942 \pm 0.048
VEGF+BP	1.167 \pm 0.214

Figure S6C: ELISA competition experiment VEGF						
[Peptide] μ M	0	0.01	0.1	1	10	100
CP	100 \pm 0.00	92.08 \pm 6.40	93.80 \pm 10.01	95.21 \pm 10.03	99.10 \pm 9.07	94.55 \pm 6.25
BP	100 \pm 0.00	76.87 \pm 8.37	69.45 \pm 7.35	33.29 \pm 15.27	1.61 \pm 1.80	4.03 \pm 2.94

TABLE S2

Figure 2	
A β vs A β + BP 5 μ M	A β vs A β + BP 15 μ M
0.0483	0.0011

	Figure 4B – 2h			Figure 4C – 24h		
	A β vs A β + CP	A β vs A β + BP	A β + CP vs A β + BP	A β vs A β + CP	A β vs A β + BP	A β + CP vs A β + BP
monomer	/	/	/	/	0.0087	0.0196
LMW A β _o	/	0.0243	0.0237	/	0.0162	0.0200
HMW A β _o	/	0.0294	0.0339	/	0.0035	0.0237

Figure 4E - F						
	0h vs 0.5h	0h vs 1h	0h vs 2h	0.5h vs 1h	0.5h vs 2h	1h vs 2h
A β	/	0.0055	0.0052	/	/	/
A β +BP	/	/	/	/	/	/

Figure 5B				
	Ctrl+BP	A β	A β +CP	A β +BP
Ctrl+CP	/	< 0.0001	< 0.0001	0.0488
Ctrl+BP		< 0.0001	< 0.0001	/
A β +CP	< 0.0001	/		0.0300
A β +BP	/	0.0223		/

Figure 6		
WT+CP vs APP+CP	WT+BP vs APP+CP	APP+CP vs APP+BP
0.049	0.039	0.031

Figure S1: Competitive interaction for BP binding to A β		
	6E10	4G8
No competition monomers	0.012	0.012
6E10		/
4G8	/	
No competition oligomers	0.012	0.012
6E10		/
4G8	/	

Figure S2B : Synaptic targeting				
	Ctrl+BP	A β	A β +CP	A β +BP
Ctrl+CP	/	0.01	0.0002	0.0006
Ctrl+BP		0.03	0.0012	0.003
A β +CP	0.0012	/		/
A β +BP	0.003	/	/	

Figure S3A: Basal synaptic transmission
BP 0.5 μ M vs BP 2 μ M
0.014

Figure S5: Late-LTP experiments	
WT+BP LTP in S1 (175-180 min) vs WT+BP control in S2	APP+BP LTP in S1 (175-180 min) vs APP+BP control in S2
0.026	0.015

Figure S6B: Peptide effect on VEGFR2 activation		
Ctrl vs VEGF	Ctrl vs VEGF+CP	Ctrl vs VEGF+BP
0.0114	0.0106	0.007

TABLE S3
Statistics

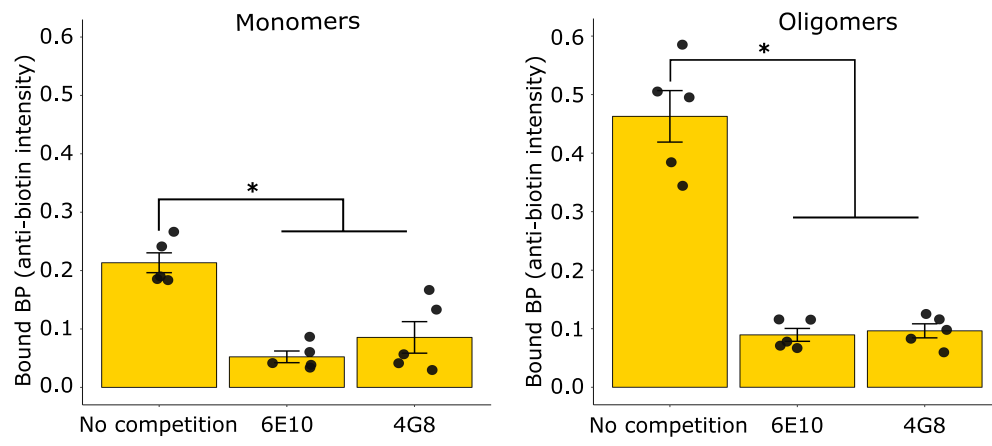


Figure S1

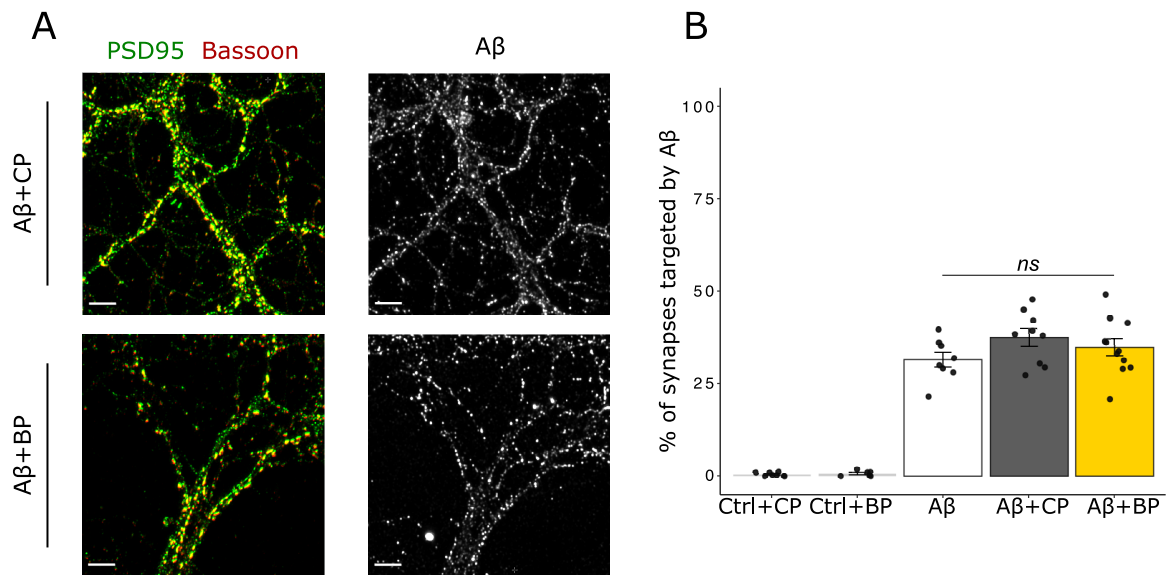


Figure S2

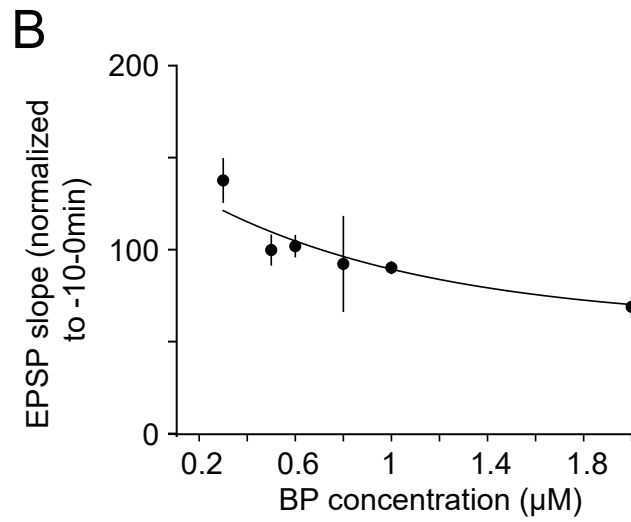
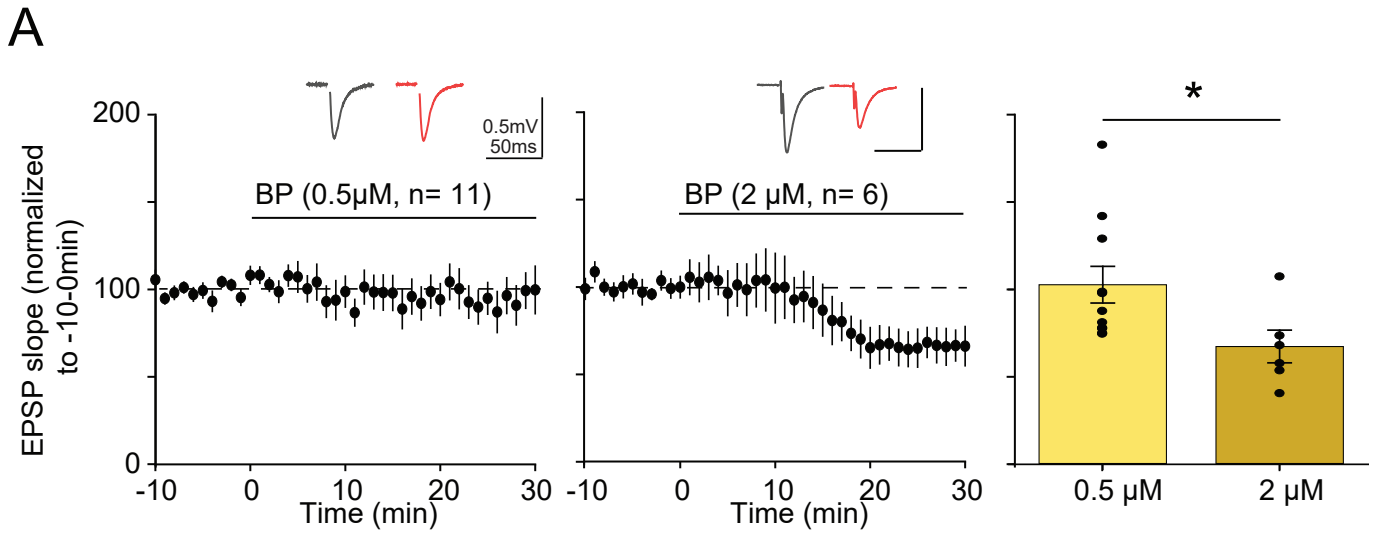


Figure S3

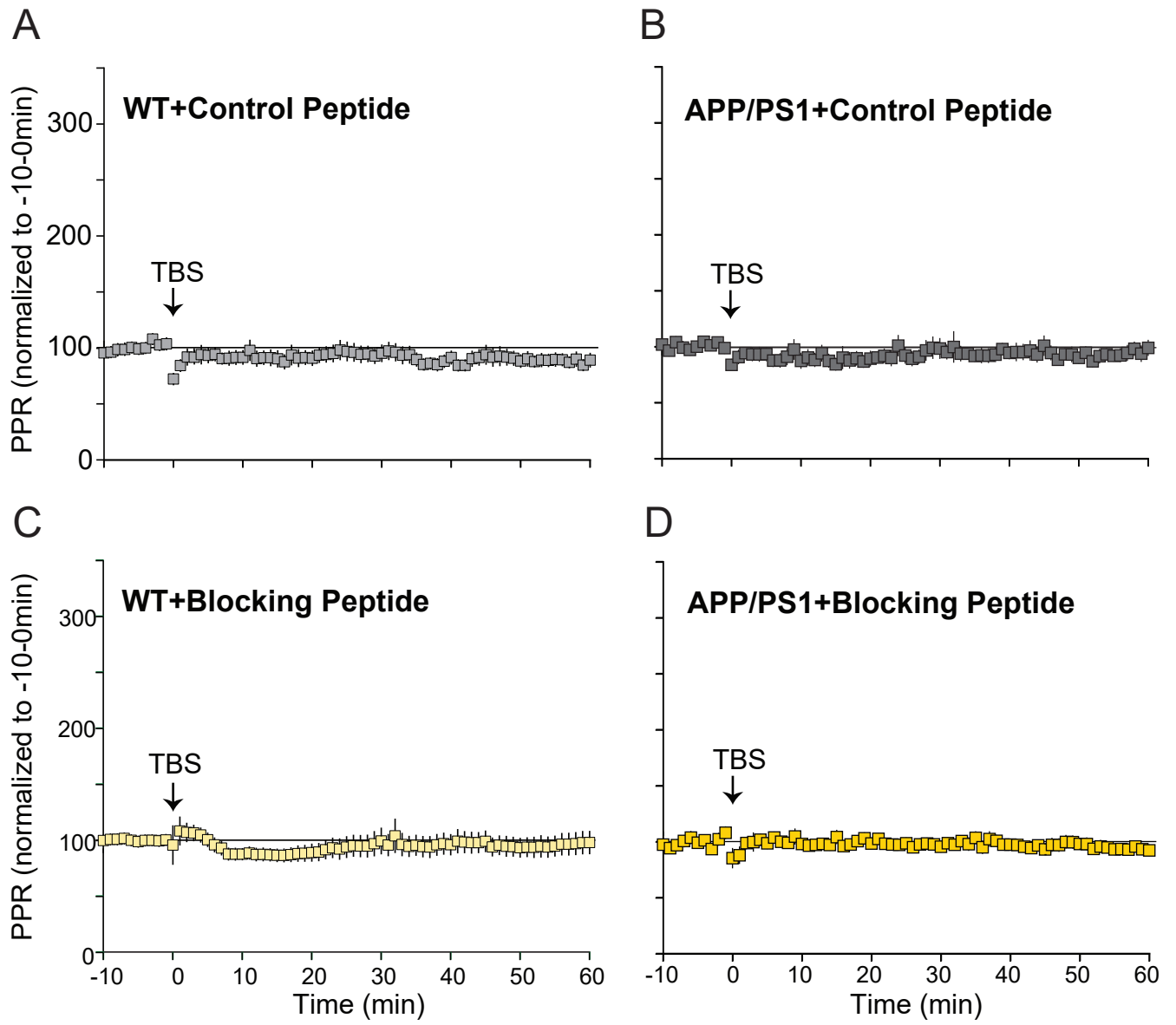


Figure S4

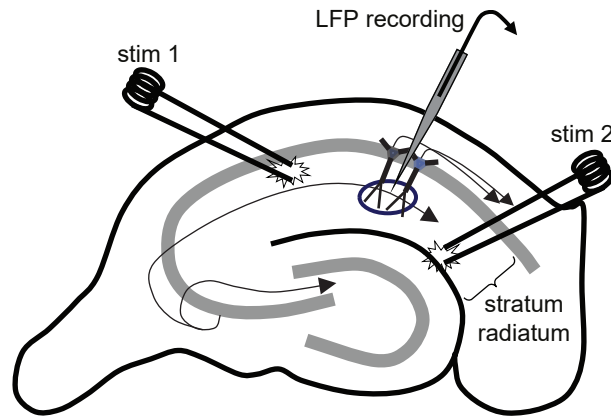
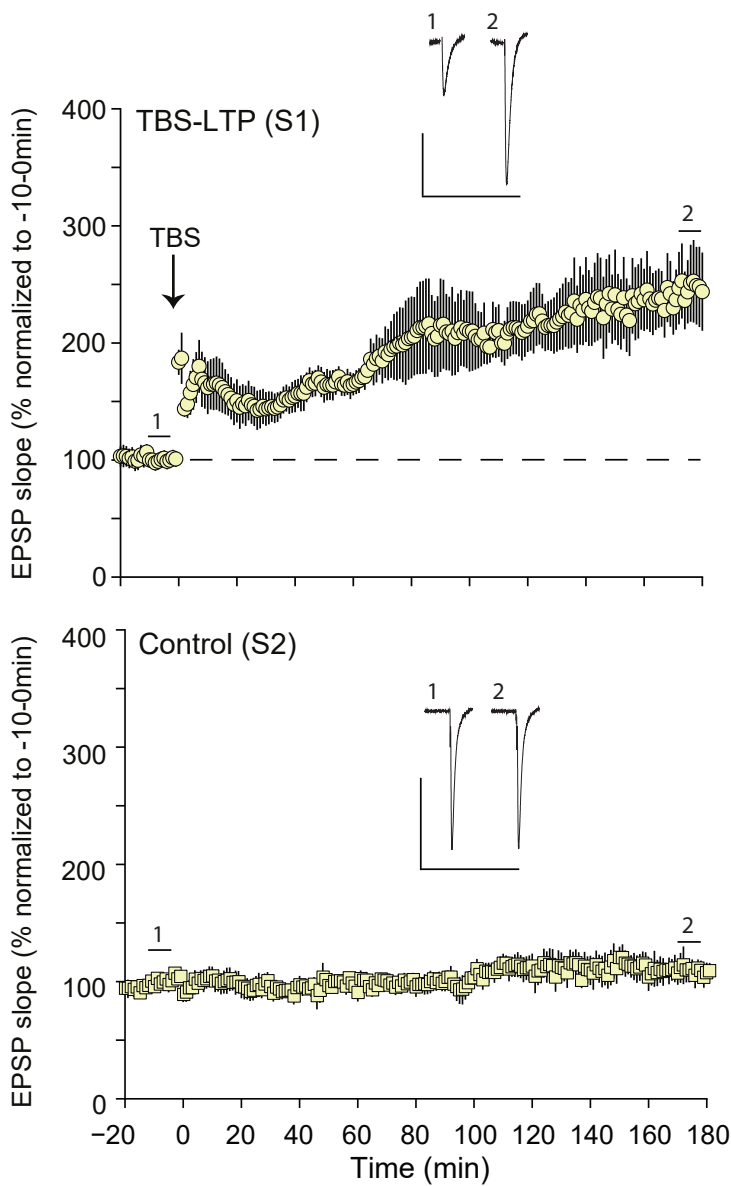
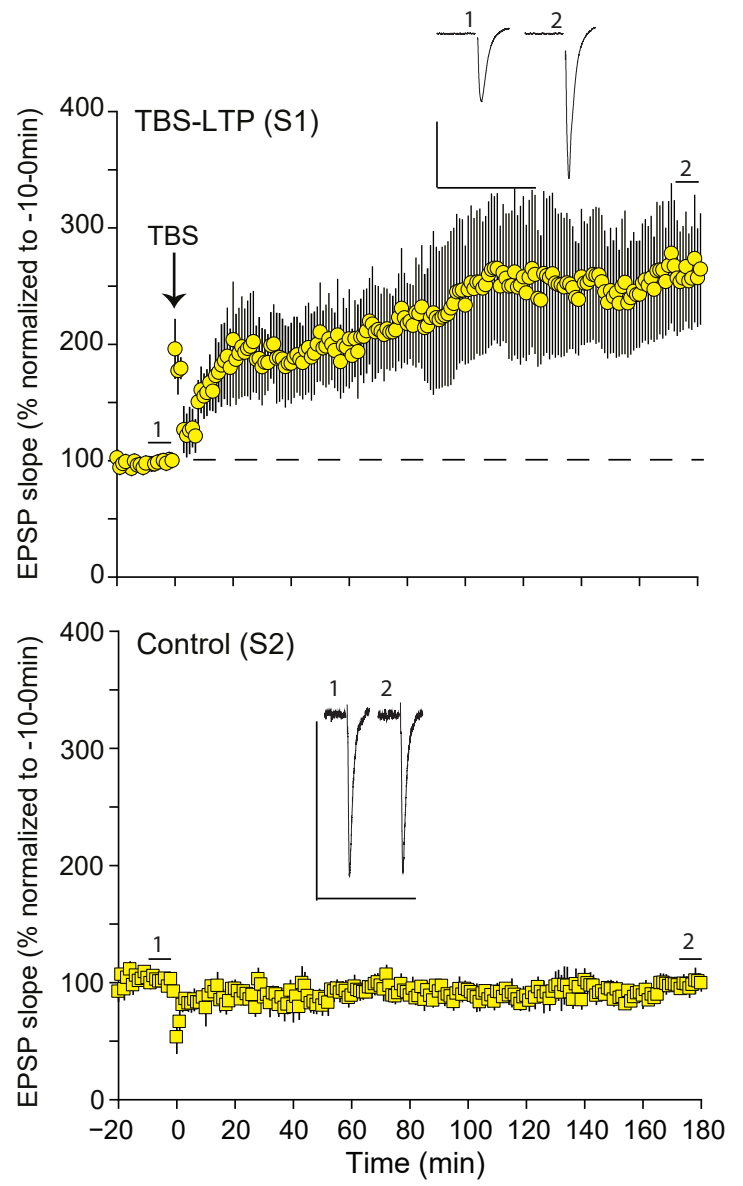
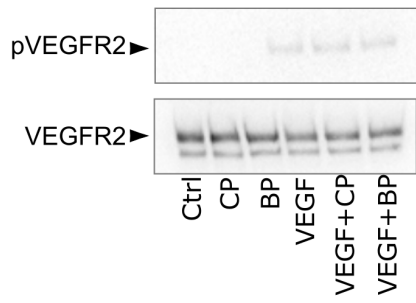
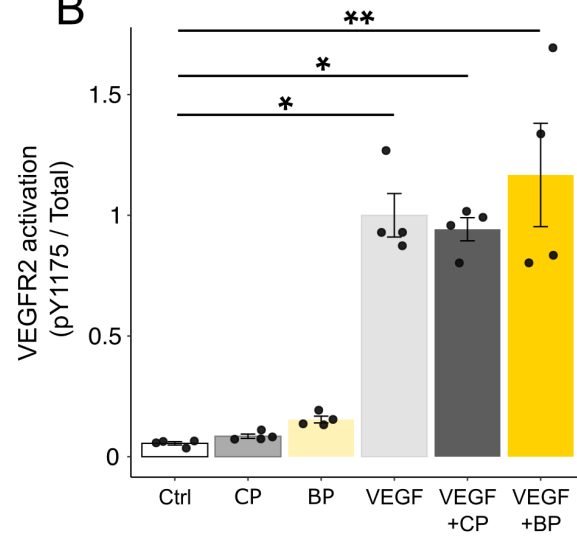
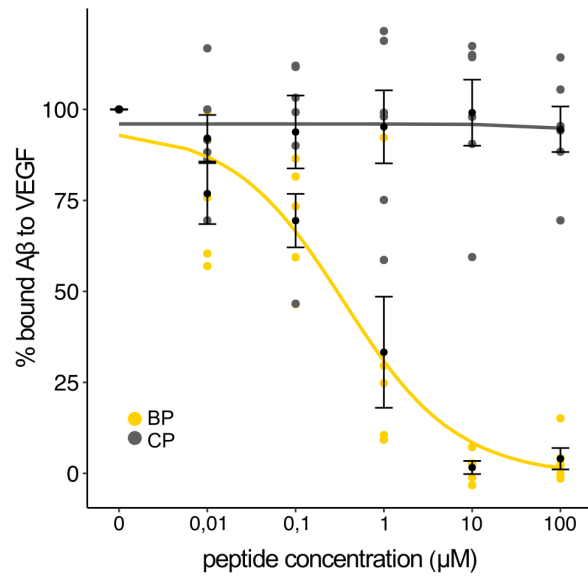
A**B****WT + blocking peptide****C****APP/PS1 + blocking peptide**

Figure S5

A**B****C****Figure S6**

SUPPORTING TABLE LEGENDS

Table S1: Key resources table

Summary of the wild type and genetically modified mice strains, cell line, antibodies, recombinant proteins and synthetic peptides, cell culture media and reagents, as well as software and algorithms used in the present study.

Table S2: Summary of the data related to Figures 2, 4, 5, 6, S1, S2, S3, S5 and S6

Data are presented as means \pm SEM. They refer to ELISA absorbance values reflecting CP or BP binding as a function of A β _m or A β _o concentration, as shown in Figure 1. Normalized ThT fluorescence data are indicated as a function of CP or BP concentration, as illustrated in Figure 2. Percentages of various A β species present after 2h or 24h of A β aggregation in presence of CP or BP are listed for western blotting experiments, as shown in of Figure 4. Percentages are also stated for dot blot experiments of the same Figure. Percentages of full hippocampal synapses positive for A β immunostaining in CP or BP treated cultures are listed, as illustrated in Figure 5 and Figure S2. Normalized fEPSP slopes obtained after TBS in CP or BP-treated hippocampal slices derived from WT or APP/PS1 mice are indicated, as shown in Figure 6 and Figure S5. In addition, normalized fEPSP slopes measured at baseline and after TBS are used to compare the paired-pulse ratio (PPR) overtime, as illustrated in Figure S4. Optical density values illustrating immunoreactivity in the presence or absence of 6E10 or 4G8 competition are reported, as quantified in Figure S1. Normalized fEPSP slopes obtained after various concentrations of BP treatment in WT hippocampal slices are reported, as shown in Figure S3. Finally, referring to Figure S6, optical density ratios reflecting VEGFR2 activation level are indicated, as well as normalized ELISA absorbance values measuring A β _o binding to VEGF in the presence of CP or BP.

Table S3: Summary showing statistical analyses of the data reported in Table S2

Results of post-hoc comparisons showing significant differences are indicated with Holm correction for multiple comparisons.