



**HAL**  
open science

# Rôle de la dérégulation neuronale de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) dans la pathologie tau, l'intégrité des synapses et le métabolisme énergétique : relevance pour la maladie d'Alzheimer

Manon Domise

## ► To cite this version:

Manon Domise. Rôle de la dérégulation neuronale de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) dans la pathologie tau, l'intégrité des synapses et le métabolisme énergétique : relevance pour la maladie d'Alzheimer. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS034 . tel-02162394

**HAL Id: tel-02162394**

**<https://theses.hal.science/tel-02162394>**

Submitted on 21 Jun 2019

**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 de Lille - Nord de France  
École Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

## THÈSE

Présentée par

**Manon DOMISE**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE**

Spécialité: Neurosciences

---

**Rôle de la dérégulation neuronale de la protéine kinase  
activée par l'AMP (AMPK) dans la pathologie tau,  
l'intégrité des synapses et le métabolisme énergétique :  
Relevance pour la maladie d'Alzheimer**

---

Soutenue publiquement le 17 décembre 2018 devant le jury composé de:

**Mme le Pr. Ilse DEWACHTER**

**Rapporteur**

**M le Pr Alain BUISSON**

**Rapporteur**

**M le Dr Benoît VIOLLET**

**Président du jury**

**M le Dr Jean-Marc TAYMANS**

**Examineur**

**M le Dr Luc BUEE**

**Examineur**

**Mme le Dr Valérie VINGTDEUX**

**Directrice de thèse**



"Soit A un succès dans la vie. Alors  $A = x + y + z$ ,  
où x = travailler, y = s'amuser, z = se taire"

*Albert Einstein*



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Pr **Ilse Dewachter**, le Pr **Alain Buisson**, le Dr **Benoit Viollet** et le Dr **Jean-Marc Taymans** qui m'ont fait l'honneur d'accepter de faire partie des membres de mon jury de thèse. Je remercie également le Dr **Benoit Viollet** et le Pr **Ilse Dewachter** pour m'avoir également suivie tout au long de ces trois années de thèse en tant que membres de CSI. Je leur suis très reconnaissante des remarques et des conseils qui ont contribué à l'amélioration de ce travail de thèse

Mes remerciements vont également au Dr **Luc Buée** pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire durant ces quatre années mais également pour ses conseils avisés qui ont permis d'améliorer ces travaux de recherche.

Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr **Valérie Vingtdeux** pour m'avoir accordée sa confiance et m'avoir fait l'honneur de diriger mes travaux de thèse. Je vous remercie pour votre investissement durant ces quatre années et aussi d'avoir toujours été là pour moi quand j'en avais besoin, tant au niveau scientifique que personnel. Vos conseils et notamment, vos qualités scientifiques et humaines ont permis à cette thèse de se dérouler dans les meilleures conditions possibles. Je vous suis sincèrement reconnaissante pour tout ce que vous m'avez appris et ne vous souhaite que le meilleur pour les années à venir, vous le méritez amplement.

Un énorme merci aux membres et ex-membres de la **team 22** !! Merci à **Sébastien** (monsieur western blot ^^) pour m'avoir appris de nombreuses manip à mon arrivée, pour ses conseils mais aussi pour les nombreux fous rires ! Un grand merci aussi à **Claudia**, mon italienne préférée, pour son aide précieuse notamment, lors de mes moments de panique (je comprends mieux ton fond d'écran d'ordinateur maintenant). Merci pour tous ces moments de rire mais aussi pour tout le soutien que tu m'as apporté tout au long de cette thèse. Je crois que je ne te remercierai jamais assez ! Enfin merci à **Florent**, le petit dernier de la team 22 pour sa bonne humeur et son aide pour les manip (qui s'avère cruciale en cette fin de thèse). Promis, un jour tu auras tous tes badges !

Je remercie aussi, **Raphaëlle** pour avoir pris le temps de me former à la stéréotaxie, **Sébastien** pour son aide et ses conseils pour les manip de bactériologie et de PCR (merci pour le gain de temps considérable!) et **Sabiha**. Merci également au Dr **Morvane Colin** et à **Séverine** pour m'avoir formée à la production de lentivirus et au MEA.

Je remercie également les docteurs **David Blum, Bruno Lefebvre, Valérie Buée-Scherrer, Didier Vieau, Nicolas Sergeant, Malika Hamdane, Marie-Christine Galas, Sophie Halliez** et **Bernard Sablonnière** pour leurs conseils et leurs remarques lors des réunions d'équipe. Je remercie plus particulièrement le Dr **Bruno** pour ses discussions constructives et surtout pour son apprentissage des formules de politesse ;)

Un grand merci également à l'équipe du secrétariat : **Céline, Michèle, Sophie** et **Nathalie** pour leur gentillesse, leur bonne humeur permanente même lorsqu'on vient les embêter pour papoter et pour tout le travail qu'elles accomplissent pour nous en gardant toujours le sourire. Un merci particulier à : **Céline** pour tes conseils avisés, ta disponibilité et ton soutien dans les moments difficiles et à **Michèle** pour les commandes passées en urgence, les petits services que tu rends sans qu'on ne te demande quoi que ce soit et pour ton soutien également (je te souhaite de profiter pleinement de ta retraite, tu le mérites !). Merci aussi à l'équipe de la laverie : **Karim** et **Thomas** (avec sa phrase fétiche "allez aujourd'hui on a le sourire, c'est vendredi!"). Je remercie aussi **l'équipe de l'animalerie** qui s'occupe au quotidien du bien-être de nos petites souris.

Merci également à tous les étudiants qui font que la vie au labo est plus sympa et notamment à **Mélissa** (même si on ne se voit pas souvent), **Claire** (promis, un jour on ira courir ensemble), **Mégane** (pour les réservations de microscope arrangées) et **Kévin**. Enfin, merci à **Caro**, la nouvelle recrue de la team 22 ;) pour les pauses midi ensemble et ton aide lors de cette fin de thèse. Je remercie aussi les anciens étudiants, et notamment, **Coline, Anthony, Alban, Simon, Maxime** et **Meryem** ainsi que l'ensemble des membres de l'équipe pour leur soutien, leurs conseils et leurs encouragements.

Je tiens à remercier particulièrement **ma famille** qui m'a soutenue tout au long de mes études et qui a toujours cru en moi. Si je suis arrivée jusque là aujourd'hui, c'est grâce à vous et je vous en suis infiniment reconnaissante. Je remercie également ma meilleure amie, **Lizou** qui a toujours été là pour moi dans les bons comme dans les mauvais moments et qui a toujours su trouver les mots pour me remotiver. Merci pour ton soutien et pour avoir cru en moi jusqu'à la fin. Merci également à mon meilleur ami **ph**, pour sa bonne humeur constante et ses blagues qui vous remontent forcément le moral. Merci pour le soutien que tu m'as apporté durant les moments difficiles de cette thèse. Enfin, merci à **Flo** pour avoir été là pour moi et m'avoir soutenue durant mes études.

## Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative principalement caractérisée par la présence de dépôts amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires composés de protéines tau hyperphosphorylées. Tau est une protéine associée aux microtubules qui possède de nombreux sites de phosphorylation pouvant être phosphorylés par différentes kinases. En plus de la pathologie tau, on observe également dans le cerveau des patients atteints de la MA, une apparition précoce d'altérations métaboliques ainsi qu'une perte synaptique qui est à l'origine du développement des troubles cognitifs. En effet, les synapses sont des connexions neuronales essentielles pour la formation de la mémoire qui nécessitent une importante quantité d'énergie pour maintenir leurs fonctions. Depuis plusieurs années, des études suggèrent que l'AMPK – senseur métabolique essentiel des cellules – pourrait être impliquée dans le développement de la MA. En effet, des travaux réalisés *in vitro* ont permis de montrer que l'AMPK est une kinase de tau. Par ailleurs, il a été mis en évidence que chez les patients atteints de la MA, l'AMPK est dérégulée dans les neurones en dégénérescence où elle co-localise avec les protéines tau hyperphosphorylées. Enfin, des études menées dans notre équipe ont également permis de mettre en évidence que suite à une activation synaptique, l'AMPK restaure les niveaux d'énergie des neurones laissant ainsi supposer qu'une dérégulation de son activité pourrait avoir un impact néfaste sur le métabolisme neuronal. Au vu de ces données, les objectifs de mon projet de thèse ont donc été de déterminer l'impact d'une dérégulation de l'AMPK neuronale sur la pathologie tau, la perte synaptique et le métabolisme énergétique neuronal dans un modèle de culture primaire de neurones et *in vivo* chez la souris. La réalisation de ces objectifs nous a permis de démontrer (1) que l'AMPK régule la phosphorylation et la pathologie tau, (2) que la dérégulation de l'AMPK induit une diminution du nombre des synapses ainsi qu'une perte de la fonctionnalité du réseau neuronal, via une voie de signalisation impliquant l'autophagie et (3) que la dérégulation de l'AMPK entraîne des perturbations du métabolisme énergétique neuronal. En conclusion, ce travail de thèse a permis d'apporter une meilleure compréhension sur le rôle de la dérégulation de l'AMPK dans le développement des différentes caractéristiques de la MA. Dans l'ensemble, ces données laissent fortement suggérer que l'AMPK pourrait faire le lien entre les dysfonctionnements métaboliques et l'ensemble des altérations qui se mettent en place au cours de la MA.

**Mots-clés :** AMPK, tau, phosphorylation, synapses, autophagie, métabolisme, maladie d'Alzheimer





## Abstract

### **Role of neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) deregulation on tau pathology, synaptic integrity and energy metabolism: Relevance for Alzheimer's disease**

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder mainly characterized by the presence of amyloid deposits and neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated tau proteins. Tau is a microtubule-associated protein that bears many phosphorylation sites which can be phosphorylated by different kinases. Beside tau pathology, AD is also characterized by cerebral metabolic alterations and synaptic loss, the latter being responsible for the development of cognitive disorders. Indeed, synapses are essential for memory formation and require a large amount of energy to maintain their functions. Interestingly, studies have suggested that AMP-activated protein kinase (AMPK) – a crucial intracellular metabolic sensor – could be involved in the development of AD. Indeed, *in vitro* studies have shown that AMPK is a tau kinase. In addition, AMPK is deregulated in degenerating neurons of AD patients brain where it co-localizes with hyperphosphorylated tau proteins. Additionally, studies carried out in our team showed that upon synaptic activation, AMPK activity is essential to maintain neuronal energy levels thus suggesting that a deregulation of its activity could have harmful impact on neuronal metabolism. On the basis of these data, the objectives of this thesis were to determine the impact of neuronal AMPK deregulation on tau pathology, synaptic loss and neuronal energy metabolism in primary neurons and *in vivo* in mice. The achievement of these objectives allowed us to demonstrate (1) that AMPK regulated tau phosphorylation and pathology (2) that AMPK deregulation caused a decrease of synapses number as well as a loss of neuronal networks functionality, through a signaling pathway involving autophagy and (3) that AMPK deregulation impacted on neuronal energy metabolism. In conclusion, this thesis has provided a better understanding of the role of AMPK deregulation in the development of different hallmarks of AD. Altogether, these data strongly suggest that AMPK could be the link between neuronal metabolism dysfunctions and the development of the alteration that occur during AD.

**Keywords:** AMPK, tau, phosphorylation, synapses, autophagy, metabolism, Alzheimer's disease



# Table des matières

Liste des abréviations .....	5
Liste des figures et tableaux .....	6
Préambule .....	9
<i>Introduction</i> .....	11
<b>Chapitre 1 : La maladie d'Alzheimer</b> .....	13
<b>1. Généralités</b> .....	13
<b>1.1. Un peu d'histoire...</b> .....	13
<b>1.2. Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer</b> .....	14
<b>2. Les différentes formes de la MA</b> .....	15
<b>2.1. Les formes familiales</b> .....	15
<b>2.2. Les formes sporadiques et les facteurs de risque</b> .....	16
2.2.1. <i>Les facteurs de risque génétiques</i> .....	16
2.2.2. <i>Les facteurs de risque environnementaux</i> .....	17
<b>3. Symptômes de la maladie d'Alzheimer</b> .....	17
<b>4. Aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer</b> .....	19
<b>4.1. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer</b> .....	19
<b>4.2. Les biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer</b> .....	20
4.2.1. <i>Les biomarqueurs biologiques</i> .....	20
4.2.2. <i>L'imagerie cérébrale structurale : l'IRM</i> .....	20
4.2.3. <i>L'imagerie cérébrale fonctionnelle : la TEP</i> .....	21
<b>5. Les lésions histopathologiques de la maladie d'Alzheimer</b> .....	22
<b>5.1. Les plaques amyloïdes</b> .....	22
<b>5.2. La dégénérescence neurofibrillaire</b> .....	24
<b>5.3. La progression des lésions</b> .....	24
<b>5.4. Lien entre la pathologie amyloïde et la pathologie tau</b> .....	25
<b>6. Stratégies thérapeutiques de la MA</b> .....	26
<b>6.1. Les stratégies actuelles</b> .....	26
<b>6.2. Les nouvelles stratégies thérapeutiques</b> .....	27
6.2.1. <i>Les approches anti-amyloïdes</i> .....	27
6.2.2. <i>Les approches anti-tau</i> .....	28
<b>Chapitre 2 : Tau, synapses et métabolisme énergétique neuronal, un lien dans la MA ?</b> .....	29

<b>1. La protéine tau</b> .....	29
<b>1.1. Généralités et structure</b> .....	29
<b>1.2. Fonctions principales de la protéine tau</b> .....	30
<b>1.3. La phosphorylation : la principale modification post-traductionnelle de tau</b> .....	33
1.3.1. <i>Les kinases de tau</i> .....	33
1.3.2. <i>Les phosphatases de tau</i> .....	33
<b>2. L'intégrité synaptique : un mécanisme fortement altéré au cours de la MA</b> .....	34
<b>2.1. Généralités</b> .....	34
<b>2.2. La plasticité synaptique</b> .....	36
2.2.1. <i>Les récepteurs AMPA et NMDA</i> .....	36
2.2.2. <i>La potentialisation à long terme</i> .....	38
<b>2.3. Altérations de la plasticité synaptique et de la mémoire dans des modèles de MA</b> .....	40
2.3.1. <i>Les synapses et le peptide amyloïde</i> .....	40
2.3.2. <i>Les synapses et la protéine tau</i> .....	41
<b>3. Le métabolisme énergétique neuronal : une voie précocement altérée lors de la MA</b> .....	43
<b>3.1. Généralités sur le métabolisme énergétique neuronal</b> .....	43
3.1.1. <i>La glycolyse et la respiration mitochondriale</i> .....	44
3.1.2. <i>La mitochondrie : un producteur d'énergie mais pas uniquement</i> ... ..	45
3.1.2.1. <i>Le transport des mitochondries</i> .....	46
3.1.2.2. <i>La dynamique des mitochondries</i> .....	46
3.1.2.3. <i>La mitophagie</i> .....	48
<b>3.2. Altérations du métabolisme énergétique neuronal dans la MA</b> .....	48
3.2.1. <i>Altérations du métabolisme glucidique</i> .....	48
3.2.2. <i>Altérations mitochondriales</i> .....	50
<b>Chapitre 3 : La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) : le senseur métabolique essentiel des cellules</b> .....	52
<b>1. Historique</b> .....	52
<b>2. Structure de l'AMPK</b> .....	52
<b>3. Régulation de l'AMPK</b> .....	55
<b>3.1. Régulation allostérique de l'AMPK</b> .....	55
<b>3.2. Régulation par les modifications post-traductionnelles</b> .....	56
3.2.1. <i>Régulation par phosphorylation et déphosphorylation</i> .....	56
3.2.2. <i>Régulation par myristoylation</i> .....	58
<b>3.3. Régulation par le lysosome</b> .....	58

<b>3.4.  Activateurs et inhibiteurs de l'AMPK</b> .....	59
<b>4.  Fonctions de l'AMPK dans le système nerveux central (SNC)</b> .....	60
<b>4.1.  Rôle dans la régulation de la prise alimentaire</b> .....	61
<b>4.2.  Rôle dans le développement et la différenciation</b> .....	61
4.2.1. <i>Rôle dans le développement cérébral</i> .....	61
4.2.2. <i>Rôle dans la polarité neuronale</i> .....	62
4.2.3. <i>Rôle dans le remodelage synaptique</i> .....	64
<b>4.3.  Rôle dans les fonctions cognitives, la mémoire, la plasticité synaptique</b> .....	64
4.3.1. <i>Effets de l'activation périphérique de l'AMPK sur la mémoire</i> .....	64
4.3.2. <i>Effets d'une activation centrale de l'AMPK sur la mémoire</i> .....	65
<b>5.  Rôle de l'AMPK dans les maladies neurodégénératives</b> .....	66
<b>5.1.  Implication de l'AMPK dans le développement de la maladie d'Alzheimer</b> .....	67
5.1.1. <i>Rôle de l'AMPK dans le métabolisme de l'APP</i> .....	67
5.1.2. <i>Rôle de l'AMPK dans la pathologie tau</i> .....	68
<b>5.2.  Rôle de l'AMPK dans les autres maladies neurodégénératives</b> .....	71
5.2.1. <i>AMPK et maladie de Parkinson</i> .....	71
5.2.2. <i>AMPK et maladie de Huntington</i> .....	72
5.2.3. <i>AMPK et Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)</i> .....	73
5.2.4. <i>AMPK et ischémie cérébrale</i> .....	74
<i>Objectifs du projet de thèse</i> .....	75
<i>Résultats</i> .....	79
<b>Chapitre 1 : Etude du rôle de l'AMPK dans la phosphorylation de la protéine tau et dans le développement de la pathologie tau</b> .....	81
<b>1.  Introduction</b> .....	81
<b>2.  Résultats</b> .....	82
<b>3.  Conclusion</b> .....	101
<b>Chapitre 2 : Rôle de la dérégulation de l'AMPK neuronale sur l'intégrité synaptique</b> .....	105
<b>1.  Introduction</b> .....	105
<b>2.  Résultats</b> .....	106
<b>3.  Résultats complémentaires</b> .....	139
<b>4.  Discussion</b> .....	140
<b>Chapitre 3 : Conséquences d'une dérégulation de l'AMPK sur le métabolisme énergétique neuronal</b> .....	145
<b>1.  Introduction</b> .....	145
<b>2.  Résultats</b> .....	146

<b>3. Conclusion</b> .....	168
<i>Discussion générale</i> .....	171
<i>Conclusion générale</i> .....	181
<i>Références bibliographiques</i> .....	185
<i>Annexes</i> .....	215
<b>Annexe 1 : Revue "Tau as a therapeutic target"</b> .....	217
<b>Annexe 2 : Revue "AMPK in Neurodegenerative Diseases"</b> .....	259
<b>Annexe 3 : Article "AMP-activated protein kinase is essential for the maintenance of energy levels during synaptic activation"</b> .....	287

## Liste des abréviations

A $\beta$	Amyloïde $\beta$	MTs	Microtubules
ACC	Acétyl CoA Carboxylase	NFTs	Neurofibrillary Tangles
Ach	Acétylcholine	NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
ADP	Adénosine Diphosphate	PI3K	Phospho Inositide 3 Kinase
AICAR	5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide	PKA	Protéine Kinase A
AICD	Amyloid precursor protein Intracellular Domain	PP2A	Protein Phosphatase-2A
ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis	PP2C $\alpha$	Protein Phosphatase 2C $\alpha$
AMP	Adénosine Monophosphate	PS1	Presenilin-1
AMPA	Alpha-amino-3-hydroxy-5- Méthylisozazol-4-Propionate	PS2:	Presenilin-2
AMPK	AMPctivated-protein kinase	ROS	Reactive Oxygen Species
ApoE	Apolipoprotéine E	TAK 1	Transforming growth factor- $\beta$ - Activated Kinase 1
APP	Amyloid precursor protein	TEP	Tomographie à Emission de Positrons
ATP	Adénosine Triphosphate		
BACE 1	beta-site APP Cleaving Enzyme 1		
CamKK $\beta$	Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase Kinase $\beta$		
Cdk5	Cyclin Dependent Kinase 5		
DNF	Dégénérescence Neurofibrillaire		
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3		
GWAS	Genome-Wide Association Studies		
IAChe	Inhibiteurs de l'Acétylcholinestérase		
IEG	Immediate Early Gene		
LCS	Liquide Cérébrospinal		
LTD	Long Term depression		
LTP	Long Term Potentiation		
MA	Maladie d'Alzheimer		
MAP	Microtubule Associated Protein		
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase		
MBD	Microtubules Binding Domains		



## Liste des figures et tableaux

- Figure 1** : Portait du Docteur Aloïs Alzheimer et de sa patiente Auguste Deter âgée de 51 ans.
- Figure 2** : Principales découvertes concernant la maladie d'Alzheimer au cours du XX<sup>ème</sup> siècle
- Figure 3** : La maladie d'Alzheimer en quelques chiffres... d'aujourd'hui à dans 30 ans.
- Figure 4** : *Manhattan plot* des SNPs découverts par les études d'association pangénomique, GWAS.
- Figure 5** : Evolution des différents biomarqueurs de la MA au cours des trois stades de la pathologie.
- Figure 6** : Les 7 stades de la MA selon l'échelle de Reisberg.
- Figure 7** : IRM en coupe coronale d'un patient atteint de MA
- Figure 8** : Consommation du glucose dans le cerveau d'une personne saine et d'un patient atteint de la MA
- Figure 9** : Les lésions histopathologiques de la maladie d'Alzheimer : la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques amyloïdes.
- Figure 10** : Les voies régulant le métabolisme de l'APP
- Figure 11** : Evolution spatio-temporelle des pathologies amyloïde et tau.
- Figure 12** : Structure des différentes isoformes de la protéine tau présentes dans le cerveau humain.
- Figure 13** : Schéma simplifié montrant l'implication de la protéine tau dans le transport axonal.
- Figure 14** : Les fonctions de la protéine tau en fonction de sa localisation.
- Figure 15** : Représentation schématique de la structure d'une synapse.
- Figure 16**: Schéma montrant les principaux mécanismes impliqués dans la transmission glutamatergique.
- Figure 17** : Représentation schématique d'une coupe d'hippocampe illustrant la voie perforante et enregistrement montrant l'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) suite à une stimulation.
- Figure 18** : Diagramme représentant l'utilisation de l'ATP dans les neurones
- Figure 19** : La glycolyse et la respiration mitochondriale.
- Figure 20**: Représentation schématique des mécanismes impliqués dans les processus de fission et de fusion mitochondriale.
- Figure 21** : Structure cristallographique de l'AMPK sous sa forme phosphorylée et non phosphorylée.
- Figure 22** : Mécanismes de régulation de l'activation de l'AMPK.

**Figure 23 :** Diagramme des principales fonctions métaboliques de l'AMPK au niveau périphérique et central.

**Figure 24 :** Mécanisme d'action de l'AMPK dans la polarité axonale.

**Figure 25 :** Immunomarquage de l'AMPK phosphorylée dans le cerveau de patients atteints de la MA.

**Figure 26 :** Schéma illustrant des mécanismes proposés lors d'une dérégulation de l'AMPK dans la MA

**Figure 27 :** Rôle de la dérégulation de l'AMPK dans la maladie de Parkinson

**Figure 28 :** Implication de l'AMPK dans la maladie Huntington via la voie de l'apoptose.

**Figure 29 :** Etude de l'implication de la protéine tau dans la perte de l'intégrité synaptique induite par la dérégulation de l'AMPK.

**Figure 30 :** Schéma simplifié représentant le principe du test Click-it.

**Figure 31 :** Etude de l'implication de la synthèse protéique dans la perte des synapses médiée par la dérégulation de l'AMPK

**Tableau 1 :** Liste non exhaustive des activateurs et inhibiteurs de l'AMPK avec leur mode d'action.



## Préambule

Le cerveau est l'organe du corps qui, proportionnellement à sa masse, consomme le plus d'énergie. En effet, bien qu'il ne représente que 2% du poids corporel chez l'homme, le cerveau utilise environ 20 à 25 % de l'énergie totale sous la forme de glucose et d'oxygène. Cette énergie est majoritairement utilisée par les neurones qui la convertissent en ATP afin d'assurer leurs différentes fonctions telles que la restauration du potentiel de membrane, le transport axonal, les voies de signalisation intracellulaires et le recyclage des neurotransmetteurs (Attwell and Laughlin, 2001). Au sein du neurone, l'ATP est principalement consommé au niveau de la synapse lors de la transmission glutamatergique, un processus essentiel impliqué dans la formation de la mémoire (Martin, et al. 2000). Les neurones nécessitent donc de maintenir en permanence leur niveau d'énergie puisque l'ensemble de leurs fonctions en dépend de façon critique. En effet, il a par exemple été montré qu'une réduction des apports cérébraux en glucose et en oxygène durant de courtes périodes – observées notamment lors d'une ischémie cérébrale – pouvait générer d'importants dommages cérébraux soulignant ainsi l'importance de la régulation de l'homéostasie énergétique neuronale (McCullough *et al.*, 2005).

Des altérations métaboliques sont observées dans un grand nombre de maladies neurodégénératives dont la plus répandue est la maladie d'Alzheimer (MA). En effet, des études réalisées chez les patients atteints de cette pathologie ont permis de mettre en évidence que dès les stades précoces de la maladie, ont lieu une réduction du métabolisme du glucose ainsi qu'une altération des fonctions mitochondriales (Jack et al. 2013 ; Atamna and Frey 2007). Par ailleurs, il a été reporté dans la littérature qu'au cours de la MA se produit également une perte des synapses qui est à l'origine des troubles cognitifs observés chez les patients atteints de la MA (Terry *et al.*, 1991). Etant donné que les synapses utilisent la majeure partie de l'énergie neuronale, il est possible que les dysfonctionnements métaboliques constatés lors de la MA puissent être impliqués dans la perte synaptique. D'un point de vue histopathologique, la MA est également caractérisée par l'accumulation extra-neuronale de peptides amyloïdes  $\beta$  à l'origine de la formation des plaques amyloïdes (Glenner and Wong, 1984) et par une accumulation intra-neuronale d'agrégats de protéines tau hyperphosphorylées (Brion et al. 1985). Depuis plusieurs années, des études suggèrent que la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), un senseur métabolique essentiel pour les cellules, pourrait être impliquée dans le développement de la MA. En effet, des études effectuées à partir de cerveaux issus de patients atteints de la MA ont permis de montrer que, dans les neurones en dégénérescence, l'AMPK activée est fortement accumulée et co-localise avec les protéines tau hyperphosphorylées (Vingtdeux et al., 2011). De plus, des études ont également démontré que l'AMPK est une kinase de tau *in vitro* (Vingtdeux et al. 2011 ; Thornton et al. 2011), laissant ainsi suggérer que l'AMPK pourrait

réguler la phosphorylation de la protéine tau et par conséquent la pathologie tau. Par ailleurs, étant donné que l'AMPK joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie énergétique, il est également possible que sa dérégulation puisse être impliquée dans la mise en place des altérations métaboliques et synaptiques observées au cours de la MA.

Au vu de l'ensemble de ces données, mon travail de thèse a eu pour but d'investir le rôle d'une dérégulation de l'AMPK dans 1) la phosphorylation de la protéine tau et la pathologie tau, 2) l'intégrité des synapses et 3) le métabolisme énergétique neuronal. Toutefois, avant de s'intéresser aux résultats de nos travaux, il est dans un premier temps nécessaire d'aborder ces trois mécanismes un par un. Un premier chapitre sera donc consacré à l'introduction de la MA et des deux principales lésions qui la caractérisent. Puis au cours du deuxième chapitre, nous nous attarderons dans un premier temps à décrire la structure et les fonctions de la protéine tau. Après avoir défini la notion de plasticité synaptique et son rôle dans la formation de la mémoire, une partie sera ensuite consacrée aux altérations synaptiques qui ont lieu lors de la MA. Une dernière section sera ensuite dédiée au métabolisme énergétique et aux dérégulations de celui-ci lors de la MA. Enfin, un dernier chapitre aura quant à lui pour but d'introduire des généralités sur l'AMPK ainsi que son implication dans la MA.

# *Introduction*

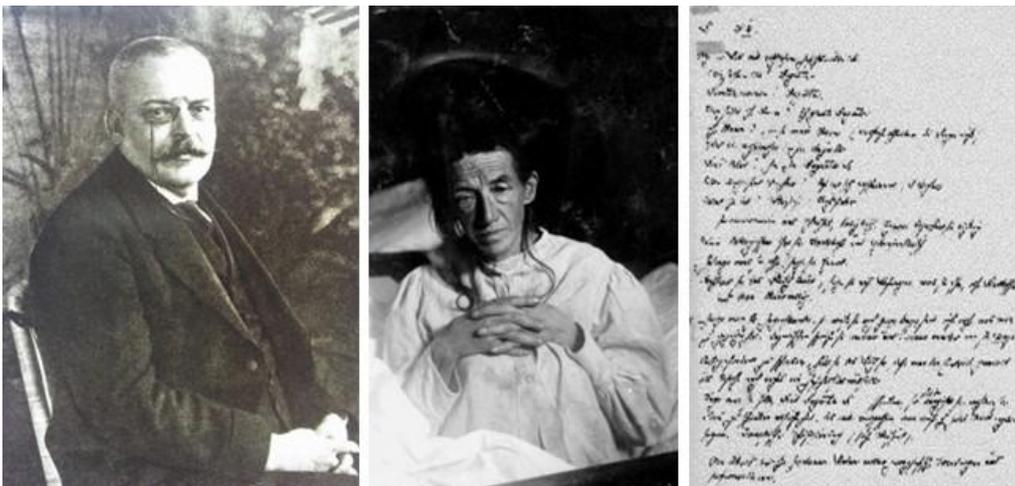


# Chapitre 1 : La maladie d'Alzheimer

## 1. Généralités

### 1.1. Un peu d'histoire...

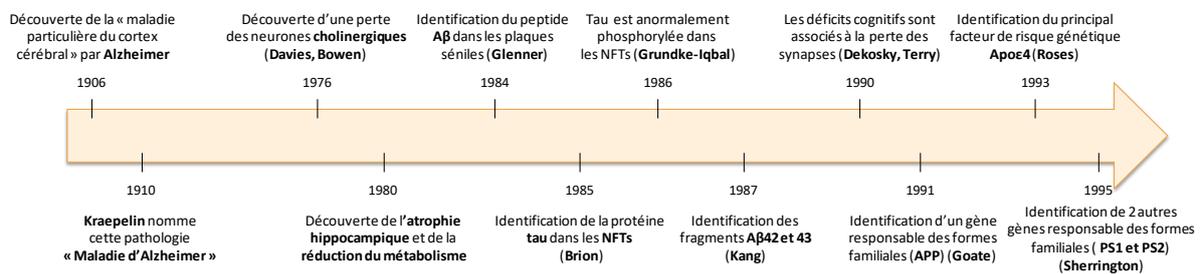
La maladie d'Alzheimer (MA) a été identifiée en 1906 par le neuropsychiatre allemand Aloïs Alzheimer. Cette découverte a pu avoir lieu grâce à l'étude d'une de ces patientes, âgée de 51 ans et admise à l'hôpital de Francfort pour cause de démence, et présentant des troubles mnésiques et de l'orientation, un mutisme ainsi que des hallucinations : il s'agit d'Auguste Deter (*Figure 1*). A la mort de sa patiente, le Dr Aloïs Alzheimer (1864-1915) réalisa une autopsie de son cerveau lui permettant ainsi de découvrir la présence de deux lésions histopathologiques : des dégénérescences neuronales (la dégénérescence neurofibrillaire) ainsi que des dépôts protéiques extracellulaires anormaux (les plaques amyloïdes). Le 4 Novembre 1906, lors de la 37<sup>ème</sup> Conférence des neuropsychiatres allemands du sud-ouest de Tübingen, Aloïs Alzheimer décrit pour la première fois ses travaux et dénomme cette pathologie de "maladie particulière du cortex cérébral". Il faut alors attendre 1910, pour que la pathologie dont souffrait Auguste Deter soit renommée "la maladie d'Alzheimer" par le Docteur Kraepelin (1856-1926). Entre temps, d'autres médecins tels qu'Oskar Fisher (1876-1942) et Gaetano Perusini (1879-1915) vont confirmer mais également contribuer à la découverte de cette maladie.



**Figure 1 : Portait du Docteur Aloïs Alzheimer et de sa patiente Auguste Deter âgée de 51 ans. Extrait de notes d'Aloïs Alzheimer datant du 29 Novembre 1901. (D'après Maurer & Maurer 2002)**



Ce n'est que dans les années 1980 que des travaux révèlent pour la première fois la composition des lésions observées 58 ans auparavant par le Dr Aloïs Alzheimer. En effet, en 1984 l'équipe du Dr Georges Glenner découvre que la protéine amyloïde  $\beta$  ( $A\beta$ ) est le constituant majeur des plaques séniles (Glenner and Wong, 1984). Puis, en 1985, l'équipe du Dr Jean-Pierre Brion caractérise la protéine responsable de la dégénérescence neurofibrillaire : la protéine tau (Brion, 1985). Ces deux lésions seront détaillées dans la *partie 5*. Au cours de cette même période, il est également reporté pour la première fois que cette pathologie est associée à une atrophie de la région hippocampique reflétant la perte des neurones cholinergiques (Davies and Maloney 1976 ; Seab et al. 1988) ainsi qu'à une réduction du métabolisme énergétique cérébral (Ferris *et al.*, 1980). Enfin en 1990, les chercheurs Dekosky et Terry mettent en évidence que les altérations cognitives observées chez les patients atteints de la MA sont associées à une perte des synapses (*qui comme nous le détaillerons dans le chapitre 2 jouent un rôle essentiel dans la formation de la mémoire*) (DeKosky & Scheff, 1990 ; Terry et al., 1991). Le XX<sup>ème</sup> siècle a ainsi été marqué par une multitude d'avancées scientifiques majeures ayant permis d'améliorer progressivement la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de cette maladie. Les principales découvertes de ce siècle sont regroupées en *figure 2*.

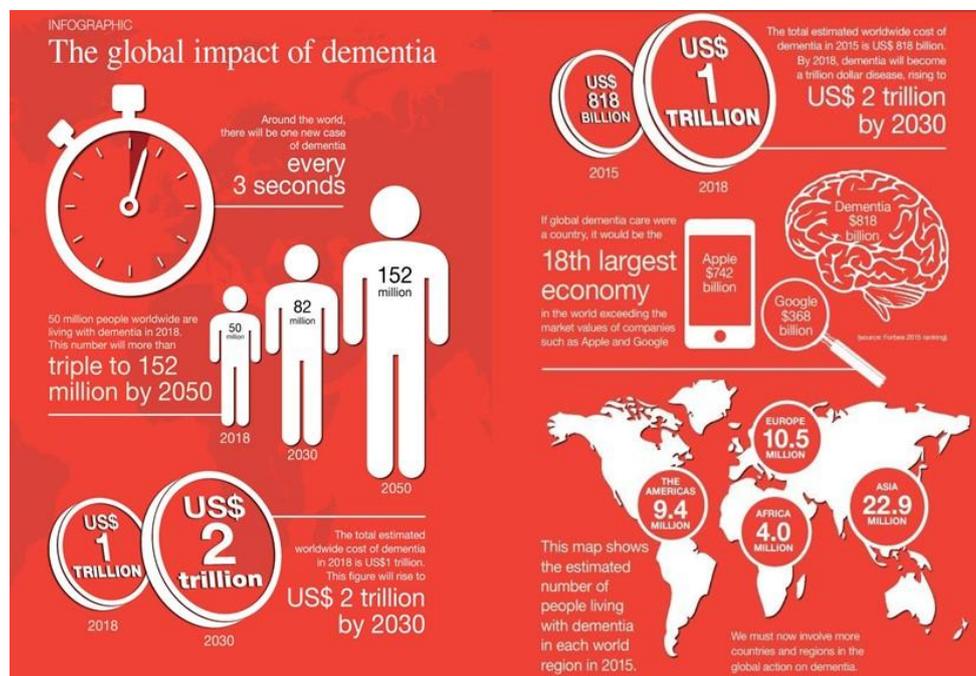


**Figure 2 : Principales découvertes concernant la maladie d'Alzheimer au cours du XX<sup>ème</sup> siècle (liste non exhaustive)**

## 1.2. Epidémiologie de la maladie d'Alzheimer

Aujourd'hui, on dénombre 50 millions de personnes atteintes de la MA dans le monde, faisant de cette pathologie la démence la plus répandue. Il est inquiétant de noter que d'ici 2050 ce chiffre devrait tripler pour atteindre 152 millions de personnes atteintes (World Alzheimer Report 2018). Chaque année, on recense 9.9 millions de nouveaux cas de démence à travers le monde ce qui représente 1 nouveau cas toutes les 3 secondes. Par ailleurs, le coût total estimé de cette démence est de 1 trillion de \$ par an et 82 milliards d'heures sont consacrées aux soins apportés à ces patients (World Alzheimer Report 2018) (*Figure 3*). Au vu de ces chiffres alarmants, il devient donc urgent de

trouver des traitements curatifs pour cette pathologie. Malheureusement, à l'heure actuelle, seuls des traitements symptomatiques existent et seront présentés en *partie 6*.



**Figure 3 : La maladie d'Alzheimer en quelques chiffres... d'aujourd'hui à dans 30 ans.**  
(D'après *World Alzheimer Report 2018*)

## 2. Les différentes formes de la MA

### 2.1. Les formes familiales

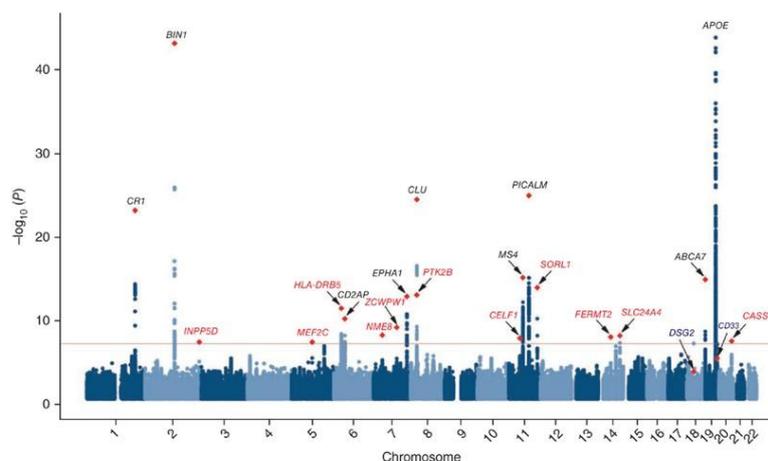
Bien que la majorité des cas de la MA soient des formes sporadiques, on dénombre moins de 1% de formes familiales de cette pathologie. Ces dernières sont causées par des mutations génétiques à transmission autosomique dominante et sont caractérisées par une apparition plus précoce de la maladie (avant 65 ans). Des études ont permis de mettre en évidence que les mutations à l'origine des formes génétiques de la MA sont localisées au niveau de trois gènes distincts : *PS1 (presenilin-1)* au niveau du chromosome 14, *PS2 (presenilin-2)* porté par le chromosome 1 et, *APP (Amyloid precursor protein)* localisé sur le chromosome 21 (Sherrington et al., 1995 ; Levy-Lahad et al., 1995 ; Goate et al., 1991 ; El Kadmiri and al., 2013). Ces trois gènes codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme de l'APP, protéine étant à l'origine de la production du peptide A $\beta$  (et que nous aborderons dans la *partie 5.1*).

## 2.2. Les formes sporadiques et les facteurs de risque

La MA est une maladie multifactorielle complexe faisant intervenir des facteurs génétiques et environnementaux. Toutefois, l'âge constitue le principal facteur de risque de développer la MA puisqu'à partir de 65 ans, la prévalence double tous les cinq ans.

### 2.2.1. Les facteurs de risque génétiques

L'apolipoprotéine E (ApoE) est le premier facteur de prédisposition génétique qui a été découvert, en 1993 (*Figure 2*). L'ApoE est une protéine sérique qui régule la redistribution du cholestérol dans les cellules et participe ainsi à la régulation du métabolisme des lipoprotéines. Le gène codant cette protéine possède trois allèles : APOε2, APOε3 et APOε4. Il a été établi que le polymorphisme du gène de l'ApoE est associé à une augmentation de l'incidence de la MA. En effet, les porteurs d'un seul allèle APOε4 ont 2 à 3 fois plus de risque de développer la MA alors que les porteurs de deux allèles APOε4 ont quant à eux un risque 12 à 15 fois plus élevé (Strittmatter et al., 1993 ; Corder et al., 1993). Grâce à la réalisation d'études d'association pangénomique, GWAS (Genome-Wide Association Studies), d'autres facteurs de prédispositions génétiques ont pu être mis en évidence tels que les gènes *PICALM* (Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein), *BIN1* (Bridging Integrator-1), *CLU* (clusterine) et *CRI* (Complement receptor type 1) (*Figure 4*). Ces études ont notamment permis de mettre en évidence l'importance de certaines voies de signalisation pouvant moduler le risque de développer la MA dont les deux principales sont l'inflammation et la réponse immune. De nouvelles voies ont également été mises en avant grâce à ces études dont : les fonctions synaptiques hippocampiques, le transport axonal ou encore les fonctions cytosquelettiques (Seshadri et al., 2010 ; Lambert et al., 2013 ; Harold et al., 2009).



**Figure 4 : Manhattan plot des SNPs découverts par les études d'association pangénomique, GWAS. La ligne rouge indique le seuil de significativité (D'après Lambert et al., 2013)**

A l'inverse, il existe également des facteurs génétiques dit protecteurs. En effet, il a été démontré que contrairement à l'APOε4, la présence du variant APOε2 aurait quant à lui un effet neuroprotecteur pour la MA (Corder et al., 1993). De même, une mutation du gène codant l'APP a également été montrée pour avoir un effet protecteur contre la MA, il s'agit de la mutation APPA673T (Jonsson *et al.*, 2012). Il a par exemple été mis en évidence que la présence de cette mutation engendrait une réduction du clivage de l'APP par BACE1 ainsi qu'une diminution de l'agrégation des peptides Aβ (Maloney *et al.*, 2014).

### 2.2.2. Les facteurs de risque environnementaux

Les formes sporadiques de la MA, bien que principalement dépendantes de l'âge, peuvent également être influencées par de nombreux facteurs de risque environnementaux. Parmi ceux-ci, les plus importants correspondent aux facteurs de risque cardiovasculaires et métaboliques, à savoir : l'hypertension artérielle, le diabète de type 2 ou encore une hypercholestérolémie (Imtiaz *et al.*, 2014). Il a également été démontré que les personnes présentant des dysfonctions dans la voie de l'insuline telles qu'une insulino-résistance, une hyperglycémie et une intolérance au glucose, ont un risque plus accru de développer une MA (Luchsinger *et al.*, 2004 ; Crane *et al.*, 2013). Des études ont ainsi pu démontré que les personnes atteintes de diabète présentent un risque de développer une MA qui est 65 fois plus important qu'une personne "saine" montrant ainsi le rôle capital que jouent des dérégulations du métabolisme énergétique sur le risque de survenue de la MA (Arvanitakis *et al.*, 2004). Par ailleurs, l'obésité étant associée à l'ensemble des facteurs précédents, représente aussi un facteur de risque majeur de la MA. Enfin, en plus de ces facteurs de risque liés au métabolisme énergétique, notre hygiène de vie a également un impact majeur sur la susceptibilité à développer cette pathologie. Ainsi, l'hygiène alimentaire, la pratique régulière d'une activité sportive, la consommation de drogue et d'alcool ou encore le tabac sont autant de facteurs pouvant avoir un effet positif ou négatif sur l'apparition de la MA (Imtiaz *et al.*, 2014).

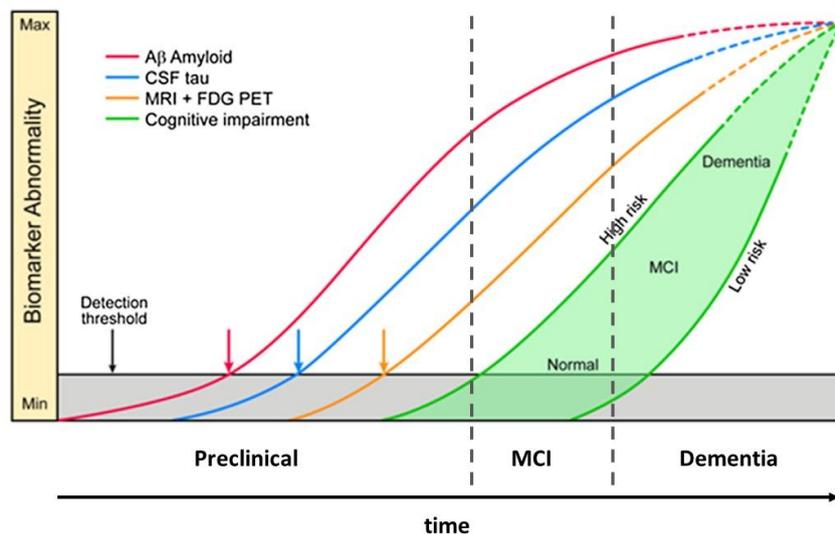
## 3. Symptômes de la maladie d'Alzheimer

La MA est une pathologie neurodégénérative sévère et progressive caractérisée principalement par une perte de mémoire et par des altérations des fonctions cognitives. Bien qu'il existe différents types de mémoire, tous ne sont pas altérés lors de la MA. En effet, la première plainte d'une personne atteinte de la MA est l'altération de sa mémoire épisodique, qui permet de mémoriser les événements

relativement récents (comme par exemple le repas pris la veille). Ces troubles de la mémoire s'accompagnent aussi de troubles de l'orientation et notamment des relations spatio-temporelles (telle qu'une confusion des lieux et du temps), et de difficultés dans la planification et la résolution de problèmes (tel que planifier un rendez-vous). Au cours du temps, l'état cognitif du patient va continuer à se dégrader et d'autres troubles cognitifs vont se développer dont notamment, des changements d'humeurs et de comportement, une aphasie (trouble du langage) une apraxie (difficulté à effectuer des mouvements) ou encore une agnosie (difficulté à reconnaître des visages familiers) (Greene, Hodges and Baddeley, 1995 ; Binetti *et al.*, 1996 ; Rizzo *et al.*, 2000).

Selon les critères de la NIA-AA (National Institute on Aging-Alzheimer's Association) et IWG-2 (International Working Group), la MA peut être classée en 3 stades (Molin and Rockwood, 2016) :

- Un stade asymptomatique qui correspond à la phase où commencent à apparaître les lésions cérébrales à savoir, l'accumulation de peptides A $\beta$ , la phosphorylation de tau et les altérations synaptiques hippocampique (stade préclinique)
- Un stade prodromal au cours duquel s'ajoutent les premiers troubles mnésiques, l'hypométabolisme du glucose et l'atrophie cérébrale (stade MCI)
- Un stade sévère durant lequel les troubles mnésiques deviennent plus importants et s'accompagnent d'altérations des fonctions cognitives. A ce stade, on parle de démence. (stade démence) (Figure 5).



**Figure 5 : Evolution des différents biomarqueurs de la MA au cours des trois stades de la pathologie.** La MA est une pathologie qui met de nombreuses années à se développer. Le peptide A $\beta$  est le premier biomarqueur à devenir anormal, suivi par la détection de la protéine tau phosphorylée dans le liquide cébrospinal, l'hypométabolisme glucidique, l'atrophie cérébrale et les troubles cognitifs (Modifié d'après Jack *et al.*, 2013)

Toutefois, il existe également une autre manière de regrouper les différents phases de la MA : il s'agit de l'échelle de détérioration globale de Reisberg (Reisberg, 1984). Cette échelle segmente la MA en 7 stades distincts illustrés en *figure 6*.

ÉCHELLE DE DÉTÉRIORATION GLOBALE DE REISBERG	
<b>Stade 1</b>	Aucun symptôme
<b>Stade 2</b>	Symptômes légers (pertes de mémoire récente, difficultés à prendre des décisions) sans déclin mesurable aux tests neuropsychologiques
<b>Stade 3</b>	Symptômes légers avec déclin mesurable aux tests neuropsychologiques, mais sans entrave importante aux activités de tous les jours
<b>Stade 4</b>	Démence légère (capacité de conduire une automobile à condition d'être accompagné)
<b>Stade 5</b>	Démence modérée (choix des vêtements fait par une autre personne ; déplacements effectués à pied dans des endroits familiers seulement ; gestion des finances personnelles effectuée par une autre personne)
<b>Stade 6</b>	Démence sévère (doit être lavé et habillé par une autre personne ; ne peut rester seul)
<b>Stade 7</b>	Démence très sévère à terminale (incapacité de marcher de façon sécuritaire ; difficulté à avaler)

FIGURE 18 Source : Reisberg et coll., 1984

**Figure 6 : Les 7 stades de la MA selon l'échelle de Reisberg. (D'après Reisberg et al., 1984).**

## 4. Aspects cliniques de la maladie d'Alzheimer

### 4.1. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer

Bien qu'à l'heure actuelle, il est encore impossible d'établir un diagnostic certain de la MA, il existe des critères permettant d'évaluer une atteinte probable de cette pathologie. Ces critères ont été proposés en 1984 par McKhann et reposent sur une évaluation clinique et neuropsychologique du patient (McKhann *et al.*, 1984). Cependant, bien que validés après examens post-mortem des patients, ces critères présentaient une faible spécificité malgré une bonne sensibilité (Kazee *et al.*, 1993). En 2011, ils ont alors été revisités en tenant notamment compte des nouvelles avancées cliniques et scientifiques reposant sur l'identification de biomarqueurs et sur l'imagerie cérébrale (McKhann *et al.*, 2011).

L'examen clinique des patients consiste à évaluer le degré de leurs troubles cognitifs grâce à l'utilisation du score au test neuropsychologique MMSE (Mini-Mental State Examination) de Folstein. Les résultats de ce test permettent ensuite d'identifier la sévérité de la démence qui peut être définie de "légère" (score compris entre 18 et 24), "modérée" (score compris entre 10 et 18) ou "sévére" (score inférieur à 10) (Folstein *et al.*, 1975) ce qui peut ainsi permettre d'orienter le diagnostic du syndrome de démence vers une MA ou autre.

## 4.2. Les biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer

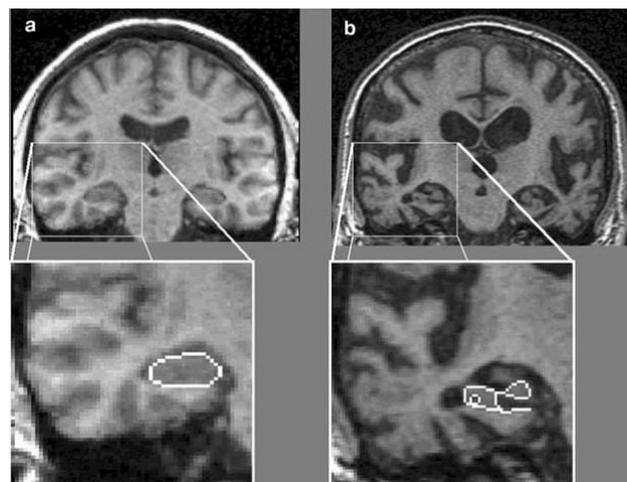
Comme décrit précédemment, l'établissement d'un diagnostic de la MA est difficile puisque celui-ci s'appuie principalement sur des critères cliniques. Toutefois, d'autres outils font l'objet de recherches intenses afin d'établir un diagnostic plus précis et reposent sur l'utilisation de biomarqueurs.

### 4.2.1. Les biomarqueurs biologiques

Malgré son caractère invasif, le prélèvement du LCS (liquide cébrospinal) représente une technique efficace pour quantifier les biomarqueurs de la MA dont les deux principaux sont la protéine tau (phosphorylée ou non) et le peptide A $\beta$  (Peskind *et al.*, 2005 ; Blennow *et al.*, 2010). Des études ont permis de mettre en évidence que dans le LCS de patients diagnostiqués Alzheimer, les concentrations de protéines tau totales et phosphorylées sont plus élevées que celui de personne saines (Ewers *et al.*, 2007 ; Malaplate-Armand *et al.*, 2009). A l'inverse, on observe une diminution des concentrations en peptides A $\beta$  et plus précisément, du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40. Cette réduction serait notamment due à l'accumulation de ce peptide sous la forme de plaques amyloïdes, réduisant ainsi les formes solubles capables de diffuser dans le LCS (Hansson *et al.*, 2007 ; Fagan *et al.*, 2006).

### 4.2.2. L'imagerie cérébrale structurale : l'IRM

L'atrophie cérébrale est une des caractéristiques majeures de la MA. En effet, on observe chez les patients atteints de cette pathologie une réduction importante du volume des régions corticales et plus particulièrement de l'hippocampe, de l'amygdale et du lobe temporal. Cette atrophie peut être visualisée et quantifiée au moyen de technique d'imagerie cérébrale structurale tels que l'IRM (imagerie à résonance magnétique) (Jack *et al.*, 1992 ; Braskie and Thompson, 2014 ; Jack *et al.*, 1992) (Figure 7). Il est intéressant de noter que cette atrophie a également lieu au cours du vieillissement normal, mais est cependant plus

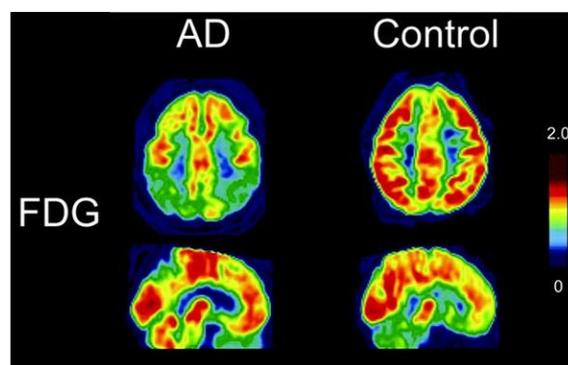


**Figure 7 : IRM en coupe coronale** d'une personne saine (a) et d'un patient atteint de la MA (b) montrant l'atrophie généralisée du cerveau et notamment des régions hippocampiques. (D'après Mosconi *et al.*, 2005)

lente et peut par conséquent être distinguée de l'atrophie dite pathologique (Henriques *et al.*, 2018). Par ailleurs, il est intéressant de préciser que la vitesse à laquelle se produit cette atrophie cérébrale peut être corrélée au degré de sévérité de la MA (Jack *et al.*, 2004).

#### 4.2.3. L'imagerie cérébrale fonctionnelle : la TEP

Au vu de l'importance des facteurs de risque métabolique dans le développement de la MA, un dernier outil peut être utilisé pour permettre notamment, d'analyser les modifications du métabolisme énergétique cérébral : il s'agit de la tomographie à émission de positrons ou TEP. Cette technique permet d'apporter des informations fonctionnelles et repose sur l'injection de traceurs marqués par un atome radioactif (fluor, carbone) et permet par exemple, d'effectuer une analyse du métabolisme cérébral. Ainsi, grâce à l'utilisation d'un analogue du glucose marqué radioactivement ( $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose), des études ont pu permettre d'analyser le métabolisme glucidique des différentes régions cérébrales des patients atteints de la MA et mettre ainsi en évidence la mise en place d'un hypométabolisme glucidique précoce (ces études seront détaillées au cours du chapitre 3) (Figure 8). L'utilisation du FDG-PET s'est aussi récemment avéré être un outil de choix dans le diagnostic de la MA. En effet, une étude effectuée par le groupe de *Caminiti*, a permis de montrer que l'hypométabolisme glucidique observé par la technique du FDG-PET correspond au meilleur marqueur prédictif de la MA (Caminiti *et al.*, 2018) puisqu'il permet de discriminer les patients qui vont développer une MA ou une autre démence de ceux dont l'état restera stable. L'utilisation de traceurs pour l'amyloïde ( $^{18}\text{F}$ -AV-45) et tau permettent aussi d'analyser les dépôts amyloïdes ainsi que les agrégats de tau présents dans le cerveau de patients atteints de la MA et font l'objet de recherches intenses (Nordberg, 2010 ; Saint-Aubert *et al.*, 2017). Enfin, il est intéressant de noter qu'une étude récente a mis en évidence que la TEP pourrait aussi permettre de mesurer une réduction de la densité synaptique (Chen *et al.*, 2018).

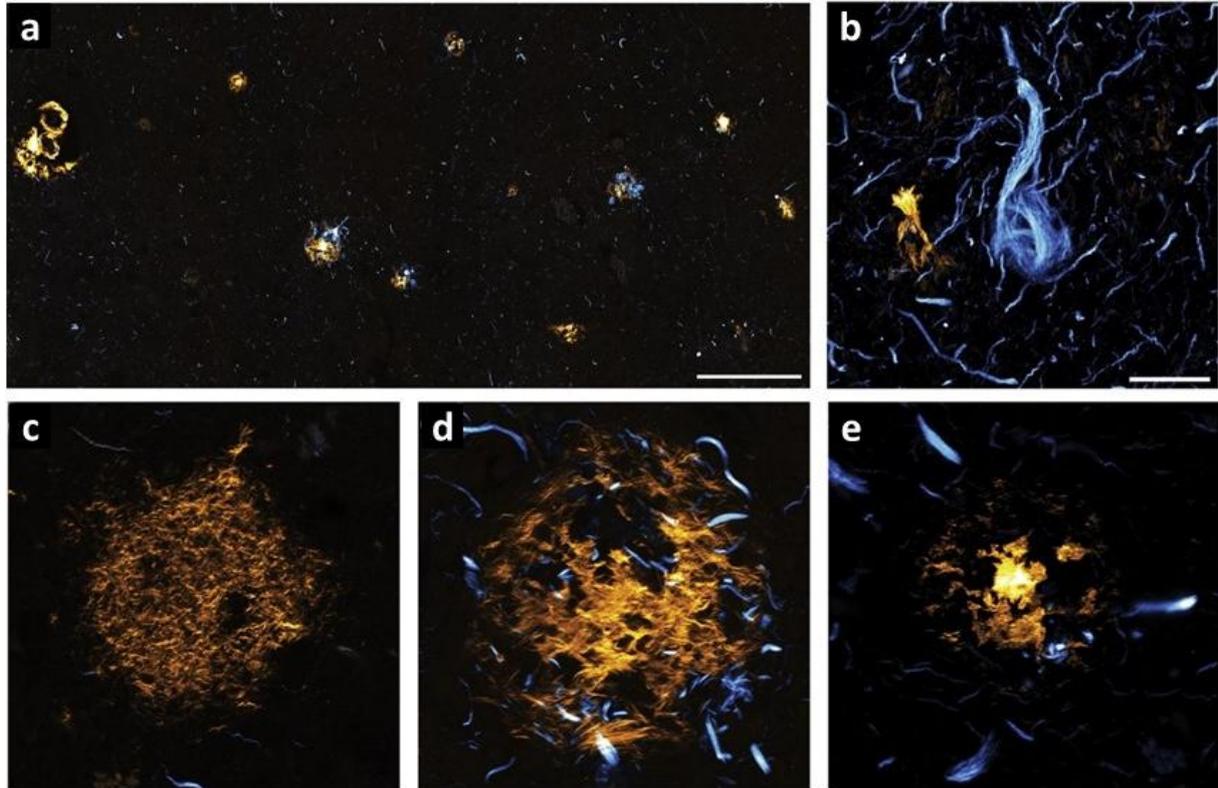


**Figure 8 : Consommation du glucose dans le cerveau d'une personne saine et d'un patient atteint de la MA (AD).** Analyse cérébrale par  $^{18}\text{F}$ -fluorodeoxyglucose PET montrant l'hypométabolisme du glucose dans certaines régions cérébrales du patient atteint de la MA (AD). (D'après Boxer *et al.*, 2007)



## 5. Les lésions histopathologiques de la maladie d'Alzheimer

Comme décrit précédemment, la MA est caractérisée par la présence de deux types de lésions histopathologiques que nous allons étudier en détail dans cette section : il s'agit des plaques amyloïdes et de la dégénérescence neurofibrillaire (*Figure 9*).

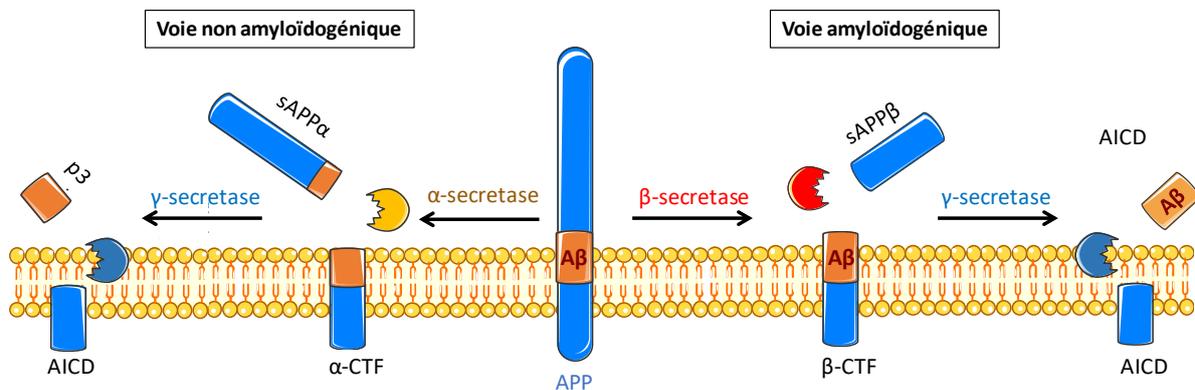


**Figure 9 : Les lésions histopathologiques de la MA : la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques amyloïdes.** (a) Marquage du peptide amyloïde  $\beta$  (orange) et des inclusions de tau (bleu) observé dans des coupes de cortex frontal de patients atteints de la MA. Echelle = 150  $\mu\text{m}$ . (b-e) Observations au microscope confocal de la dégénérescence neurofibrillaire composée de protéines tau (b) et des dépôts amyloïdes sous ses différents aspects : diffus (c), filamentaire (d) et en cœur dense (e). On constate qu'en adoptant une morphologie diffuse ou filamentaire, les plaques amyloïdes sont souvent associées à des agrégats de tau. Echelle = 10  $\mu\text{m}$ . (D'après Condello & Stöehr, 2016).

### 5.1. Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes correspondent à des petites sphères extracellulaires situées près des neurones et dont la formation est due à l'accumulation de peptides amyloïdes  $\beta$  ( $A\beta$ ). Ces plaques peuvent adopter trois morphologies différentes : diffuse, filamentaire ou en cœur dense (*Figure 9*). Le peptide  $A\beta$  résulte d'une série de clivages protéolytiques de son précurseur : l'APP (Amyloid  $\beta$  Precursor Protein). Ce clivage est réalisé successivement par l'enzyme  $\beta$ -sécrétase dont fait partie BACE 1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) puis par la  $\gamma$ -sécrétase. Cette dernière correspond à un

complexe multi-protéique composé au minimum de 4 protéines : les présénilines 1 ou 2 (PS1 et PS2), la nicastrine, Aph-1 (anterior pharynx defective) et Pen-2 (presenilin enhancer) (Edbauer *et al.*, 2003 ; Kimberly *et al.*, 2003 ; Takasugi *et al.*, 2003 ; De Strooper and Annaert, 2010). Suite à cette endoprotéolyse, plusieurs fragments amyloïdes peuvent être générés : les formes solubles de l'APP et les fragments carboxy-terminaux tels que le fragment AICD (Amyloid precursor protein intracellular domain) et les peptides A $\beta$  (Goodger *et al.*, 2009 ; Belyaev *et al.*, 2010 ; Flammang *et al.*, 2012) (Figure 10). Il existe de nombreuses formes de peptides A $\beta$  qui diffèrent selon la taille du fragment généré qui peut ainsi posséder 34 à 50 acides aminés. Des études semblent mettre en évidence que le variant A $\beta$ 42 correspondrait à la forme la plus toxique, toutefois, la forme sous laquelle ce variant confère davantage sa toxicité reste encore à établir clairement (Dahlgren *et al.*, 2002 ; Shankar *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2011 ; Mucke and Selkoe, 2012 ; Walsh *et al.*, 2002). De même, bien que certaines études se soient intéressées aux fonctions que peuvent avoir l'APP et ses fragments, leur rôle exact reste encore à établir.



**Figure 10 : Les voies régulant le métabolisme de l'APP.** Le métabolisme de l'APP peut se faire selon deux voies : la voie non amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique. Dans la voie non amyloïdogénique, l'APP est d'abord clivée par l' $\alpha$ -sécrétase au niveau de la séquence A $\beta$  ce qui génère un fragment d'APP $\alpha$  soluble (sAPP $\alpha$ ) et un fragment  $\alpha$ -CTF (fragment carboxyterminal transmembranaire). Puis, la  $\gamma$ -sécrétase clive ce dernier et libère ainsi un fragment p3 et un AICD (domaine intracellulaire de l'APP). En revanche, dans la voie amyloïdogénique, l'APP est d'abord clivé par une  $\beta$ -sécrétase libérant ainsi un fragment soluble APP $\beta$  et le  $\beta$ -CTF. Ce dernier est ensuite clivé par la  $\gamma$ -sécrétase générant ainsi le peptide A $\beta$  et l'AICD. (D'après Evrard *et al.*, 2018).

Comme vu précédemment, les mutations des gènes codant pour l'APP, la PS1 et la PS2 sont associées aux formes familiales de la MA montrant ainsi le lien entre ce peptide et le développement de cette pathologie (Goate *et al.*, 1991 ; Schellenberg *et al.*, 1992 ; Sherrington *et al.*, 1995). Toutefois, il a été mis en évidence que l'accumulation des plaques amyloïdes n'est pas observée uniquement dans la MA puisqu'on retrouve aussi des dépôts de peptides A $\beta$  dans le cerveau de personnes âgées ne présentant aucune démence. Ces données laissent ainsi suggérer que la présence de ces plaques ne serait pas nécessairement toxique et ne conduirait pas obligatoirement à une neurodégénérescence. Néanmoins, d'autres études suggèrent que ces plaques pourraient en réalité correspondre à des formes

dites "préamyloïde" qui par la suite aboutiraient à la formation des plaques séniles (Iwatsubo *et al.*, 1995).

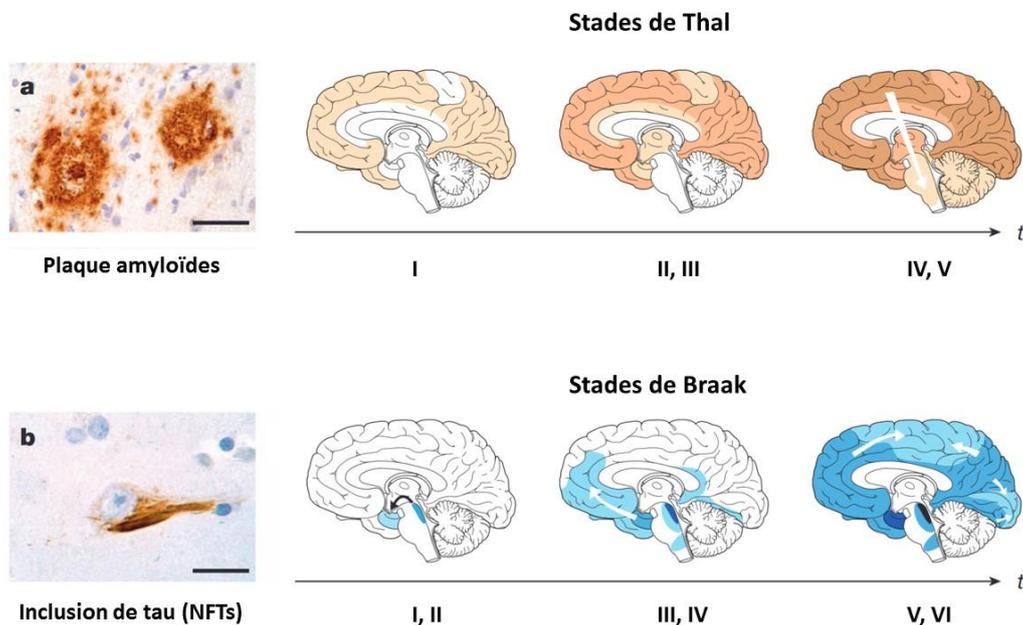
## 5.2. La dégénérescence neurofibrillaire

La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) correspond à la deuxième lésion histopathologique caractéristique de la MA. Elle résulte de l'accumulation et de l'agrégation intra-neuronale de protéines tau hyperphosphorylées (Brion *et al.*, 1985 ; Grundke-Iqbal *et al.*, 1986 ; Delacourte and Defossez, 1986). Cette agrégation résulte de l'appariement des protéines tau sous un aspect filamentaire hélicoïdal qui forment alors des enchevêtrements neurofibrillaires nommés NFTs (Neurofibrillary tangles) (Kidd, 1963) (*Figure 9*). D'un point de vue cytologique, il existe trois stades caractérisant les aspects que prennent la DNF au cours de la MA : un stade précoce de « pre-tangle », un stade intermédiaire « intra-tangle » et un stade final de « ghost tangle » (Augustinack *et al.*, 2002). Les aspects structurels et fonctionnels de la protéine tau seront décrits dans la *partie 1 du chapitre 2*.

## 5.3. La progression des lésions

L'analyse post-mortem de cerveaux de patients décédés à différents stades de la MA a permis de mettre en évidence que la propagation des deux lésions de la MA suit un cheminement différent. En effet, il a été démontré que la propagation de la DNF suit une progression spatio-temporelle bien précise qui peut être subdivisée en 6 stades : il s'agit des stades de Braak (Braak and Braak, 1991 ; Delacourte *et al.*, 1999 ; Duyckaerts *et al.*, 1999). Lors de la MA, la pathologie tau apparaît dans un premier temps au niveau du cortex entorhinal (Braak I) puis se propage dans la région CA1 de l'hippocampe (Braak II), le système limbique (Braak III), l'amygdale, le thalamus et le claustrum (Braak IV), les aires isocorticales (Braak) pour au final atteindre les aires sensori-motrice et visuelles (Braak VI) (Braak and Braak, 1991) (*Figure 11*). Il a été établi que cette progression est corrélée à la sévérité des altérations cognitives. En effet, les connexions neuronales reliant le cortex entorhinal à l'hippocampe sont les premières à disparaître lors des premières phases de la maladie. Cette perte neuronale localisée engendre alors un phénomène de déconnection de l'hippocampe qui est à l'origine de l'apparition des troubles de la mémoire (Arriagada *et al.*, 1992). Puis par la suite, la perte neuronale se propage progressivement à travers l'ensemble des régions cérébrales également atteintes par les DNFs. A l'inverse, l'apparition des dépôts amyloïdes ne corrèle pas avec les altérations cognitives et n'est pas associée aux stades de Braak (Jucker and Walker, 2013; Duyckaerts *et al.*, 1997). Toutefois, la pathologie amyloïde suit également une progression hiérarchique organisée en stades nommés stades de Thal (Thal *et al.*, 2002) (*Figure 12*). Par ailleurs, il est intéressant de noter que la progression

de cette lésion est associée à une augmentation des concentrations en peptides A $\beta$  solubles ainsi qu'à une accumulation des agrégats insolubles (Thal *et al.*, 2015).



**Figure 11 : Evolution spatio-temporelle des pathologies amyloïde et tau.** (a) Plaques amyloïdes (A $\beta$ ) observées dans le néocortex d'un patient atteint de la MA. L'apparition des dépôts amyloïdes suit une hiérarchie organisée selon les stades de Thal. Echelle = 50  $\mu$ m. Ces dépôts surviennent tout d'abord dans le néocortex (frontal, pariétal, temporal et occipital) (**stade I**) puis se propagent au niveau des cortex entorhinal et insulaire et de la CA1 (**stade II**) et atteignent ensuite les régions subcorticales dont notamment le noyau caudé, le putamen, le thalamus ou encore l'hypothalamus (**stade III**). Par la suite, ces dépôts s'étendent jusqu'aux noyaux du tronc cérébral tels que le noyau de l'olive inférieure, les noyaux rouges, la formation réticulée, la substance noire et les colliculus inférieurs et supérieurs (**stade IV**) pour au final atteindre le cervelet ainsi que d'autres noyaux (noyau du Raphé, noyau tegmental dorsal, noyau parabrachial). (b) Enchevêtrements neurofibrillaires composés de protéines tau (NFTs) observés dans un neurone du néocortex de patient atteint de la MA. Echelle = 20  $\mu$ m. La propagation des inclusions de tau suit également une évolution spatio-temporelle correspondant aux stades de Braak : lors des **stades I et II**, les inclusions de tau sont localisées dans le cortex entorhinal puis elles se propagent dans l'hippocampe lors des **stades III et IV**. Les **stades V et VI** sont quant à eux marqués par des inclusions de tau au niveau des aires isocorticales. (D'après Jucker & Walker, 2013).

#### 5.4. Lien entre la pathologie amyloïde et la pathologie tau

De nombreuses études se sont intéressées à déterminer s'il existait un lien entre la pathologie amyloïde et la pathologie tau. En 2001, une première étude a permis de suggérer que la toxicité induite par le peptide amyloïde pouvait avoir une influence sur la protéine tau. En effet, les travaux de Gotz *et al.*, ont permis de mettre en évidence que des injections intracérébrales de fibrilles de peptides A $\beta$  dans un modèle murin transgénique de la pathologie tau, provoquent une augmentation des enchevêtrements neurofibrillaires (NFTs) laissant ainsi suggérer que la pathologie amyloïde peut

accélérer la formation des NFTs (Götz *et al.*, 2001). De plus, des études effectuées sur un modèle murin double transgénique pour les pathologie tau et amyloïde, montrent que les niveaux élevés de peptides A $\beta$ , résultant de la surexpression de l'APP, induisent une apparition plus précoce de la pathologie tau comparée à celle observée dans le modèle murin transgénique pour la pathologie tau uniquement (Lewis *et al.*, 2001 ; Pérez *et al.*, 2005). De plus, d'autres études ont par la suite, également permis de confirmer l'impact de la pathologie amyloïde sur le développement de la pathologie tau (Bloom, 2014 ; Pooler *et al.*, 2015). Une réduction du niveau de phosphorylation de la protéine tau a également été observée dans un modèle triple transgénique exprimant à la fois des formes mutées de tau, d'APP et de PS1 et immunisé avec des anticorps dirigés contre l'A $\beta$  (Oddo *et al.*, 2004). Enfin, d'autres études laissent suggérer que les peptides A $\beta$  seraient capables de favoriser le développement de la pathologie tau, d'une part en facilitant son agrégation sous forme de PHFs (Vasconcelos *et al.*, 2016) et, d'autre part, en créant un environnement propice à son agrégation (He *et al.*, 2018). A l'inverse, la protéine tau pourrait également influencer les effets toxiques induits par le peptide A $\beta$  (Mairet-Coello *et al.*, 2013 ; Rapoport *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces résultats laissent donc suggérer qu'il existe bien un lien entre la pathologie tau et la pathologie amyloïde et laissent notamment sous-entendre que ces deux lésions agiraient en synergie afin de promouvoir, voire même d'amplifier chacune, la toxicité de l'autre (Ittner and Götz, 2011 ; Pascoal *et al.*, 2017).

## 6. Stratégies thérapeutiques de la MA

### 6.1. Les stratégies actuelles

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif pour la MA. En effet, seuls des traitements symptomatiques ont pu être développés et sont regroupés en deux classes : les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (IACHÉ) et l'antagoniste des récepteurs au NMDA.

Des études datant de 1983 ont permis de mettre en évidence que les neurones dits cholinergiques sont particulièrement affectés au cours de la MA et que leur perte est corrélée aux altérations cognitives des patients atteints de la MA (Coyle, Price and DeLong, 1983). En effet, on observe chez ces patients une réduction importante de la production du neurotransmetteur acétylcholine (Ach) qui est connu pour jouer un rôle important dans les processus de mémoire (Davis *et al.*, 1999). C'est pourquoi des inhibiteurs de l'enzyme responsable de la dégradation de l'Ach, l'acétylcholinestérase, ont été mis au point dans un cadre thérapeutique. A l'heure actuelle, il en existe 4 : la Tacrine, le Donépézil, la Rivastigmine et la Galantamine et sont tous indiqués dans les stades

précoces et modérés de la MA. Toutefois, ces traitements ne permettent pas de ralentir la progression des démences et deviennent inefficaces lorsque la neurodégénérescence atteint un stade.

En parallèle de ces inhibiteurs, un antagoniste non compétitif des récepteurs aux NMDA (NMDAR) a également été développé : il s'agit de la Mémantine (Bachurin *et al.*, 2017). *Comme nous le verrons dans la partie 2 du chapitre 2*, les NMDAR sont des récepteurs au glutamate qui jouent un rôle crucial dans la formation de la mémoire et plus précisément dans la plasticité synaptique (Danysz and Parsons, 2003). Or, au cours de la MA, ces récepteurs subissent une stimulation excessive, induisant un phénomène d'excitotoxicité. L'utilisation de la Mémantine permet ainsi de réduire la toxicité induite par ces récepteurs empêchant temporairement les altérations cognitives. Cet antagoniste est indiqué comme traitement pour les stades modérés et sévères de la MA. Toutefois, tout comme les IChE, la Mémantine ne permet pas de réduire la perte neuronale.

Ces deux catégories de médicaments, bien qu'ayant une efficacité moyenne sur la MA, restent à l'heure actuelle les deux seuls moyens permettant de réduire les symptômes de la MA. Cependant, en raison de leurs effets modérés, il est inquiétant de noter qu'aujourd'hui, en France, ces médicaments ne sont plus remboursés.

## 6.2. Les nouvelles stratégies thérapeutiques

Au vu de cette absence de traitement curatif pour la MA, il devient à l'heure actuelle, crucial d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces. Grâce à l'amélioration de la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la MA, de nouvelles approches sont en cours de développement et visent les lésions cérébrales à savoir : la pathologie amyloïde, la pathologie tau et la neurodégénérescence.

### 6.2.1. Les approches anti-amyloïdes

Les stratégies visant la pathologie amyloïde ont pour but de diminuer les peptides A $\beta$  en stimulant notamment leur clairance, mais aussi d'empêcher leur agrégation. Pour cela, différentes techniques sont en cours de développement dont la plus étudiée actuellement est l'immunothérapie (active ou passive) utilisant des anticorps dirigés contre les peptides A $\beta$  (Hempel *et al.*, 2015). Ces études ont notamment conduit certains traitements tels que le Solanezumab en phase III d'essai clinique (Hung and Fu, 2017 ; Bachurin *et al.*, 2017). Toutefois, bien que prometteuses à l'origine, aucune de ces immunothérapies n'a atteint le stade de prescription. Ces données laissent suggérer que

les stratégies visant uniquement les peptides A $\beta$  ne sont peut-être pas suffisantes ou alors effectuées à des stades trop tardifs de la maladie pour pouvoir induire un effet bénéfique sur la progression de la pathologie.

En plus de l'immunothérapie, les approches anti-amyloïdes ont également pour but de cibler les enzymes responsables de la production et de la dégradation des peptides A $\beta$ . Plusieurs molécules inhibitrices ont ainsi été mises au point dans le but d'inhiber la  $\gamma$ -sécrétase et BACE1 mais n'ont malheureusement pas abouti à des résultats concluants lors des essais cliniques (Cummings *et al.*, 2017 ; Carroll and Li, 2016).

### 6.2.2. *Les approches anti-tau*

Contrairement aux stratégies anti-amyloïdes, celles ayant pour but de cibler la protéine tau sont à l'heure actuelle moins avancées mais plus porteuses d'espoir. Ces approches ont pour but de réduire sa phosphorylation, et son agrégation et font intervenir l'utilisation d'inhibiteurs de kinases et d'agrégation, d'activateurs de phosphatase et plus récemment, l'immunothérapie (Pickhardt *et al.*, 2007 ; Melis *et al.*, 2015). Les approches thérapeutiques concernant la protéine tau ne seront pas détaillées dans ce paragraphe mais ont fait l'objet d'un paragraphe au sein de la revue suivante « Tau as a therapeutic target » que nous avons rédigé avec l'ensemble des doctorants et post-doctorants du laboratoire lors de la visite du Dr K. Iqbal (**Annexe 1**).

## Chapitre 2 : Tau, synapses et métabolisme énergétique neuronal, un lien dans la MA ?

Après avoir introduit des généralités sur la MA, ainsi que ses principales caractéristiques, nous allons maintenant nous intéresser à la protéine tau qui est, comme nous venons de le voir, la protéine impliquée dans la formation de la DNF. En plus de la pathologie tau, nous verrons également que la MA est aussi caractérisée par une perte des synapses et par des altérations précoces du métabolisme énergétique. Nous aborderons par conséquent chacun de ces points après les avoir introduit.

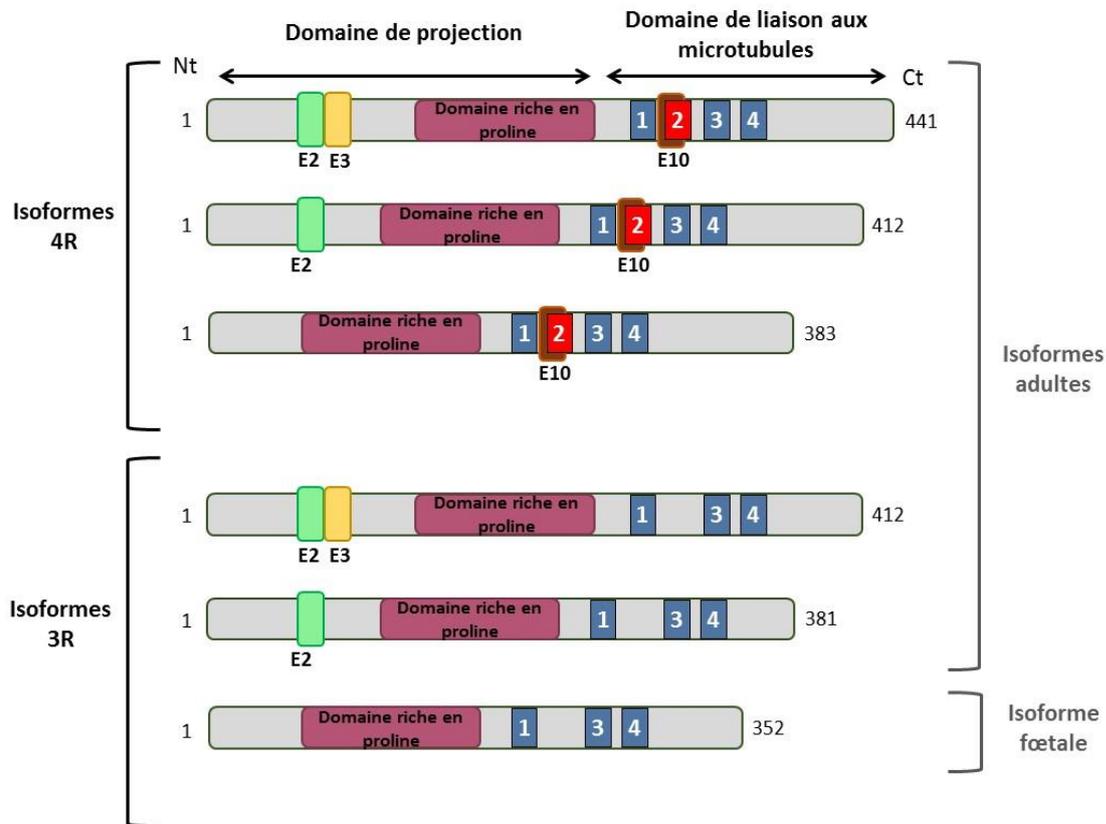
### 1. La protéine tau

#### 1.1. Généralités et structure

Tau est une protéine appartenant à la famille des protéines associées aux microtubules (MAPs) dont l'expression est majoritairement neuronale (Weingarten *et al.*, 1975 ; Witman *et al.*, 1976). Chez l'homme, cette protéine est codée par un gène unique nommé *MAPT* et localisé sur le chromosome 17 en position 17q21 (Andreadis *et al.*, 1995 ; Neve *et al.*, 1986). Après avoir subi un épissage alternatif des exons 2, 3 et 10, ce gène donne naissance à six isoformes dont l'expression varie au cours du développement neuronal (Goedert *et al.*, 1989 ; Buée *et al.*, 2000 ; Caillet-Boudin *et al.*, 2015). Chaque isoforme possède dans sa partie C-terminale un domaine de liaison aux microtubules (MBD, pour Microtubules Binding Domains). En fonction de l'épissage de l'exon 10, le domaine MBD sera constitué de trois (isoformes 3R) à quatre (isoformes 4R) motifs répétés (R1, R2, R3 et R4) pouvant interagir avec la tubuline qui compose les microtubules. De par son motif supplémentaire, l'isoforme 4R possède une affinité plus forte pour les microtubules (*Figure 12*). L'isoforme 3R est la seule à être retrouvée dans le cerveau fœtal contrairement au cerveau adulte qui possède toutes les isoformes de tau avec un ratio 3R/4R proche de 1 (Noble *et al.*, 2013). Toutefois, ce ratio peut être altéré dans certaines pathologies caractérisées par la présence de dépôts intra-neuronaux de protéines tau et regroupées sous le terme de Tauopathies. En effet, alors que seule la maladie de Pick est caractérisée principalement par la présence d'agrégats des isoformes de tau 3R, la dégénérescence corticobasale, la démence fronto-temporale associée à une mutation sur le chromosome 17 (FTDP-17) et la maladie des grains argyrophiles présentent quant à elles essentiellement des agrégats des isoformes tau 4R (Sergeant, Delacourte and Buée, 2005). En plus de son domaine de liaison aux MTs, la protéine tau possède également dans sa partie N-terminale un domaine de projection de taille variable en fonction de l'inclusion ou non des exons 2 et 3. Ce domaine est composé d'une région acide qui est suivie d'une région riche en proline où sont situés de nombreux sites de phosphorylation et par laquelle la protéine



tau peut se lier aux domaines SH3 (Src Homology 3) de diverses protéines (Lee et al., 1998) (Figure 12).



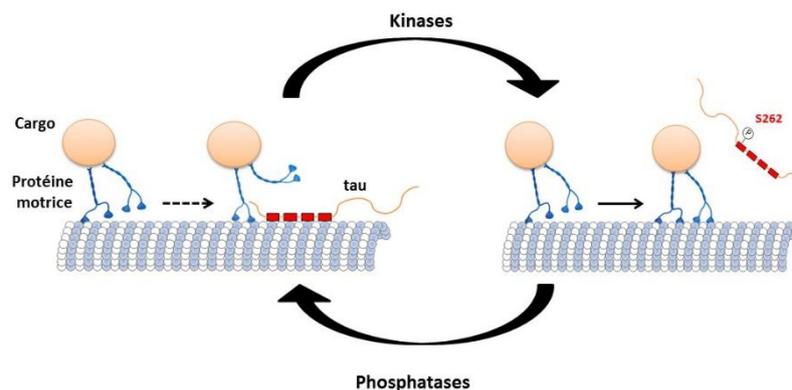
**Figure 12 : Structure des différentes isoformes de la protéine tau présentes dans le cerveau humain.** Le gène codant pour la protéine tau humaine, *MAPT*, contient 16 exons dont 3 subissent un épissage alternatif : l'exon E2, E3 et E10. Selon leur épissage, le gène *MAPT* peut générer 6 isoformes différentes. Celles possédant l'exon 10 présentent un motif de liaison aux MTs supplémentaire (*rouge*), ce sont les isoformes 4R (2-3-10+ ou 0N4R ; 2+3-10+ ou 1N4R ; 2+3+10+ ou 2N4R). A l'inverse, l'épissage de l'exon 10 provoque la perte de ce 4<sup>ème</sup> motif, et forme ce qu'on appelle les isoformes 3R (2-3-10- ou 0N3R ; 2+3-10- ou 1N3R ; 2+3+10- ou 2N3R). Chez le fœtus, une seule isoforme est retrouvée, la 0N3R alors qu'à l'âge adulte, l'homme possède les 6 isoformes. La protéine tau présente également un domaine de projection contenant un domaine riche en proline et impliqué dans l'interaction de tau avec ses partenaires.

## 1.2. Fonctions principales de la protéine tau

La protéine tau a été décrite pour la première fois en 1975 comme étant une protéine favorisant la polymérisation de la tubuline (Weingarten *et al.*, 1975 ; Cleveland, Hwo and Kirschner, 1977). Toutefois, il faut attendre la fin des années 1980 pour que des études montrent que la protéine tau interagit directement avec les MTs par l'intermédiaire de ses domaines MBD (Drubin and Kirschner, 1986 ; Himmler *et al.*, 1989). La principale fonction de tau est de réguler la dynamique et la stabilisation des MTs. Il est intéressant de noter que la présence du quatrième motif de liaison (isoforme 4R) joue un rôle important puisqu'en plus d'augmenter l'affinité de tau pour les MTs, il

permet également d'augmenter la vitesse de polymérisation et de stabilisation de ceux-ci (Goedert and Jakes, 1990 ; Butner and Kirschner, 1991). Par ailleurs, des études ont permis de mettre en évidence que l'affinité de la protéine tau pour les MTs est aussi dépendante de son état de phosphorylation. Cette régulation fait notamment intervenir la phosphorylation de deux épitopes localisés au niveau du domaine de liaison aux MTs et ayant été montrés pour jouer un rôle majeur dans la liaison de tau avec les MTs : il s'agit des sérines 262 et 356. En effet, lorsque tau est phosphorylée sur ces deux sites, cela entraîne son détachement des MTs et par conséquent, la déstabilisation du réseau microtubulaire (Fischer *et al.*, 2009 ; Biernat *et al.*, 1993). A l'inverse, sous sa forme non phosphorylée, la protéine tau peut se lier aux MTs et induire leur polymérisation (Lindwall and Cole, 1984 ; Alonso *et al.*, 1994). En plus de se lier aux MTs, la protéine tau peut également réguler l'espacement entre ceux-ci via sa partie N-terminale qui est capable d'interagir avec les membranes cellulaires (Chen *et al.*, 1992).

De par sa fonction stabilisatrice des MTs, la protéine tau joue un rôle critique dans la régulation du transport axonal dépendant des MTs (Dixit *et al.*, 2008) (*Figure 13*). Le neurone est une cellule polarisée, qui possède un compartiment somato-dendritique très éloigné du compartiment synaptique. De ce fait, un transport axonal efficace est nécessaire pour permettre l'acheminement des composants neuronaux (organites, neurotransmetteurs, mitochondries, etc) entre ces deux compartiments et ainsi assurer le fonctionnement physiologique neuronal. Ce transport fait intervenir deux types de moteurs moléculaires : la kinésine pour le transport antérograde et la dynéine pour le transport rétrograde (Filliatreau, 1988). Des études montrent que la protéine tau pourrait agir sur la kinésine et induire une réduction de sa vitesse de déplacement ainsi que sa liaison avec les MTs (Dixit *et al.*, 2008).

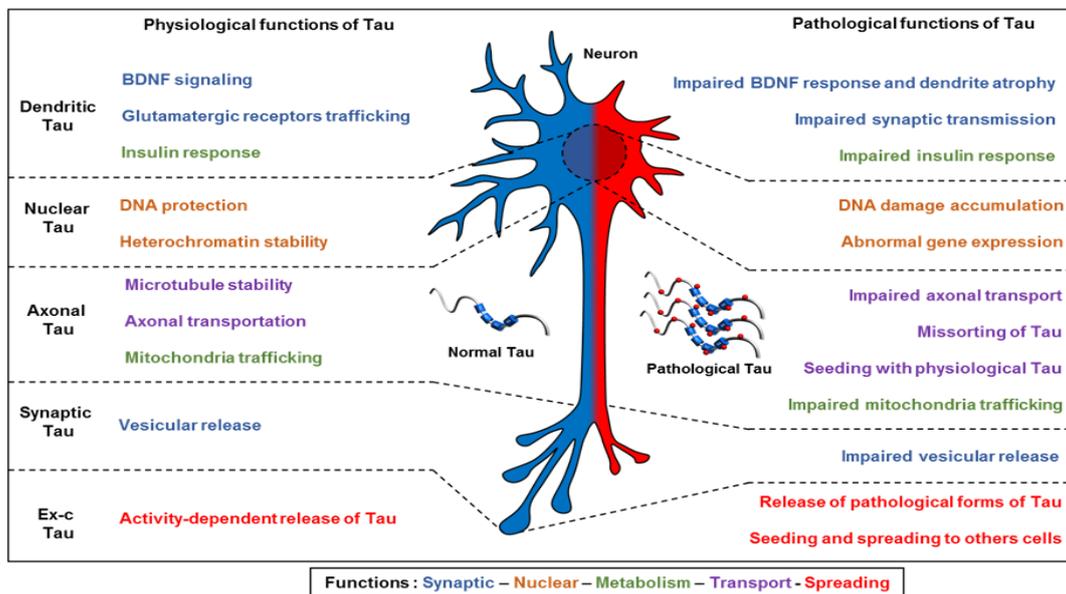


**Figure 13 : Schéma simplifié montrant l'implication de la protéine tau dans le transport axonal.**

Lorsque tau est phosphorylée en sérine 262, elle subit un changement conformationnel qui provoque son détachement des MTs. A l'inverse, une fois déphosphorylée, elle peut à nouveau interagir avec eux. Ce processus est très dynamique et permet ainsi un transport axonal efficace tout en maintenant la régulation de la dynamique microtubulaire. De même, tau peut agir sur la protéine motrice kinésine afin de diminuer sa vitesse de déplacement et sa liaison aux MTs.

Enfin, étant donné que la protéine tau interagit avec les MTs mais aussi avec d'autres protéines, il est possible de se demander comment tau régule la dynamique microtubulaire tout en conservant sa capacité d'interagir avec ses autres partenaires mais aussi comment tau régule cette dynamique sans perturber le transport axonal. En utilisant des techniques d'imagerie, le groupe de *Janning et al.* a répondu à ces questions et a permis de mettre en évidence que la protéine tau interagit avec les MTs selon un mécanisme nommé « Kiss & Hop ». Ce dernier consiste en une interaction très brève d'environ 40 ms de la protéine tau avec un MT avant d'interagir avec le suivant. Ce mécanisme permet ainsi d'expliquer comment la protéine tau régule la dynamique microtubulaire sans perturber le transport axonal (*Janning et al., 2014*).

Nous venons de voir que dans des conditions physiologiques, la protéine tau arbore une localisation neuronale principalement axonale au sein de laquelle elle joue un rôle essentiel dans la régulation de la dynamique des MTs (Dotti, Sullivan and Banker, 1988 ; Wang and Mandelkow, 2016 ; Binder et al, 1985). Toutefois, des études montrent que la protéine tau est aussi retrouvée dans le compartiment somato-dendritique notamment au niveau du noyau, de la membrane cytoplasmique, des mitochondries, du cytosquelette et des synapses (Tashiro *et al.*, 1997). Au vu des différentes localisations que peut avoir la protéine tau, il n'est pas surprenant que celle-ci puisse avoir des rôles très variés au sein du neurone (*Figure 14*). Dans le cadre de cette introduction, nous ne détaillerons pas les autres fonctions de tau. Néanmoins, l'ensemble de ces fonctions est présenté en *Annexe 1*.



**Figure 14 : Les fonctions de la protéine tau en fonction de sa localisation.** En plus de sa fonction dans la stabilisation des MTs, la protéine tau est également impliquée dans la stabilité nucléaire, la transmission synaptique ou encore le trafic mitochondrial. Dans des conditions pathologiques, la protéine peut cependant perdre ses fonctions physiologiques et à l'inverse développer des fonctions pathologiques.

### 1.3. La phosphorylation : la principale modification post-traductionnelle de tau

La protéine tau est soumise à de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPTs) qui permettent de réguler ses fonctions telles que l'acétylation, la glycosylation (N-glycosylation et O-glycosylation), la glycation, la deamidation, l'isomérisation, l'ubiquitination, la sumoylation et la méthylation (Guo, Noble and Hanger, 2017). Toutefois, parmi toutes ces MPTs, la principale et la plus étudiée est la phosphorylation. En effet, tau possède 85 sites potentiels de phosphorylation dont la majorité se situe au niveau des domaines riches en proline qui bordent les domaines de liaison aux microtubules (Sergeant *et al.*, 2008 ; Stoothoff and Johnson, 2005). Certains de ces épitopes tels que les résidus Ser262/356, jouent un rôle prépondérant dans l'affinité de la protéine Tau pour les microtubules comme décrit précédemment (Fischer *et al.*, 2009). De ce fait, son état de phosphorylation nécessite d'être finement régulé et fait intervenir de nombreuses kinases et phosphatases.

#### 1.3.1. Les kinases de tau

Il existe de nombreuses kinases capables de phosphoryler la protéine tau. Ces kinases ont été regroupées en trois catégories : les protéines kinases ciblant les résidus sérines et thréonines suivis d'un résidu proline ou PDPK (proline-directed serine/threonine-protein kinases), les protéines kinases ciblant les résidus sérines et thréonines non suivis d'une proline ou non PDPK, et les tyrosines kinases. Au sein du groupes des PDPK, on trouve notamment GSK3 $\alpha$  et  $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\alpha$  and  $\beta$ ), Cdk5 (Cyclin-dependent kinase 5) et les MAPK (mitogen-activated protein kinases). Le groupe des non PDPK est quant à lui composé de la CaMKII (calcium- and calmodulin- dependent protein kinase II), des MARKs (microtubule affinity-regulating kinases) et des kinases PKA, PKB et PKC. Enfin, les kinases Src, Fyn, c-Ab1 (abelson-1) et Syk qui appartiennent à la famille des Src kinases font partie des enzymes responsables de la phosphorylation des tyrosines (Guo, Noble and Hanger, 2017 ; Buée et al., 2000).

#### 1.3.2. Les phosphatases de tau

La régulation de l'activité et des fonctions de la protéine tau dépend également de sa déphosphorylation. Ce processus se fait via l'intervention de différentes phosphatases dont la principale est PP2A (protein phosphatase-2A) qui représente également la phosphatase majoritaire au niveau cérébral (Noble *et al.*, 2013 ; Goedert *et al.*, 1995). En plus de PP2A, il a été mis en évidence que les phosphatases PP1, PP2B, et PP5 sont aussi capables de réguler l'état de phosphorylation de la protéine tau (Liu *et al.*, 2005).

Il est intéressant de noter qu'au cours de la MA a lieu un déséquilibre de l'activité de ces kinases et/ou phosphatases qui est en partie à l'origine de l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. Des études ont notamment permis de démontrer que le niveau de la kinase GSK3 $\beta$  est augmenté dans les neurones en dégénérescence et que son activité corrèle avec l'augmentation des NFTs (Leroy *et al.*, 2002)(Pei *et al.*,1997). A l'inverse, l'activité de PP2A a été montrée pour être diminuée de moitié dans le cerveau des patients atteints de la MA. De même, il a également été montré que l'activité de PP5 est diminuée de 20 % dans MA, laissant ainsi suggérer que la dérégulation de l'activité des phosphatases de tau pourrait également participer à l'hyperphosphorylation de cette protéine et par conséquent à la pathologie tau (Liu *et al.*, 2005). Ces données montrent donc que la régulation du niveau de phosphorylation de la protéine tau joue un rôle essentiel dans le développement de la pathologie tau qui se met en place au cours de la MA.

Comme décrit précédemment, en plus de la pathologie tau, la MA est également caractérisée par une perte synaptique précoce qui aboutit à des troubles de la mémoire. Nous allons donc maintenant nous intéresser à cette deuxième caractéristique qui se développe précocement lors de la MA. Toutefois, avant d'étudier les mécanismes impliqués dans cette perte synaptique, il est tout d'abord nécessaire d'introduire les voies moléculaires à l'origine de la formation de cette mémoire.

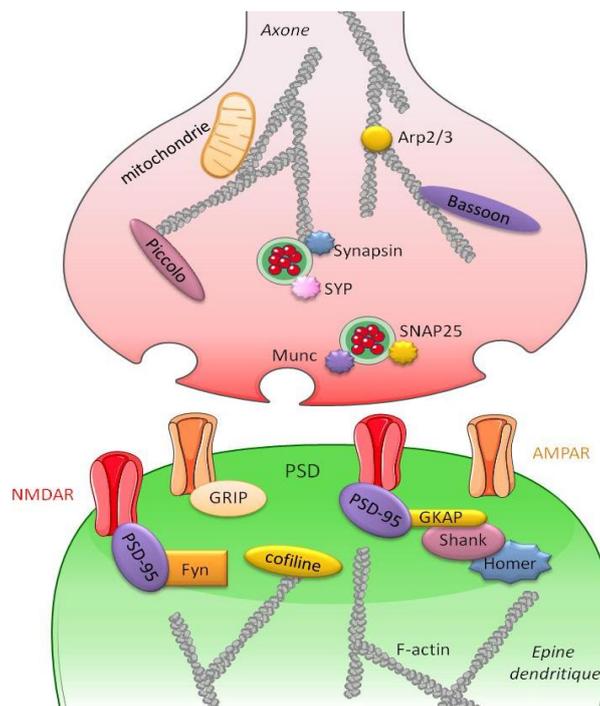
## **2. L'intégrité synaptique : un mécanisme fortement altéré au cours de la MA**

### **2.1. Généralités**

La mémoire correspond à la capacité qu'a le cerveau d'encoder, de stocker et de restituer une information provenant de notre expérience personnelle et de notre environnement extérieur. Il existe deux grands types de mémoire : (1) la mémoire à court terme (MCT) également appelée la mémoire de travail, qui permet de mémoriser une certaine quantité d'informations durant quelques secondes à quelques minutes et (2) la mémoire à long terme (MLT) qui assure un stockage durable des informations allant d'une semaine à plusieurs années. La MLT se catégorise en différents types : la mémoire épisodique (qui permet de mémoriser nos souvenirs et d'anticiper nos actions futures), la mémoire sémantique (qui correspond à la mémoire du savoir et de la connaissance), la mémoire procédurale (à la base de nos habiletés motrices, il s'agit de la mémoire des automatismes) et la mémoire perceptive (qui assure le stockage des informations en rapport avec nos sens tel que la mémorisation d'un visage, d'un son). D'un point de vue cellulaire, la MLT nécessite une synthèse protéique rapide passant par la voie *de novo* ainsi qu'une synthèse protéique passant par les étapes de

transcription d'ARNm et de traduction. La MLT repose également sur des modifications morphologiques des synapses, sur la création de nouvelles connexions synaptiques mais aussi sur le renforcement de l'efficacité d'un réseau neuronal pour transmettre des informations suite à une stimulation neuronale. C'est l'ensemble de ce processus que l'on appelle la plasticité synaptique.

Les synapses correspondent aux zones de communication qui existent entre la partie pré-synaptique (bouton axonal) d'un neurone émetteur et la partie post-synaptique (les épines dendritiques en général) d'un neurone récepteur (*Figure 15*). Dans le système nerveux central, il existe deux types de synapses : les synapses électriques qui sont largement minoritaires et qui transmettent leurs informations au moyen d'échange d'ions et les synapses chimiques. Afin de communiquer, les synapses chimiques libèrent quant à elles, des neurotransmetteurs dans une zone qui relie les extrémités pré- et post-synaptiques des neurones et que l'on nomme la fente synaptique. Il existe deux types de neurotransmetteurs, ceux excitateurs tels que le glutamate et le NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique) et les inhibiteurs comme le GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) qui sont libérés par des neurones excitateurs et inhibiteurs, réciproquement. Les neurones excitateurs sont particulièrement abondants au sein de l'hippocampe et du cortex.



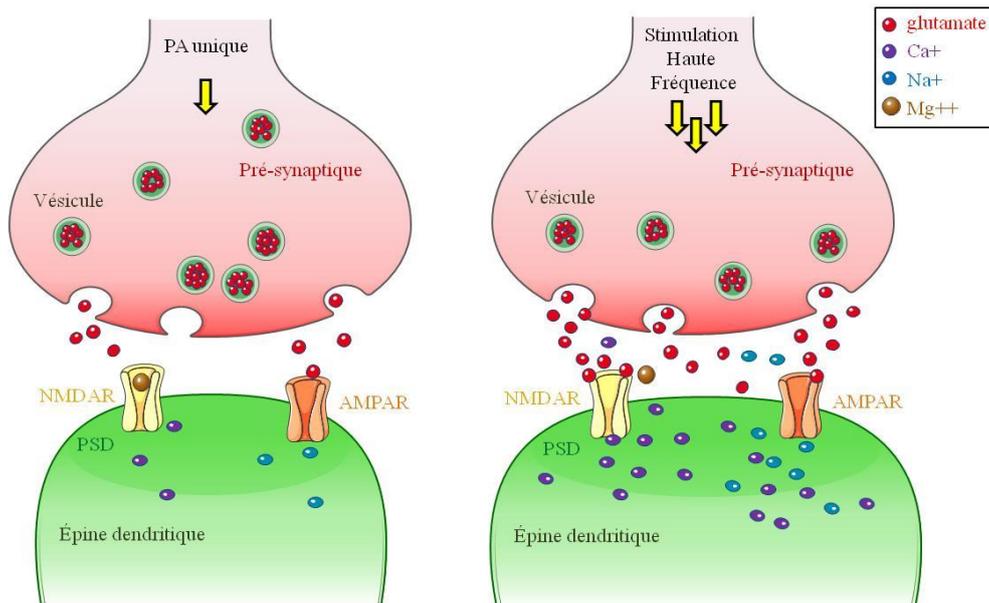
**Figure 15 : Représentation schématique de la structure d'une synapse.** Schéma simplifié montrant l'organisation structurale du compartiment pré-synaptique (rose) et post-synaptique (vert). La zone verte correspond à la densité post-synaptique (PSD). La partie pré-synaptique contient de nombreuses protéines associées aux vésicules pré-synaptiques et impliquées dans les mécanismes d'exocytose. On peut notamment citer les protéines [SNAP25](#), [Munc](#), [synaptophysine \(SYP\)](#) et [synapsine](#). Le compartiment post-synaptique possède quant à lui les récepteurs au NMDA ([NMDAR](#)) et AMPA ([AMPA](#)) ainsi que des protéines d'échaffaudage telles que la protéine [PSD-95](#) et [Homer](#). Ces protéines seront à nouveau abordées dans le chapitre 2 de la partie résultats.

## 2.2. La plasticité synaptique

Comme dit précédemment, la formation de la mémoire est dépendante de la plasticité synaptique (Morris, 1999) et fait intervenir un processus nommé la transmission glutamatergique. La transmission glutamatergique correspond au relargage du neurotransmetteur glutamate depuis le compartiment pré-synaptique où il est contenu dans les vésicules, vers la fente synaptique. Une fois libéré, le glutamate se lie à des récepteurs localisés sur la membrane post-synaptique, et plus précisément sur la densité post-synaptique (PSD). Cette dernière correspond à une zone dense aux électrons lorsqu'elle est observée au microscope électronique, riche en protéines et en lipides et qui possède de nombreux récepteurs. Hormis les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGlu), il existe trois récepteurs ionotropiques sur lesquels peut se lier le glutamate : les récepteurs au kaïnate, au NMDA et AMPA. Etant donné que seuls les deux derniers sont impliqués dans la plasticité synaptique, nous nous intéresserons uniquement à la description des récepteurs NMDA et AMPA.

### 2.2.1. Les récepteurs AMPA et NMDA

Comme leurs noms l'indiquent, les récepteurs AMPA et au NMDA sont respectivement activés par l'acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique et le N-méthyl-D-Aspartate. Les récepteurs AMPA sont des hétérotétramères composés des sous-unités GluA1, GluA2, GluA3 et GluA4 dont l'arrangement conformationnel permet la formation d'un pore perméable aux ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ . Ils assurent ainsi la propagation de l'influx nerveux d'un neurone à l'autre lors d'une activation synaptique. La régulation du nombre de récepteur AMPA au niveau des PSD dépend d'un mécanisme très dynamique qui repose sur un cycle d'endocytose et d'exocytose (Camilli, 2001). Ce mécanisme joue un rôle essentiel dans la plasticité synaptique puisque lors d'une activation neuronale, on assiste à une augmentation de l'exocytose des récepteurs AMPA vers la membrane post-synaptique. A l'inverse, en situation de dépression neuronale, ces récepteurs sont endocytés afin de réduire leur nombre à la PSD (Kessels and Malinow, 2009). De plus, il a également été mis en évidence que les récepteurs NMDA peuvent moduler le nombre des récepteurs AMPA lors de l'activation synaptique (Shi *et al.*, 1999 ; Lu *et al.*, 2001).



**Figure 16: Schéma montrant les principaux mécanismes impliqués dans la transmission glutamatergique.** Lors d'une stimulation unique (*gauche*), le canal des NMDARs est bloqué par un ion magnésium, empêchant alors l'influx ionique à travers ce récepteur. Toutefois, les AMPARs peuvent induire un influx sodique permettant une dépolérisation de la membrane post-synaptique et l'élimination de l'ion magnésium uniquement. Puis, si la stimulation persiste et est à haute fréquence (*droite*), cela induit une libération massive de glutamate qui se lie aux AMPARs et NMDARs. Ces derniers n'étant plus obstrués, peuvent alors induire un influx calcique massif dans le compartiment post-synaptique et par conséquent activer diverses voies de signalisation. L'ensemble de ce processus permet alors de renforcer l'efficacité de la synapse et est à la base de la potentialisation à long terme.

Les récepteurs NMDA sont quant à eux, des hétéromères composés obligatoirement de deux sous-unités GluN1 et de deux autres sous-unités GluN2 ou GluN3. Ces récepteurs peuvent laisser passer des ions  $K^+$  et  $Na^+$  mais ont une plus forte perméabilité aux ions  $Ca^{++}$ . Ils agissent comme des détecteurs de coïncidence puisque leur activation nécessite un double mécanisme : la dépolérisation de la membrane post-synaptique et la liaison du glutamate. En effet, lors d'une stimulation neuronale unique, le neurone excitateur libère du glutamate qui se lie au récepteur AMPA. Cela induit un influx d'ions  $Na^{++}$  dans l'extrémité post-synaptique et permet la dépolérisation de la membrane post-synaptique. Cette dépolérisation permet de déloger l'ion  $Mg^{++}$  localisé sur le pore du récepteur NMDA mais ne permet pas d'influx ionique. Puis, si le neurone est stimulé de façon répétée, du glutamate est à nouveau relargué et peut cette fois se lier sur les récepteurs NMDA pour ainsi permettre un important influx calcique dans le compartiment post-synaptique. Le calcium est un second messager essentiel puisqu'il permet d'activer des voies de signalisation faisant intervenir différentes kinases (CamKII, PKA et PKC) qui sont nécessaires à l'induction de la plasticité synaptique (*Figure 16*). Le glutamate joue donc un rôle très important dans la régulation des récepteurs au NMDA. Toutefois, il est intéressant de mentionner que lorsque ces récepteurs sont excessivement stimulés, cela entraîne un influx calcique trop important dans le compartiment post-synaptique pouvant induire des altérations neuronales : c'est ce processus que l'on appelle excitotoxicité (Dong, et al., 2009). *Nous verrons dans la*



*partie 2.3* que ce mécanisme est retrouvée dans de nombreuses pathologies neurodégénératives dont la MA au cours de laquelle il induit le phénomène de synaptotoxicité.

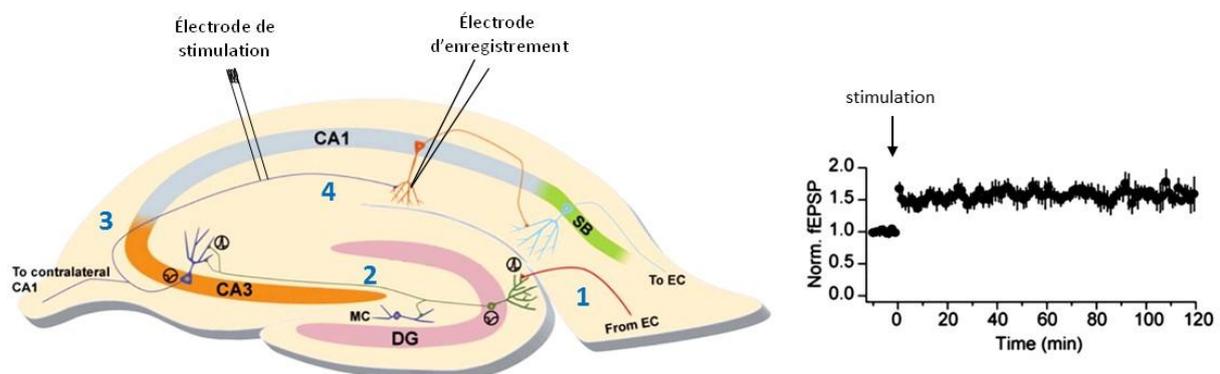
Il est intéressant de noter que l'étude de la plasticité synaptique a pu être établie grâce à la mise au point de techniques d'électrophysiologie. Celles-ci permettent en effet, d'analyser les phénomènes électrochimiques et électriques ayant lieu au sein des neurones et des tissus et par conséquent d'étudier la transmission glutamatergique. Parmi ces techniques, la plus utilisée est celle du patch-clamp qui permet d'enregistrer, selon sa configuration, les courants ioniques d'un seul neurone ou d'un fragment membranaire d'un neurone isolé ne contenant que quelques canaux ioniques (Hamill *et al.*, 1981). En plus du patch-clamp, une autre technique, non invasive pour les neurones est également utilisée : il s'agit de la technique du multi electrode array (MEA). Celle-ci permet quant à elle d'effectuer des enregistrements extracellulaires de l'activité électrique d'un neurone ou d'un réseau neuronal (Gross *et al.*, 1977). Le développement de ces outils a ainsi permis d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués au cours de la plasticité synaptique.

### 2.2.2. *La potentialisation à long terme*

Il est admis depuis plusieurs décennies que la plasticité synaptique repose sur un processus nommé la potentialisation à long terme (LTP). Bliss et Lomo sont les premiers à avoir découvert un tel mécanisme dans l'hippocampe en 1973. En effet, les études qu'ils ont effectuées chez le lapin ont permis de montrer que le fait d'appliquer des stimulations à haute fréquence dans la voie perforante (*Figure 17*) (localisée dans l'hippocampe) induit une amélioration durable de l'efficacité de la transmission synaptique au niveau du gyrus denté (Bliss and Lomo, 1973). Bien que la LTP ait principalement lieu dans l'hippocampe, elle fait également intervenir des réseaux neuronaux complexes localisés dans d'autres régions cérébrales telles que l'amygdale, le cortex pré-frontal ou encore le subiculum.

A partir des années 1980, ont lieu les premières expérimentations qui vont permettre de décrire les mécanismes moléculaires à l'origine de la LTP. Ces expériences vont ainsi mettre en évidence l'importance du récepteur NMDA dans l'induction de la LTP. En effet, Collingridge *et al.* démontrent que l'application dans l'hippocampe d'un antagoniste des récepteurs NMDA, l'AP5 (acide 2-amino-5-phosphonovalérique) empêche la formation de la LTP, *in vitro* et *in vivo* (Collingridge *et al.*, 1983 ; Errington *et al.*, 1987). De plus, l'influx calcique faisant suite à l'ouverture des récepteurs NMDA a également été montré pour jouer un rôle important dans l'induction de la LTP puisque des injections de chélateurs de calcium tels l'EGTA ou BAPTA bloquent la LTP (Mulkey and Malenka, 1992). Les

récepteurs AMPA sont aussi impliqués dans la LTP. En effet, l'augmentation du nombre de ces récepteurs au niveau de la membrane post-synaptique, grâce au mécanisme d'exocytose semble jouer un rôle essentiel dans l'induction de la LTP. De même, une fois induite, la LTP pourrait également exercer une influence positive sur la sensibilité des récepteurs AMPA et sur leur nombre au niveau des PSD (Davies *et al.*, 1989). La LTP est constituée de deux phases, une phase précoce nommée E-LTP (Early-LTP) qui est indépendante de la synthèse protéique mais qui repose sur l'activité de certaines kinases (CamKII, PKA et PKC) et une phase tardive, la L-LTP (Late-LTP) qui elle, nécessite la synthèse de nouvelles protéines au niveau de la PSD et qui dure plusieurs heures (Nguyen *et al.*, 1994 ; Vickers *et al.*, 2005). Parmi ces protéines nouvellement synthétisées, une attention particulière a été portée sur la synthèse des IEGs (Immediate Early Genes) et notamment Arc (Activity-regulated and cytoskeleton-associated protein), qui est connu pour moduler la plasticité des synapses. En effet, il a été montré que lors d'une activation synaptique, l'expression du gène Arc est augmentée provoquant ainsi une augmentation des niveaux protéiques d'Arc au niveau des dendrites. De plus, la protéine Arc joue également un rôle dans la formation de la mémoire puisque lorsque la traduction de son ARNm est bloquée, cela inhibe la LTP et la mémoire spatiale à long terme mais n'altère pas celle à court terme (Guzowski *et al.*, 2000).



**Figure 17 : Représentation schématique d'une coupe d'hippocampe illustrant la voie perforante et l'enregistrement montrant l'amplitude des potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) suite à une stimulation.** Lors d'une stimulation, les projections de la voie perforante partent du cortex entorhinal (1), pour ensuite atteindre la voie des fibres mossues au niveau du gyrus denté. L'influx rejoint ensuite la corne d'Ammon (2) et plus précisément les collatérales de Schaffer (3) pour ensuite se propager jusqu'à la région CA1 de l'hippocampe (4) avant d'atteindre le subiculum. MC : cellules mossues, DG : Gyrus denté, CA1-3 : corne d'Ammon, EC : cortex entorhinal, SB : subiculum. *Modifié d'après Kitabatake et al., 2007 ; Remy & Spruston, 2007*

Le rôle de la LTP dans la formation de la mémoire a été mis en évidence en 1986 grâce aux travaux de Morris *et al.* En effet, il a été démontré que des injections de l'antagoniste des récepteurs au NMDA, AP5 chez des souris, provoque non seulement un blocage de la LTP, mais également des altérations de la mémoire spatiale des animaux (Morris *et al.*, 1986). De même, des résultats similaires ont été observés chez des souris KO (knock-out) pour le récepteur NMDA dans la région CA1 de

l'hippocampe (Tsien et al., 1996). De plus, une étude réalisée en 2006 par Whitlock et al. a permis de confirmer l'implication de la LTP dans la formation de la mémoire. En effet, lorsque des souris sont soumises à un test d'apprentissage par la peur (inhibitory avoidance test), les effets que produit cet apprentissage au niveau de l'hippocampe sont similaires à ceux observés lors de l'induction d'une LTP par une stimulation à haute fréquence (Whitlock *et al.*, 2006).

Il est ici important de préciser que la LTP ne résulte pas de ce seul mécanisme moléculaire, mais intègre de nombreuses autres voies de signalisation non mentionnées dans ce paragraphe. Par ailleurs, outre la LTP, il existe également un autre processus qui à l'inverse de la LTP induit une diminution de l'efficacité des synapses : il s'agit de la dépression à long terme (LTD). Cette voie moléculaire sera notamment abordée dans la partie suivante puisqu'on la retrouve impliquée dans la mise en place des altérations synaptiques.

### **2.3. Altérations de la plasticité synaptique et de la mémoire dans des modèles de MA**

Comme nous venons de le voir, les synapses jouent un rôle fondamental dans la formation de la mémoire et de l'apprentissage. Il n'est donc pas surprenant de constater qu'au cours de la MA – pathologie décrite précédemment comme étant principalement caractérisée par le développement de déclin cognitifs – aient lieu des altérations de l'intégrité synaptique conduisant à une perte précoce et progressive des synapses (Scheff *et al.*, 2006). Bien que l'origine de cette perte synaptique reste aujourd'hui encore à élucider, de nombreuses études laissent suggérer que les protéines tau et amyloïdes solubles pourraient y jouer un rôle.

#### *2.3.1. Les synapses et le peptide amyloïde*

L'utilisation de modèles murins transgéniques de la pathologie amyloïde a permis de mettre en évidence que la perte synaptique se produit davantage aux alentours des plaques séniles ayant un cœur amyloïde dense plutôt que proche des plaques diffuses (Koffie *et al.*, 2009 ; Masliah *et al.*, 1990). La réalisation d'études électrophysiologiques a permis de montrer qu'afin d'induire son effet synaptotoxique, le peptide A $\beta$  provoque une perte de la fonctionnalité des synapses. En effet, l'application de ce peptide sur des coupes hippocampiques et *in vivo*, provoque une réduction de la LTP (Shankar *et al.*, 2008 ; Walsh *et al.*, 2002) et à l'inverse, une amélioration de la LTD (Li *et al.*, 2009), menant ainsi à une réduction du nombre d'épines dendritiques et par conséquent à une baisse de la force des synapses. Comme décrit précédemment, les mécanismes de LTP et de LTD font intervenir deux récepteurs : NMDAR et AMPAR. Il n'est donc pas surprenant que pour expliquer ce phénomène

de synaptotoxicité par les peptides A $\beta$ , une des hypothèses est que ce peptide pourrait altérer la fonctionnalité de ces récepteurs. Des études réalisées *in vitro*, ont permis de conforter cette hypothèse en montrant que le peptide A $\beta$  est capable d'induire une internalisation anormale de ces deux récepteurs via un mécanisme dépendant de la LTD (Hsieh *et al.*, 2006 ; Shankar *et al.*, 2007). De plus, l'exposition de cultures neuronales à des oligomères d'A $\beta$  bloque les influx calciques passant normalement par le récepteur au NMDA favorisant ainsi la LTD au détriment de la LTP dans les épines dendritiques (Snyder *et al.*, 2005). Par ailleurs, de nombreux travaux ont aussi permis de démontrer que les peptides A $\beta$  sont capables d'interagir directement avec les AMPAR (Renner *et al.*, 2010) et les NMDAR (De Felice *et al.*, 2007 ; Decker *et al.*, 2010) afin d'altérer leur fonctionnement. Enfin, il a été mis en évidence que les oligomères d'A $\beta$  ont également un impact sur les voies de signalisation impliquées dans les processus de LTP puisqu'ils sont capables d'altérer l'activité de certaines kinases dont JNK, la CamKII ou encore l'AMPK (Zhao, *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2004 ; Mairet-Coello *et al.*, 2013 ; Thornton *et al.*, 2011).

A contrario, il est intéressant de noter que des études montrent que l'activité synaptique pourrait aussi avoir un impact sur la pathologie amyloïde. En effet, Lazarov *et al.*, montrent que l'exposition d'un modèle murin transgénique pour la pathologie amyloïde (APP/PS1) à un environnement dit "riche" permettrait de réduire la formation des plaques amyloïdes et de stimuler la régulation des gènes impliqués dans les mécanismes d'apprentissage et de mémoire (Lazarov *et al.*, 2005). Par ailleurs, une étude réalisée en 2012 a mis en évidence que la stimulation des processus cognitifs auraient un rôle protecteur contre le développement de la MA (Stern, 2012).

### 2.3.2. Les synapses et la protéine tau

Bien que son rôle au niveau synaptique soit moins bien connu, la protéine tau pourrait également impacter l'intégrité des synapses. En effet, il est tout d'abord intéressant de noter que l'évolution spatio-temporelle de la propagation de la pathologie tau dans le cerveau suit celle de la perte synaptique (Braak and Braak, 1995), confortant ainsi l'hypothèse que tau pourrait avoir un impact sur la perte synaptique. Comme dit précédemment, au cours de la MA, l'hyperphosphorylation de la protéine tau provoque sa dissociation des MTs et induit sa relocalisation dans le compartiment somato-dendritique. On assiste alors à une accumulation de protéines tau hyperphosphorylées et agrégées au niveau des dendrites (Grundke-Iqbal *et al.*, 1986). Cette relocalisation a des conséquences néfastes pour la fonction synaptique puisque n'étant plus stabilisés, les MTs ne sont plus capables d'assurer un transport axonal efficace et fonctionnel (Matamoros and Baas, 2016 ; Kopeikina *et al.*, 2012). Il a ainsi été démontré que dans des modèles surexprimant la protéine tau, le transport des protéines nécessaires au fonctionnement de la synapse et des mitochondries est altéré induisant ainsi

une accumulation des mitochondries au niveau du corps cellulaire neuronal (Ebner *et al.*, 1998 ; Kanaan *et al.*, 2011 ; LaPointe *et al.*, 2009). Ce processus a pour conséquence d'empêcher l'apport d'énergie aux synapses et d'induire de ce fait, des altérations synaptiques. De plus, Hoover *et al.*, montrent également que la relocalisation dendritique de la protéine tau altère la fonctionnalité des synapses en diminuant l'expression et par conséquent le nombre des récepteurs AMPAR et NMDAR au niveau des dendrites (Hoover *et al.*, 2010). De même, la protéine tau a également été montrée pour être impliquée dans l'induction de l'effet synaptotoxique du peptide A $\beta$  via son interaction avec la Src kinase, Fyn (Ittner *et al.*, 2010). En effet, des études montrent qu'en modulant l'activité de Fyn, tau pourrait induire la stabilisation du complexe entre la protéine PSD-95 et la sous-unité NR2B du récepteur au NMDA, et ainsi, faciliter la mise en place de l'excitotoxicité induite par le peptide A $\beta$  (Ittner *et al.*, 2010). La protéine tau pourrait également jouer un rôle critique dans l'établissement de la LTD, notamment via la phosphorylation de son résidu Ser396 (Regan *et al.*, 2015). Ces résultats ont par ailleurs été confirmés *in vivo*, dans un modèle murin KO pour la protéine tau où on observe également une altération de la LTD (Kimura *et al.*, 2014). Enfin, des études réalisées au laboratoire, montrent que dans un modèle transgénique pour la pathologie tau (modèle THY-Tau22), la fonctionnalité des récepteurs au NMDA est altérée et induit des altérations cognitives en empêchant la réponse au BDNF (Brain-derived neurotrophic factor), un facteur exprimé dans l'hippocampe et jouant un rôle critique dans les mécanismes de plasticité synaptique et de mémoire (Burnouf *et al.*, 2013). Il a également été mis en évidence que dans ce modèle transgénique THY-Tau 22, se développent des altérations de la transmission synaptique hippocampique associées à des troubles de la mémoire (Van der Jeugd *et al.*, 2013 ; Schindowski *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces données montrent que la perte des synapses est un événement très précoce au cours de la MA qui est à l'origine du développement des déficits cognitifs et qui fait intervenir la protéine tau et le peptide  $\beta$ -amyloïde. Toutefois, bien que les pathologies tau et amyloïde participent à la mise en place des altérations synaptiques, plusieurs études montrent que ces deux lésions sont également retrouvées dans le cerveau de personnes âgées et saines (Perez-Nievas *et al.*, 2013 ; Price and Morris, 1999). Ces données laissent supposer que les déficits cognitifs sembleraient principalement dus à la perte des fonctions synaptiques plutôt qu'à la neurodégénérescence ou à l'accumulation des protéines tau et amyloïdes agrégées (DeKosky & Scheff, 1990 ; Selkoe, 2002). Néanmoins, de nombreuses autres investigations restent nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la perte d'intégrité synaptique.

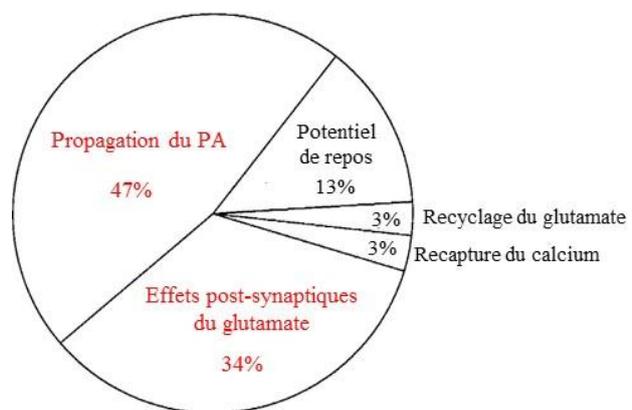
Au cours de cette partie, nous avons pu constater que la perte synaptique est une caractéristique majeure de la MA qui apparaît dès les stades précoces de cette pathologie. Nous avons également pu voir que cette perte de synapses est grandement responsable de la mise en place des

déficits cognitifs observés chez les patients atteints de la MA et qu'elle peut être modulée par les pathologies tau et amyloïdes. Après nous être intéressés à la perte synaptique, nous allons maintenant clore ce deuxième chapitre d'introduction en nous attardant sur la dernière caractéristique de la MA qui nous intéresse pour notre étude : les altérations du métabolisme énergétique neuronal. Toutefois, avant d'étudier ces altérations, nous allons voir quelques généralités sur le métabolisme énergétique neuronal.

### 3. Le métabolisme énergétique neuronal : une voie précocement altérée lors de la MA

#### 3.1. Généralités sur le métabolisme énergétique neuronal

Le cerveau est l'organe du corps qui, proportionnellement à sa masse, consomme le plus d'énergie. En effet, bien qu'il ne représente que 2% du poids corporel chez l'homme, le cerveau utilise environ 20 à 25 % de l'énergie totale sous la forme de glucose et d'oxygène. Cette énergie est majoritairement utilisée par les neurones qui la convertissent en ATP (adénosine tri-phosphate) afin d'assurer leurs différentes fonctions telles que la restauration du potentiel de membrane, le transport axonal, les voies de signalisation intracellulaires et le recyclage des neurotransmetteurs (Attwell and Laughlin, 2001). Des études réalisées à partir de données physiologiques et anatomiques de modèles murins ont permis d'estimer la quantité d'énergie utilisée par ces voies neuronales. Il a ainsi pu être mis en évidence qu'au sein du neurone, l'énergie est principalement utilisée au niveau de la synapse lors de la transmission glutamatergique, un processus qui comme nous l'avons vu précédemment, fait intervenir de nombreux mécanismes et qui est essentiel pour la formation de la mémoire (Attwell and Laughlin, 2001 ; Martin et al., 2000 ; Harris, Jolivet and

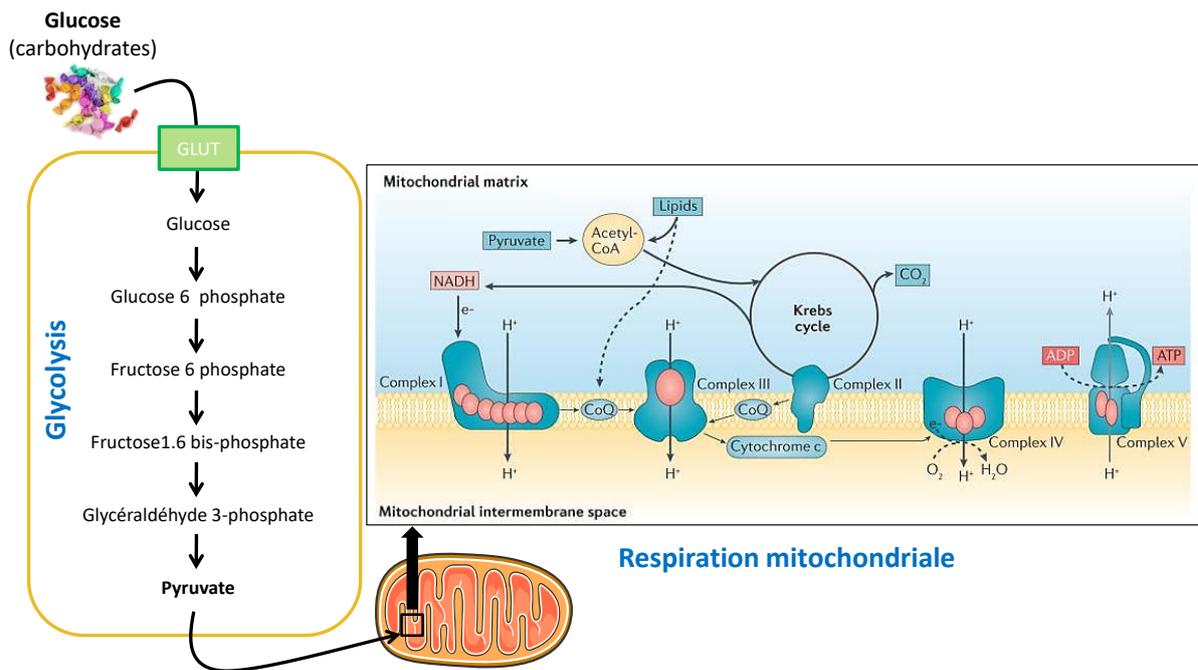


**Figure 18 : Diagramme représentant l'utilisation de l'ATP dans les neurones.** Au sein des neurones, 47% de l'énergie est utilisée pour permettre la propagation du potentiel d'action (PA) le long de l'axone et la dépolarisation au niveau des dendrites et du soma. De plus, 34% de l'énergie utilisée concerne les effets post-synaptiques liés au relargage du glutamate. Cette énergie est principalement utilisée par les pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> afin de maintenir le gradient ionique au niveau post-synaptique. En revanche, on constate que l'énergie utilisée pour permettre le retour au potentiel de repos est beaucoup moins importante (13%). Il en est de même pour les processus à l'origine de la recapture du calcium (3%) et du recyclage des neurotransmetteurs (*D'après Attwell & Laughlin, 2001*).

Attwell, 2012). En effet, on constate que 47% et 34% de l'énergie neuronale sont utilisés pour la propagation des potentiels d'action et les effets post-synaptiques du glutamate réciproquement, 13 % sont ensuite assignés pour le retour au potentiel de repos, le reste étant utilisé pour la recapture du calcium (3%) et le recyclage des neurotransmetteurs (3%) (Attwell and Laughlin, 2001) (*Figure 18*). Au vu de ces chiffres, on voit donc que le métabolisme énergétique neuronal joue un rôle crucial pour le maintien des fonctions neuronales et qu'il nécessite par conséquent d'être finement régulé. Des altérations de ce métabolisme sont en effet observées dans un grand nombre de maladies neurodégénératives dont la MA, *comme nous le verrons dans la section 3.2*.

### *3.1.1. La glycolyse et la respiration mitochondriale*

Au sein des neurones, il existe deux voies qui permettent d'assurer la production de l'énergie : la glycolyse et la respiration mitochondriale. La glycolyse permet une production rapide mais limitée d'ATP grâce à la dégradation de molécules de glucose. Avant d'être métabolisé, le glucose est transporté à l'intérieur des neurones via des transporteurs nommé GLUT (glucose transporter). Puis, le glucose subit une succession de réactions enzymatiques qui conduit à la formation de deux molécules d'ATP et de deux molécules de pyruvate. Une fois généré, et en présence d'oxygène, le pyruvate peut entrer dans la mitochondrie afin d'y être oxydé en acétyl-Coenzyme A qui entrera lui-même dans le cycle de Krebs. Au cours de ce cycle, trois molécules de NADH et une molécule de FADH<sub>2</sub> sont générées et sont ensuite oxydées grâce aux 5 complexes mitochondriaux, nommés I à V, qui forment la chaîne respiratoire mitochondriale. L'ensemble de ces réactions effectuées au sein de la mitochondrie correspond à la respiration mitochondriale et permet de générer 32 à 36 molécules d'ATP (*Figure 19*).



**Figure 19 : La glycolyse et la respiration mitochondriale.** A l'issue de la glycolyse, le pyruvate peut entrer dans la mitochondrie afin d'être oxydé en Acétyl CoA pour ensuite entrer dans le cycle de Krebs. A l'issue de ce cycle, les molécules de NADH et FADH générées sont oxydées via la chaîne respiratoire mitochondriale. Celle-ci est constituée de 5 complexes enzymatiques : le NADH-CoQ reductase (complexe I), la succinate CoQ reductase (complexe II), l'ubiquinol-cytochrome c reductase (complexe III), la cytochrome c oxidase (complexe IV) et enfin la F1F0-ATP synthase (complexe V) (D'après Emma *et al.*, 2016).

### 3.1.2. La mitochondrie : un producteur d'énergie mais pas uniquement...

Comme décrit précédemment, la mitochondrie joue un rôle essentiel au sein des neurones puisqu'elle correspond à la principale voie de production de l'énergie neuronale. De par sa forte consommation en oxygène (environ 85 %) lors de la respiration mitochondriale, la mitochondrie représente la principale source intracellulaire de production des espèces réactives de l'oxygène (ROS). (Shigenaga *et al.*, 1994). Cette production de ROS est dépendante de la chaîne respiratoire et notamment, des complexes I et III qui peuvent former des ions superoxydes (Lenaz *et al.*, 2002). De plus, ces ROS contribuent également à la mise en place du stress oxydatif et sont ainsi associés à de nombreuses pathologies dont les maladies neurodégénératives. En plus de sa fonction de production d'ATP, la mitochondrie est également impliquée dans l'homéostasie calcique. En effet, elle est à la fois capable de recapturer le calcium intracellulaire via la présence d'un canal ionique très sélectif, mais aussi de le relarguer via un pore de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP) (Kirichok *et al.*, 2004). Ce processus d'influx et d'efflux calcique mitochondrial a été montré pour jouer un rôle important dans le fonctionnement des mitochondries. En effet, au sein des mitochondries, cette signalisation calcique est par exemple, capable de moduler l'activité des enzymes impliqués dans la



respiration mitochondriale (McCormack and Denton, 1980) mais également de détoxifier des ROS, bien que cette dernière fonction soit controversée (Reynolds and Hastings, 1995 ; Starkov et al., 2002).

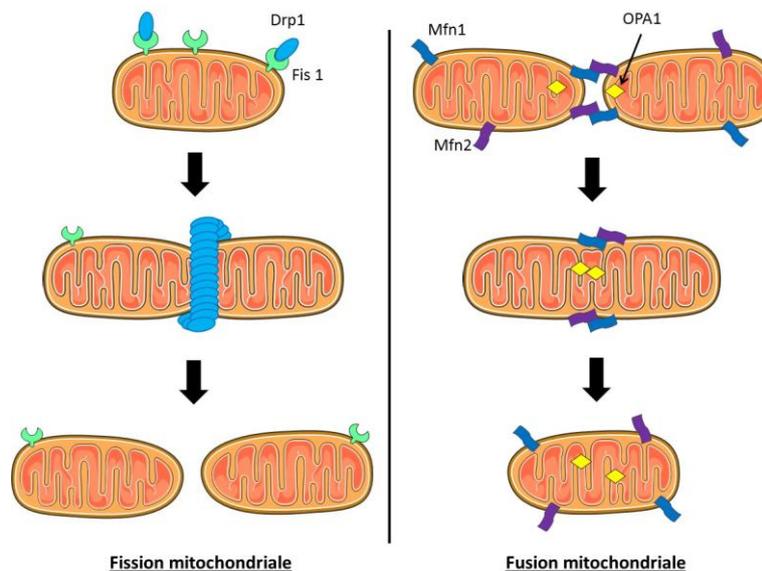
### 3.1.2.1. *Le transport des mitochondries*

Le neurone est une cellule polarisée présentant différents compartiments qui ont chacun des besoins en énergie très différents. Par conséquent, la distribution des mitochondries n'est pas homogène au sein du neurone. En effet, on retrouve par exemple, beaucoup plus de mitochondries au niveau des terminaisons synaptiques puisqu'elles nécessitent une importante quantité d'énergie notamment lors d'une activation synaptique (Attwell et al., 2001). Pour pouvoir assurer ces besoins, les mitochondries peuvent être soit stationnaires, soit transportées vers ces différents compartiments via le transport axonal, ce qui permet ainsi d'établir un réseau mitochondrial dynamique (Kang *et al.*, 2008 ; Sun *et al.*, 2013). Ce transport fait intervenir deux types de moteurs moléculaires : la kinésine KIF5 qui permet d'assurer leur transport antérograde et la dynéine qui assure quant à elle le transport rétrograde (Tanaka *et al.*, 1998 ; Pilling *et al.*, 2006). Le transport des mitochondries joue donc un rôle essentiel dans les neurones puisque comme nous le verrons dans la section suivante, des dysfonctionnements de ce transport sont à l'origine de la mise en place des altérations du métabolisme énergétique neuronal.

### 3.1.2.2. *La dynamique des mitochondries*

Afin de réguler leurs fonctions, leur distribution et leur morphologie, les mitochondries subissent des phénomènes de fusion et de fission : c'est ce qu'on appelle la dynamique mitochondriale. Cette dynamique permet aux mitochondries de s'adapter rapidement à l'environnement dans lequel elles se trouvent, et notamment, aux besoins énergétiques du neurone. La dynamique mitochondriale et plus particulièrement, la fusion, peut être considérée comme un mécanisme de réparation. En effet, lors de la fusion, les mitochondries échangent leur matériel protéique et génétique, ce qui permet d'homogénéiser les constituants de leur matrice mais également de corriger de potentiels défauts protéiques (Okamoto and Shaw, 2005 ; Hoppins et al., 2007). Il est intéressant de noter que ce mécanisme semble être associé à une optimisation de la production d'énergie. A l'inverse, la fission est plutôt considérée comme étant un processus lié à une baisse de production d'énergie. En effet, elle permet de segmenter les mitochondries possédant des altérations de leur contenu facilitant ainsi leur élimination par une voie d'autophagie spécifique : la mitophagie (Youle and van der Bliek, 2012).

Au vu de leur importance dans la régulation de l'homéostasie mitochondriale, ces mécanismes de fusion / fission nécessitent d'être finement régulés. La régulation de la fusion mitochondriale fait intervenir trois protéines appartenant à la famille des dynamines : les protéines mitofusine 1 et 2 (MFN 1 et 2) localisées sur la membrane mitochondriale externe (MME) et OPA1 (Optic atrophy 1) localisée sur la membrane mitochondriale interne (MMI) (Chen *et al.*, 2003 ; Cipolat *et al.*, 2004). Les protéines MFN1 et MFN2 sont responsables de la fusion des MME des deux mitochondries en cours de fusion alors qu'OPA1 permet la fusion de celles internes (Palmer *et al.*, 2011). Bien que la fusion mitochondriale puisse parfois aboutir à la formation d'une mitochondrie allongée, ce mécanisme reste dans la majorité des cas un processus instable et très dynamique à l'issue duquel les mitochondries se séparent très rapidement. La régulation de la fission mitochondriale est quant à elle majoritairement contrôlée par une protéine cytoplasmique nommée Drp1 (dynamine-related protein 1) (Frank *et al.*, 2001) même si d'autres protéines telles que Fis1, Mff, Mid49 et Mid52, participent également à ce processus. Afin de promouvoir la fission mitochondriale, Drp1 doit être recrutée par Fis 1 au niveau de la MME. Une fois recrutée, Drp1 forme des oligomères avec d'autres protéines Drp1 et ce, dans le but de créer une structure en forme de spirale autour de la MME permettant ainsi d'induire une constriction de la mitochondrie et aboutir à sa fission (Gao *et al.*, 2010 ; Mears *et al.*, 2011) (Figure 20).



**Figure 20: Représentation schématique des mécanismes impliqués dans les processus de fission et de fusion mitochondriale.**

Les mécanismes de fission et fusion mitochondriale jouent donc un rôle essentiel dans la régulation de la distribution des mitochondries au sein de l'axone et des synapses (Chen et al., 2007). Ils assurent par conséquent la formation d'un réseau mitochondrial efficace permettant ainsi de fournir l'énergie dans les régions qui en ont besoin.

### 3.1.2.3. *La mitophagie*

La mitophagie représente un mécanisme essentiel pour l'élimination des mitochondries défectueuses et nécessite l'intervention de deux protéines : Parkin (une ubiquitine ligase E3) et PINK1 (Youle and Narendra, 2011). Afin d'être dégradées par mitophagie, les mitochondries nécessitent d'être dans un premier temps « étiquetées » par un mécanisme d'ubiquitination. En effet, lorsque les mitochondries sont endommagées, la protéine PINK 1 qui est normalement rapidement dégradée au sein des mitochondries saines, va être recrutée au niveau de la MME et activer Parkin en la phosphorylant. Une fois activée, Parkin peut alors lier l'ubiquitine aux substrats protéiques localisés sur la MME et induire par conséquent la voie de la mitophagie. Comme vu précédemment, la fission mitochondriale semble être un pré-requis pour la mitophagie (Twig *et al.*, 2008) alors qu'à l'inverse, la fusion protégerait les mitochondries de cette voie de dégradation (Gomes et al., 2011).

## 3.2. Altérations du métabolisme énergétique neuronal dans la MA

Nous avons vu dans les chapitres précédents que la MA est caractérisée par le développement d'une pathologie amyloïde, une pathologie tau ainsi que par une perte synaptique. En plus de ces caractéristiques, il a également été mis en évidence que dès les stades précoces de la MA ont lieu des altérations métaboliques tels qu'un hypométabolisme du glucose et des dysfonctionnements mitochondriaux (Jack et al., 2013; Atamna et Frey, 2007).

### 3.2.1. *Altérations du métabolisme glucidique*

L'hypométabolisme du glucose est une caractéristique de la MA qui arrive dès les stades précoces de la MA. En effet, grâce à l'utilisation du FDG-PET (<sup>18</sup>Fluoro Deoxy Glucose-Positron Emission Tomographie) chez des patients atteints de la MA, il a pu être mis en évidence que certaines régions cérébrales telles que les régions fronto- et pariéto-temporale et le cortex préfrontal utilisent moins de glucose comparé à un cerveau sain (Mosconi et al., 2008 ; Teune *et al.*, 2010). Des études montrent aussi que dans le cerveau de ces patients, cette baisse d'utilisation du glucose de l'ordre de

21 à 28 %, est associée à une diminution de l'expression et de l'activité des enzymes impliqués dans la glycolyse (Blass et al., 2000). Par ailleurs, cet hypométabolisme a été montré pour apparaître avant le développement des premiers troubles cognitifs (Hsia *et al.*, 1999) et semble également rendre les neurones plus sensibles à la déficience énergétique (Arias *et al.*, 2002). De plus, de manière très intéressante, une étude récente a permis de montrer que la diminution de l'utilisation du glucose observée par FDG-PET chez les patients atteints de la MA est le meilleur marqueur prédictif de la MA (Caminiti *et al.*, 2018). En effet, dans cette étude, Caminiti *et al.*, montrent que le FDG-PET permet de discriminer de façon efficace les personnes qui vont développer une MA ou une autre démence de celles qui maintiendront un état stable. A l'heure actuelle, les événements moléculaires à l'origine de la mise en place de l'hypométabolisme du glucose sont encore peu clairs. Toutefois, l'utilisation de modèles murins transgéniques pour la pathologie amyloïde (APP/PS1) a permis de mettre en évidence qu'à l'âge de 22 mois, ces souris présentent des altérations de la mémoire qui s'accompagnent d'une réduction de l'utilisation du glucose au niveau de leur hippocampe (Sadowski *et al.*, 2004). Par ailleurs, certaines études montrent que les altérations du fonctionnement de la mitochondrie (*que nous allons voir dans la section suivante*) pourraient être impliquées dans la survenue de l'hypométabolisme glucidique précoce (Blass et al., 2000 ; Mosconi et al., 2005).

De nombreuses études suggèrent que le métabolisme énergétique pourrait avoir un impact sur les pathologies tau et amyloïde. En effet, l'induction d'une privation en glucose en culture primaire neuronale a été montrée pour provoquer une augmentation de la phosphorylation de la protéine tau (Lauretti and Praticò, 2015). La privation en glucose entraîne également des altérations de la mémoire lorsqu'elle est induite dans un modèle murin transgénique pour la pathologie tau (modèle hTau) (Lauretti *et al.*, 2017). De plus, une diminution du métabolisme a également été reportée pour induire une augmentation du niveau de phosphorylation de la protéine tau et notamment des enchevêtrements neurofibrillaires, dans un modèle d'animaux hibernant, appelé sousliks ou écureuils terrestres (Arendt et al., 2015 ; Planel, 2004). Toutefois, dans ce modèle, l'hyperphosphorylation de tau est un processus réversible puisque les niveaux de protéines tau phosphorylées reviennent à la normale une fois la période d'hibernation terminée. Cette étude laisse donc suggérer que la phosphorylation de tau associée à l'hypométabolisme pourrait représenter un mécanisme neuroprotecteur qui devient néfaste lorsque que ce statut métabolique persiste (Arendt et al., 2015). Par ailleurs, d'autres travaux montrent aussi que l'induction d'une déficience au niveau des transporteurs de glucose GLUT-1 dans un modèle murin transgénique pour la pathologie amyloïde (APP<sup>SW/0</sup>) accélère la formation des dépôts amyloïdes, la neurodégénérescence et par conséquent les troubles cognitifs (Winkler *et al.*, 2015). L'hypométabolisme glucidique peut également avoir un impact sur la pathologie amyloïde. En effet, il a été démontré que l'inhibition du métabolisme énergétique provoque une stimulation du métabolisme de l'APP par la voie amyloïdogénique, c'est-à-dire la voie productrice de peptide A $\beta$  *in vitro* et *in vivo* (Gabuzda *et al.*, 1994 ; Velliquette, 2005). Ce mécanisme semble passer par l'activité de l'enzyme  $\beta$ -

secretase BACE1 qui, lors d'une déficience énergétique, apparaît être augmentée (Velliquette, 2005). Toutefois, d'autres études semblent montrer que la baisse du métabolisme énergétique pourrait à l'inverse diminuer les niveaux d'APP et de ses produits de dégradation *in vitro* (Hoyer *et al.*, 2005). Ces études laissent ainsi suggérer que l'impact du métabolisme énergétique sur le métabolisme de l'APP est assez complexe et nécessite par conséquent d'autres investigations afin d'améliorer sa compréhension.

### 3.2.2. Altérations mitochondriales

En plus de l'hypométabolisme glucidique, des altérations mitochondriales sont également observées dans le cerveau des patients atteints de la MA. En effet, des études ont mis en évidence que le fonctionnement de la chaîne respiratoire est fortement altéré lors de la MA. En effet, on constate par exemple une diminution de 30 à 40 % de l'activité du complexe mitochondrial IV (Maurer *et al.*, 2000 ; Parker Jr. *et al.*, 1994). Par ailleurs, il a également été démontré que l'activité de certaines enzymes impliqués dans le cycle de Krebs est réduite dans le cerveau des patients atteints de la MA (c'est le cas pour la pyruvate déshydrogenase, PDH) alors que celle d'autres enzymes augmente (Bubber *et al.*, 2005). En plus de ces changements biochimiques, les mitochondries subissent également des changements morphologiques au cours de la MA, puisqu'on retrouve une accumulation de mitochondries de taille réduite et possédant un matériel matriciel osmiophilique, dans le cerveau de ces patients comparé aux personnes saines (Baloyannis, 2006). De plus, on retrouve aussi des modifications de l'ADN mitochondrial (ADNmt) dans le cerveau des patients atteints de la MA comparé à celui de personnes saines. Ces changements ont pour conséquence fonctionnelle d'altérer la production d'énergie (Porteous *et al.*, 1998). Une augmentation du taux de mutations de l'ADNmt est également retrouvée lors de la MA (Coskun *et al.*, 2010). Ces mutations de l'ADNmt sont par ailleurs positivement corrélées à l'activité de la  $\beta$ -secretase. En effet, l'accumulation de ces mutations semble provoquer une augmentation de la production de ROS qui a pour conséquences de stimuler l'activité des  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases et par conséquent, de stimuler la voie amyloïdogénique de l'APP. Par la suite, les produits issus du métabolisme de l'APP peuvent à leur tour promouvoir la formation de ROS qui va également induire une altération de la chaîne respiratoire mitochondriale, engendrant ainsi un cercle vicieux (Reddy and Beal, 2008)(Reddy, 2008).

En 1992, un lien direct entre les mitochondries et les peptides A $\beta$  a été mis en évidence. En effet, le groupe de Yamaguchi a montré pour la première fois que dans le cerveau des patients atteints de la MA, l'APP est retrouvée dans la MME (Yamaguchi *et al.*, 1992). D'autres études ont par la suite montré que l'APP et ses fragments sont capables de se lier aux protéines HtrA2 ou ABAD qui permettent l'importation de protéines dans les mitochondries (Anandatheerthavarada *et al.*, 2003 ;

Devi *et al.*, 2006). Par ailleurs, une augmentation de la production des ROS associée à une diminution de l'activité du complexe mitochondrial IV a été mise en évidence dans des cellules soumises à une exposition au peptide A $\beta$  ou surexprimant l'APP (Bennett *et al.*, 1992 ; (Keil *et al.*, 2004). Il a aussi été montré que la diminution de la fusion mitochondriale, l'augmentation de la fission mitochondriale et l'augmentation de l'interaction entre le peptide A $\beta$  et Drp1, entraîne une altération du transport axonal des mitochondries et provoque la perte des synapses (Manczak *et al.*, 2011). Les changements pathologiques de la protéine tau survenant au cours de la MA ont également un impact sur les altérations mitochondriales. En effet, il a été démontré que dans un modèle murin transgénique pour la pathologie tau (rTg4510), l'hyperphosphorylation de tau provoque en plus d'une déstabilisation du réseau microtubulaire, une altération de la localisation et de la distribution des mitochondries. En effet, l'hyperphosphorylation de tau impacte alors le transport axonal des mitochondries vers les synapses empêchant ainsi l'apport d'énergie au niveau synaptique et induisant par conséquent la perte synaptique (Kopeikina *et al.*, 2012 ; Kopeikina *et al.*, 2011 ; Cabezas-Opazo *et al.*, 2015). Les mécanismes de fusion et de fission mitochondriale ont également été montrés pour être altérés lors de la MA, notamment en raison des dysfonctionnements de la protéine tau et du peptide amyloïde (Wang *et al.*, 2009a). En effet, des études montrent que la protéine tau sous sa forme phosphorylée est capable d'interagir avec la protéine Drp1 afin d'augmenter les mécanismes de fragmentation des mitochondries altérant ainsi la fonction mitochondriale des neurones (Manczak and Reddy, 2012). Enfin, des travaux montrent que la protéine tau pourrait aussi impacter la fonctionnalité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale alors que le peptide A $\beta$  pourrait quant à lui altérer le complexe IV (Eckert *et al.*, 2014). De même, la réduction de l'expression de Drp1 semble avoir un effet protecteur contre les altérations mitochondriales et synaptiques normalement induites par l'hyperphosphorylation de tau (Kandimalla *et al.*, 2016).

L'ensemble de ces données montrent donc qu'au cours de la MA, la mise en place des altérations métaboliques peut à la fois impacter la pathologie tau et amyloïde mais que ces deux lésions peuvent également altérer les fonctions mitochondriales ainsi que le métabolisme glucidique, engendrant ainsi un cercle vicieux. Ces études montrent donc que le métabolisme énergétique semble jouer un rôle essentiel dans le développement de la MA. Il est très intéressant de noter qu'au sein des cellules, il existe un senseur énergétique crucial qui permet d'assurer le maintien des niveaux énergétiques intracellulaires et par conséquent la survie des cellules : il s'agit de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK). Après avoir introduit les trois caractéristiques qui se développent lors de la MA et qui nous intéressent pour notre étude, nous allons maintenant aborder le dernier chapitre de cette introduction qui aura pour but dans un premier temps de présenter des généralités sur l'AMPK. Puis dans un second temps, nous verrons que cette kinase est dérégulée dans de nombreuses pathologies neurodégénératives dont la MA.

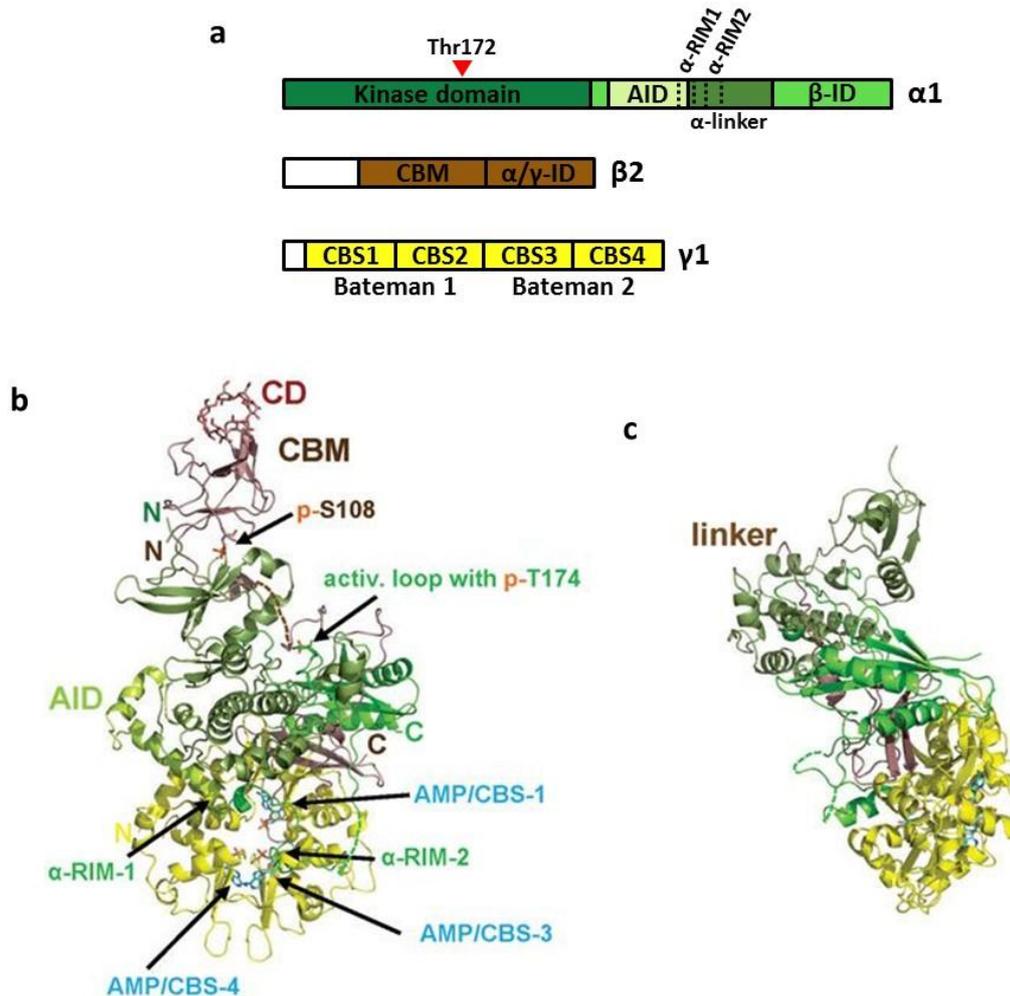
# Chapitre 3 : La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) : le senseur métabolique essentiel des cellules

## 1. Historique

La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) a été caractérisée pour la première fois en 1973 comme étant un enzyme responsable de la phosphorylation inhibitrice de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réductase), une protéine kinase impliquée dans la synthèse du cholestérol (Beg et al., 1973). Peu de temps après cette découverte, un autre enzyme nommé acétyl-CoA carboxylase kinase 3 (ACK3) fut reconnu pour être à l'origine de la phosphorylation de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) provoquant ainsi l'inhibition de la synthèse des acides gras (Carlson and Kim, 1973). Cependant, ce n'est qu'en 1987 que l'équipe du Dr DG Hardie mit en évidence que les kinases responsables de la phosphorylation inhibitrice de l'HMG-CoA réductase et de l'ACC correspondaient à un seul et même enzyme nommé deux ans plus tard AMPK (Carling et al, 1987).

## 2. Structure de l'AMPK

L'AMPK est une kinase très conservée au cours de l'évolution puisqu'elle est présente dans l'ensemble des organismes eucaryotes tels que les animaux, les plantes, les protistes et les levures (Hardie, 2008). On retrouve notamment des orthologues de l'AMPK nommés Snf1 (Sucrose nonfermenting 1) et Snf4 (Sucrose nonfermenting 4) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Celenza and Carlson, 1986)(Woods *et al.*, 1994). L'AMPK correspond à un hétérotrimère composé d'une sous-unité catalytique  $\alpha$  et de deux sous-unités régulatrices  $\beta$  et  $\gamma$  existant toutes les trois sous différentes isoformes ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  et  $\gamma 3$ ). Chez les mammifères, chacune de ces isoformes est codée par un gène distinct (*Prkaa1*, *Prkaa2*, *Prkab1*, *Prkab2*, *Prkag1*, *Prkag2* et *Prkag3*) pouvant ainsi mener théoriquement à la formation de 12 complexes hétérotrimériques différents dont les profils d'expression tissulaire et de localisation subcellulaire varient en fonction de leur composition (Gao *et al.*, 1996). Depuis plusieurs années, la réalisation d'étude cristallographique sur la structure de l'AMPK a permis de déterminer avec une plus grande précision les différents domaines qui composent l'ensemble de ces différentes sous-unités ainsi que leur rôle dans la régulation allostérique de l'AMPK par les différents adénosines nucléotides (*Figure 21*).



**Figure 21 : Structure cristallographique de l'AMPK sous sa forme phosphorylée et non phosphorylée.** (a) Schéma représentant les différentes régions de l'hétérotrimère  $\alpha 1\beta 2\gamma 1$  de l'AMPK. (b) Représentation graphique de l'AMPK cristallisée et liée à la cyclodextrine, un activateur de l'AMPK, montrant l'orientation des différentes sous-unités de l'AMPK visualisées dans le panel (a). (c) Représentation graphique de l'AMPK cristallisée et liée à l'AMP. AID : domaine d'autoinhibition ;  $\alpha$ -RIM : motif d'interaction à la sous-unité régulatrice  $\beta$ -ID : domaine d'interaction à la sous-unité  $\beta$ ,  $\alpha/\gamma$ -ID : domaine d'interaction aux sous-unités  $\alpha/\gamma$ . (Modifié d'après Li et al., 2014)

La sous-unité  $\alpha$  contient dans sa partie amino-terminale (N-ter) le domaine catalytique sérine/thréonine kinase qui correspond à la partie hautement conservée de l'enzyme et qui est suivi d'un domaine d'auto-inhibition (AID). La sous-unité  $\alpha$  possède également un motif d'interaction avec les deux sous-unités régulatrices nommé  $\alpha$ -linker. Ce dernier est constitué de deux domaines :  $\alpha$ -RIM1 et  $\alpha$ -RIM 2 qui jouent tous les deux un rôle essentiel dans la régulation allostérique de l'AMPK (*que nous détaillerons dans la partie 3.1.*) (Xin et al., 2013). L'extrémité carboxy-terminale (C-ter) possède quant à elle, une région nommée  $\alpha$ -CTD qui est nécessaire pour son association aux sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$  (Crute et al., 1998) ainsi qu'une séquence d'exportation nucléaire (Kazgan et al., 2010). Cette dernière présente une séquence similaire entre les deux isoformes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  et joue un rôle important dans la régulation de la localisation intracellulaire de l'AMPK. De plus, plusieurs sites de phosphorylation ont



été identifiés sur la sous-unité catalytique de l'AMPK dont le résidu thréonine 172 qui comme nous le verrons par la suite, joue un rôle essentiel dans l'activation de cette kinase (Xiao *et al.*, 2013)

Tout comme la précédente, la sous-unité  $\beta$  possède également dans sa partie carboxy-terminale un domaine  $\beta$ -CTD ainsi qu'une boucle  $\beta$  assurant l'interaction avec la partie  $\alpha$ -CTD de la sous-unité  $\alpha$  et la sous-unité  $\gamma$  respectivement. Ce domaine C-terminal joue un rôle crucial dans la régulation de l'activation de l'AMPK puisqu'il permet d'assurer la formation d'un complexe hétérotrimérique stable et fonctionnel (Hudson *et al.*, 2003 ; Polekhina *et al.*, 2003). La sous-unité  $\beta$  présente aussi dans sa partie centrale un domaine de liaison aux carbohydrates (CBM) qui permet à l'AMPK de se lier à la surface des particules de glycogène. Cependant, le rôle physiologique de cette liaison reste à ce jour assez incompris (Hudson *et al.*, 2003). Toutefois, des troncations réalisées dans cette séquence ont permis de montrer que celle-ci n'est pas nécessaire à la formation du complexe avec les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$ . Enfin, la partie N-terminale de la sous-unité  $\beta$  présente dans les 65 premiers acides aminés un site de myristoylation qui joue un rôle important dans la régulation de l'activité et de la localisation subcellulaire de l'AMPK. *Le rôle de ce site sera détaillé dans le paragraphe 3.2.2.*

Quant à la sous-unité  $\gamma$ , celle-ci est constituée dans sa partie amino-terminale d'un site de liaison pour la sous-unité  $\beta$  et dans sa région carboxy-terminale de deux domaines Bateman. Ces domaines correspondent à une répétition en tandem de quatre motifs répétés composés d'environ 60 acides aminés et nommés CBS1 à CBS4 (cystathionine- $\beta$ -synthase) (Bateman *et al.*, 1997). Chaque motif possède des sites de liaison pouvant théoriquement lier une molécule d'adénosine nucléotide sous la forme d'AMP, d'ADP et d'ATP ce qui permet ainsi à l'AMPK de détecter les changements des niveaux énergétiques de la cellule. Toutefois, il a été démontré que chez les mammifères, le site 2 est en permanence inoccupé même en présence de très forte concentration d'AMP ou d'ATP alors que le site 4 possède une très forte affinité pour l'AMP le rendant de ce fait constamment occupé par cette forme d'adénosine nucléotide (Xiao *et al.*, 2007). Contrairement aux deux sites précédents, les sites 1 et 3 de la sous-unité  $\gamma$  sont capables de lier de manière compétitive l'AMP, l'ADP et l'ATP conférant ainsi à l'AMPK son rôle de senseur énergétique cellulaire. Les régions faisant suite à la partie N-terminale des trois isoformes de la sous-unité  $\gamma$  diffèrent beaucoup en terme de taille, c'est pourquoi leurs séquences ne présentent que 30 % de similarités contrairement à celles des isoformes de la sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$  qui possèdent respectivement 74 % et 71 % de similitudes (uniprot, blast).

Etant donné que l'association des trois sous-unités de l'AMPK est requise pour moduler son activité, et que la sous-unité  $\alpha$  possède le domaine kinase nécessaire à son activation, des études ont été réalisées dans le but de générer des mutants de l'AMPK permettant d'induire soit une activation soit une inhibition constante de l'AMPK. Des troncations du domaine  $\alpha$ -CTF de la sous-unité  $\alpha$  ont de ce fait été effectuées dans le but d'empêcher à la sous-unité  $\alpha$  d'être reliée aux sous-unités régulatrices

et par conséquent d'être régulée par celles-ci. Il a ainsi été constaté que lorsque la troncation de la sous-unité  $\alpha$  a lieu en position 312 (AMPK $\alpha$  1-312) cela provoque une augmentation importante de l'activité de l'AMPK (Crute *et al.*, 1998 ; Crute *et al.*, 1998) la rendant ainsi constitutivement active. Cette forme que nous reverrons plus tard sera dénommée CA-AMPK (constitutively active form of AMPK). En revanche, la réalisation d'un dominant négatif nécessite l'utilisation de la mutagenèse dirigée dans le but de muter le site de phosphorylation thréonine 172 en alanine rendant ainsi l'AMPK non phosphorylable (Crute *et al.*, 1998). Par ailleurs, une autre forme mutée de la sous-unité  $\alpha$  est également utilisée afin de rendre l'AMPK catalytiquement inactive. Pour cela, la lysine 45 est mutée en arginine (mutant K45R)(Crute *et al.*, 1998). L'utilisation de ces trois types de constructions a ainsi permis de mettre en évidence certaines fonctions de l'AMPK dans des conditions physiologiques ainsi que dans certaines pathologies que nous reverrons par la suite.

### 3. Régulation de l'AMPK

#### 3.1. Régulation allostérique de l'AMPK

De par son rôle de senseur métabolique, l'activité de l'AMPK peut être régulée par le ratio AMP/ATP des cellules. Lorsque que les niveaux d'énergie cellulaire diminuent, on assiste à une élévation de la concentration intracellulaire des niveaux d'AMP. Ce phénomène est du dans un premier temps à l'hydrolyse des molécules d'ATP en ADP qui se produit lors de réactions anaboliques et qui induit une augmentation importante du ratio ADP/ATP. Ces molécules d'ADP sont ensuite métabolisées par l'adénosine kinase selon la réaction suivante :  $2 \text{ ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$  ce qui abouti ainsi à l'élévation du ratio AMP/ATP. L'AMP peut alors se lier à la sous-unité  $\gamma$  de l'AMPK entraînant un changement conformationnel de la kinase et provoquer son activation par trois voies différentes : 1) en induisant son activation allostérique qui augmente jusqu'à 10 fois le niveau d'activité de l'AMPK comparé à son état basal ; 2) en favorisant la phosphorylation de son résidu thréonine 172 localisé dans la boucle d'activation du domaine catalytique; 3) en protégeant cet épitope de la déphosphorylation par les phosphatases. Bien que la liaison de l'ADP ne permette pas l'activation allostérique de l'AMPK, il a été démontré que celle-ci permettait tout de même d'empêcher la déphosphorylation de l'AMPK. Toutefois, les études s'étant intéressées à ce mécanisme montrent que cet effet nécessite une concentration en ADP 10 fois plus importante que celle en AMP (Gowans *et al.*, 2013).

Les études de cristallographies réalisées sur la structure de l'AMPK ont permis une avancée considérable sur la compréhension des mécanismes régulant l'activation allostérique de l'AMPK. Il a ainsi été mis en évidence que dans des conditions où la concentration en ATP est importante dans la cellule, les domaines  $\alpha$ -RIM 1 et  $\alpha$ -RIM 2 ne sont pas liés aux motifs CBS 2 et CBS 3 de la sous-unité

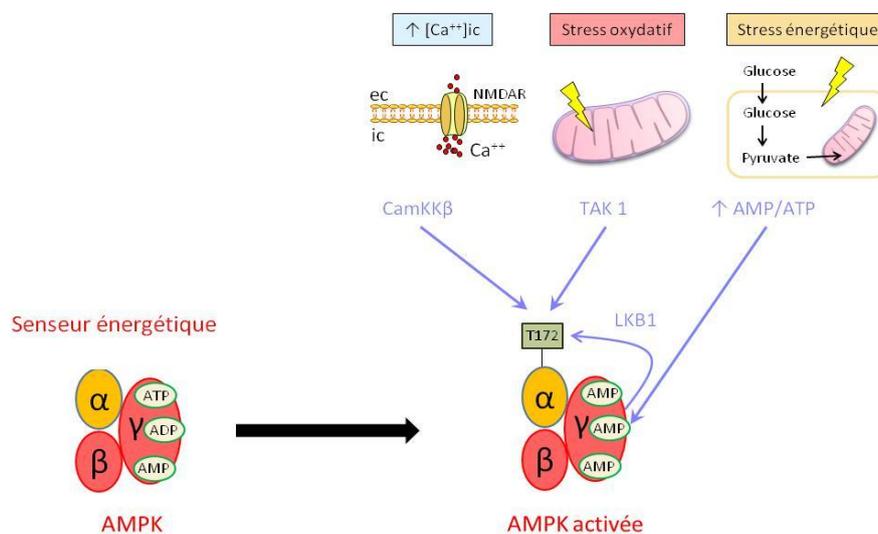
$\gamma$ . En effet, lorsque les séquences CBS 2 et CBS 3 sont liées à l'ATP, cela les rend incapables de recruter les domaines  $\alpha$ -RIM 1 et  $\alpha$ -RIM 2. L'AMPK adopte alors une conformation qui permet au domaine d'auto-inhibition (AID) de se lier directement au domaine kinase de la sous-unité  $\alpha$  et par conséquent d'aboutir à l'auto-inhibition de l'AMPK. En revanche, lorsque le ratio AMP/ATP est élevé dans la cellule, la liaison de l'AMP sur la sous-unité  $\gamma$  entraîne un changement conformationnel de l'AMPK et permettant ainsi aux domaines  $\alpha$ -RIM 1 et  $\alpha$ -RIM 2 de se lier avec les motifs CBS 2 et CBS 3 respectivement (Xin *et al.*, 2013 ; Chen *et al.*, 2012). Le domaine AID n'est alors plus capable d'interagir avec le domaine kinase et s'en dissocie lui permettant ainsi de se lier au motif  $\beta$ -CTD. Dans ces conditions, l'AMPK adopte alors une forme beaucoup plus compacte qui protège le résidu thréonine 172 de la déphosphorylation par les phosphatases. Des études de mutagenèse ont également permis de montrer que les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  jouent un rôle crucial dans la régulation allostérique de l'activité de l'AMPK. Il a par exemple été démontré que des mutations au niveau des sites  $\alpha$ -RIM 1,  $\alpha$ -RIM 2 ou CBS 2 entraînent une perte complète de la réponse de l'AMPK à l'AMP (Chen *et al.*, 2013) montrant l'importance de ces domaines pour la régulation allostérique de l'AMPK.

## 3.2. Régulation par les modifications post-traductionnelles

### 3.2.1. Régulation par phosphorylation et déphosphorylation

Bien que l'AMPK puisse être activée de façon allostérique, il existe également plusieurs modifications post-traductionnelles qui permettent de réguler son activité telles que la phosphorylation et la déphosphorylation. Lorsqu'elle est couplée à l'activation allostérique, la phosphorylation de l'AMPK permet d'augmenter son niveau d'activité de 1000 fois comparé à son état basal. Différentes kinases sont capables de phosphoryler le résidu thréonine 172 de l'AMPK. L'enzyme LKB1 fut le premier à avoir été identifié comme étant une kinase régulant l'activité de l'AMPK (Woods *et al.*, 2003 ; Hawley *et al.*, 2003). LKB1 est un hétérotrimère composé de deux autres protéines : STRAD (STE-20-related adaptor protein) qui possède une activité catalytique et MO25 (mouse protein 25) qui permet la stabilisation de ce complexe. Bien que le rôle physiologique de LKB1 soit encore peu clair aujourd'hui, des études ont montré que LKB1 correspondait à un gène suppresseur de tumeur. En effet, de nombreuses mutations qui provoqueraient une perte de fonction de ce gène ont été mises en évidence pour induire le syndrome de Peutz-Jeghers (Jenne *et al.*, 1998). Toutefois, il ne semble pas y avoir de lien entre cette pathologie et l'AMPK puisque LKB1 est également capable de réguler l'activité de 12 autres kinases apparentées à l'AMPK (Lizcano *et al.*, 2004). De plus, LKB1 n'est pas régulée par les niveaux énergétiques mais semble être constitutivement activée dans le cytoplasme des cellules. Ainsi, lors de l'augmentation du ratio AMP/ATP, c'est le changement de conformation de l'AMPK induit par la liaison de l'AMP sur sa sous-unité  $\gamma$  qui permet sa phosphorylation par LKB1 et par conséquent son activation. Bien que la LKB1 soit la principale kinase de l'AMPK, il existe

également deux autres enzymes capables d'induire la phosphorylation de l'AMPK : CamKK $\beta$  (Ca<sup>2+</sup>/calmoduline kinase kinase  $\beta$ ) et TAK1 (Transforming growth factor  $\beta$  activated kinase1), une protéine appartenant à la famille des mitogen activated protein kinase (MAPK) kinase kinase 7 (Figure 22). La CamKK $\beta$  est activée en réponse à une élévation de la concentration intracellulaire de calcium et cela de façon indépendante du niveau énergétique cellulaire (Woods *et al.*, 2003 ; Hawley *et al.*, 2003 ; Hurley *et al.*, 2005) alors que les conditions dans lesquelles TAK1 régule l'état de phosphorylation de l'AMPK restent à ce jour peu claires bien qu'elles semblent faire intervenir le stress oxydant (Momcilovic, Hong and Carlson, 2006). La sous-unité  $\beta$  possède également des sites de phosphorylation tels que les sérines 24/25 (présentes uniquement sur la sous-unité  $\beta$ 1), la sérine 108 et la sérine 182 qui une fois phosphorylées permettent de réguler le niveau d'activité de l'AMPK ainsi que sa localisation subcellulaire (Mitchell *et al.*, 1997)(Warden *et al.*, 2001). Outre la phosphorylation, la déphosphorylation de l'AMPK joue également un rôle majeur dans la régulation de son activité. Il a en effet été démontré que l'AMPK pouvait être inactivée en subissant une déphosphorylation de son résidu thréonine 172 par des protéines phosphatases appartenant à la famille des metal dependent protein phosphatase (PPM) nommées PP2A et PP2C $\alpha$  (Matthew J. Sanders *et al.*, 2007).



**Figure 22 : Mécanismes de régulation de l'activation de l'AMPK.** L'AMPK est un senseur métabolique pouvant être activé en réponse à différents stress. En effet, l'AMPK est activée en condition de stress énergétique du fait de l'augmentation du ratio AMP/ATP. L'AMP se lie alors sur sa sous-unité  $\gamma$  provoquant un changement de conformation et permettant par conséquent sa phosphorylation par des kinases dont LKB1. L'AMPK est également activée en réponse à une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire via l'activation de la CamKK $\beta$  et potentiellement, suite à un stress oxydatif via la kinase TAK1. Son activation implique la phosphorylation de sa thréonine 172.

### 3.2.2. Régulation par myristoylation

Une autre modification post-traductionnelle capable de moduler l'activité de l'AMPK est la N-myristoylation. Celle-ci correspond à l'ajout d'un acide myristique au niveau de la glycine en position 2 d'une protéine et qui après activation en groupement myristoyl-coA peut former une liaison amide irréversible avec cette protéine. Cette réaction est catalysée par l'enzyme N-myristoyltransférase (NMT) et permet généralement d'ancrer une protéine à une membrane cellulaire ou de l'adresser vers un autre compartiment cellulaire. Il a été mis en évidence que les sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 2$  de l'AMPK peuvent être myristoylées ce qui leur permet de moduler l'activité ainsi que la localisation subcellulaire de l'AMPK (Sanz et al, 2013). En effet, des études utilisant un mutant possédant la substitution Gly-2-Ala au niveau de la sous-unité  $\beta$  (empêchant sa myristoylation) indique que la myristoylation de la sous-unité  $\beta$  semble avoir un effet inhibiteur sur l'activation de l'AMPK et permettre ainsi de maintenir l'AMPK dans une conformation inactive. Cependant, d'autres travaux ont montré que cette modification post-traductionnelle pouvait en revanche améliorer la capacité qu'a l'AMP d'activer l'AMPK de façon allostérique. En effet, lors d'un stress métabolique, l'AMP stimule la myristoylation de la sous-unité  $\beta$  qui dans ces conditions, permet la phosphorylation et par conséquent l'activation maximale de l'AMPK (Oakhill *et al.*, 2010). Ces résultats montrent ainsi que le groupement myristoyl facilite l'activation allostérique par l'AMP de l'AMPK et joue un rôle important dans la transduction de la signalisation induite par un stress métabolique.

### 3.3. Régulation par le lysosome

Récemment, des études ont permis de mettre en évidence qu'une nouvelle voie est capable de réguler l'activité de l'AMPK à travers un mécanisme indépendant de la concentration en ATP et AMP : il s'agit de la voie lysosomale (Zhang *et al.*, 2014 ; Zhang *et al.*, 2016). En effet, ces études suggèrent que l'AMPK pourrait détecter une privation en glucose via un processus faisant intervenir le complexe Ragulator ainsi que la v-ATPase lysosomale présents à la surface du lysosome. Dans cette voie, un stress énergétique d'origine glucidique provoquerait un détachement entre les enzymes glycolytique fructose-1,6-bisphosphate et l'aldolase, qui est connue pour normalement se lier à la v-ATPase. L'ensemble de ce processus induit alors la liaison du complexe LKB1/axin avec les protéines Ragulator et v-ATPase. Une fois recrutée à la membrane lysosomale, LKB1 peut phosphoryler l'AMPK et par conséquent l'activer au niveau du lysosome. Toutefois, les fonctions de l'AMPK au niveau du lysosome ne sont à ce jour pas connues (Hardie, 2018).

### 3.4. Activateurs et inhibiteurs de l'AMPK

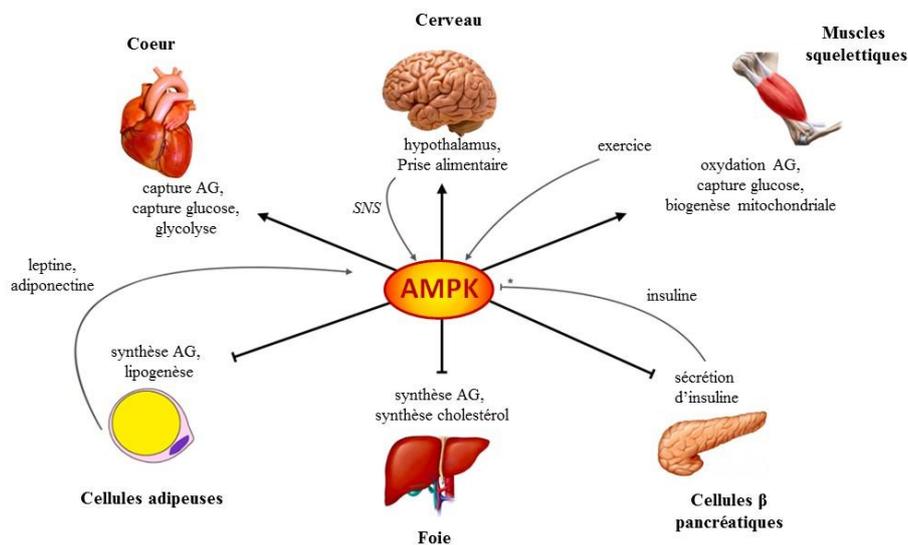
Il existe un grand nombre de molécules permettant de moduler l'activité de l'AMPK et qui peuvent par conséquent être utilisées pour analyser ses fonctions. En effet, il existe trois types de molécules pouvant activer l'AMPK : les molécules dérivées des plantes telles que les polyphénols (resvératrol, berbérine), l'acide salicylique, la galégine et la metformine (dérivée de la galégine) ; les pro-drogues qui sont converties en analogue de l'AMP dont l'AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) et le C2/C13 et les activateurs directs tels que la GSK 621, l'A769662, le composé 991 ou encore MT 63-78 (*Tableau 1*). Bien qu'il existe une multitude de molécules activant l'AMPK il n'en existe en revanche qu'une seule capable de l'inhiber, il s'agit de la dorsomorphine également appelé composé C (*Tableau 1*).

	Molécule	Direct/Indirect	Mode d'action	Référence(s)
<b>ACTIVATEURS</b>	<b>Resvératrol</b>	Indirect	Inhibe l'ATP synthase mitochondriale	(Dasgupta and Milbrandt 2007)
	<b>Metformine</b>	Indirect	Inhibe le complexe 1 de la chaîne respiratoire mitochondriale	(Owen, Doran and Halestrap, 2000)
	<b>AICAR</b>	Indirect	Converti en un analogue de l'AMP (ZMP) : activation allostérique + inhibition de la déphosphorylation	(Corton <i>et al.</i> , 1995)
	<b>C2/C13</b>	Indirect	Converti en un analogue de l'AMP (C2) : activation allostérique + inhibition de la déphosphorylation	(Gómez-Galeno <i>et al.</i> , 2010)
	<b>GSK 621</b>	Direct	Interaction avec la SU $\beta$	(Chen <i>et al.</i> 2016)
	<b>A769662</b>	Direct	Interaction avec la SU $\beta$ 1 : activation allostérique + inhibition de la déphosphorylation	(Matthew J Sanders <i>et al.</i> , 2007)
	<b>Composé 991</b>	Direct	Interaction avec la SU $\beta$ 1 : activation allostérique + inhibition de la déphosphorylation	(Xiao <i>et al.</i> , 2013)
	<b>Acide salicylique</b>	Direct	Interaction avec la SU $\beta$ 1 + activation allostérique + inhibition de la déphosphorylation	(Hawley <i>et al.</i> , 2012)
<b>INHIBITEUR</b>	<b>Dorsomorphine / Composé C</b>	Direct	Inhibiteur compétitif pour la poche catalytique pour l'ATP	(Zhou <i>et al.</i> , 2001)

**Tableau 1 : Liste non exhaustive des activateurs et inhibiteur de l'AMPK avec leur mode d'action.**

## 4. Fonctions de l'AMPK dans le système nerveux central (SNC)

Après avoir vu comment l'AMPK était régulée dans la cellule, nous allons maintenant nous intéresser aux fonctions que possède cette kinase. Tout d'abord, il faut savoir que l'AMPK est exprimée dans un grand nombre de tissus périphériques incluant les muscles squelettiques, le foie, le cœur, le tissu adipeux ou encore le pancréas (Viollet *et al.*, 2010) (Figure 23). Toutefois, il a été mis en évidence que l'AMPK était également exprimée dans le cerveau au sein duquel son expression est majoritairement neuronale (Turnley *et al.*, 1999) bien qu'on la retrouve aussi très faiblement exprimée dans la microglie et les astrocytes activés (Turnley *et al.*, 1999 ; Ramamurthy and Ronnett, 2006). L'AMPK possède des rôles très variés en fonction des isoformes qui la composent et des tissus dans lesquelles elle est exprimée (Carling, 2004a). En effet, une fois activée, l'AMPK a pour principale fonction de rétablir les niveaux énergétiques de la cellule. Pour se faire, l'AMPK phosphorylée, et donc activée, est capable de stimuler de nombreuses voies cataboliques productrices d'ATP telles que la glycolyse, la biogenèse mitochondriale ou la recapture du glucose (via la translocation du transporteur de glucose GLUT4) tout en réprimant les voies anaboliques consommatrices d'énergie telles que la synthèse protéique (via l'inhibition du complexe mTOR (mammalian Target of rapamycin)), la synthèse d'acides gras (via la phosphorylation inhibitrice de l'ACC) et celle du cholestérol (Carling, 2004b). Les principales fonctions de l'AMPK sont présentées en Figure 23. Cependant, au cours de ce projet de thèse, nous nous intéresserons principalement aux rôles que possède l'AMPK dans le système nerveux central.



**Figure 23 : Diagramme des principales fonctions métaboliques de l'AMPK au niveau périphérique et central.** Les adipokines sécrétées par les adipocytes (leptine et adiponectine) activent l'AMPK afin de stimuler l'oxydation des AG dans le foie et le muscle. L'activation de l'AMPK dans le muscle via la leptine implique le système nerveux sympathique. L'AMPK inhibe la sécrétion de l'insuline produite par les cellules β du pancréas alors que l'insuline inhibe l'AMPK dans le tissu cardiaque et l'hypothalamus. Au niveau de l'hypothalamus, l'AMPK joue un rôle dans la régulation de la prise alimentaire. AG = acides gras ; SNS = système nerveux sympathique. (Modifié d'après Marín-Aguilar *et al.*, 2017).

## 4.1. Rôle dans la régulation de la prise alimentaire

Bien que la majorité des études menées sur l'AMPK se soit principalement intéressées à son rôle en périphérie, il a été démontré que l'AMPK jouait également un rôle de senseur métabolique dans le système nerveux central et qu'elle permettait notamment, de réguler la prise alimentaire au niveau de l'hypothalamus (Minokoshi *et al.*, 2004). L'hypothalamus correspond à une structure cérébrale neuroendocrine composée de nombreux noyaux qui joue un rôle fondamental dans l'intégration des signaux périphériques tels que les hormones ou les signaux nerveux. De part son rôle de centre intégrateur, l'hypothalamus régule donc de nombreuses fonctions telles que l'homéostasie énergétique et la prise alimentaire. En effet, lorsque les niveaux énergétiques périphériques sont suffisants, des signaux anorexigènes (leptine, insuline) y sont envoyés afin de réduire la prise alimentaire tandis que dans des conditions de jeûne, des signaux cette fois-ci orexigènes (ghréline) y sont acheminés dans le but de stimuler la prise alimentaire. L'implication de l'AMPK dans cette fonction physiologique a été découverte en 2004 par les groupes de Minokoshi et d'Andersson. Il a dans un premier temps, été mis en évidence que les stimuli orexigènes sont capables de stimuler l'activité de l'AMPK alors que ceux anorexigènes l'inhibent. Afin de déterminer l'implication de l'AMPK dans la régulation de la prise alimentaire, des approches pharmacologiques et génétiques ont ensuite été effectuées. Une augmentation de la prise alimentaire ainsi que du poids corporel a ainsi été observée chez des rats ayant reçus une injection intracérébroventriculaire d'AICAR, un activateur connu de l'AMPK (Andersson *et al.*, 2004) ou ayant été infectés au niveau de l'hypothalamus avec une forme constitutivement active de l'AMPK (Minokoshi *et al.*, 2004). A l'inverse, des injections de leptine dans l'hypothalamus provoque une diminution de l'activation de l'AMPK hypothalamique ainsi qu'une réduction de la prise alimentaire et du poids corporel (Minokoshi *et al.*, 2004). L'ensemble de ces données montrent qu'au sein de l'hypothalamus, l'AMPK joue un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire puisqu'au cours d'un jeûne, on constate qu'elle va être activée afin de restaurer les niveaux énergétiques du corps alors qu'après un repas, l'AMPK se retrouve au contraire inhibée dans le but de réduire la prise alimentaire.

## 4.2. Rôle dans le développement et la différenciation

### 4.2.1. Rôle dans le développement cérébral

Outre son rôle dans la régulation de la prise alimentaire, l'AMPK neuronale a également été montrée pour jouer un rôle dans le développement cérébral. L'implication de l'AMPK dans ce processus a été mise en évidence grâce à des expérimentations effectuées chez le modèle *Drosophila*. La drosophile est un modèle intéressant pour étudier les fonctions de l'AMPK puisque contrairement aux mammifères où chaque isoforme est codée par un gène distinct, chez la drosophile il n'existe que

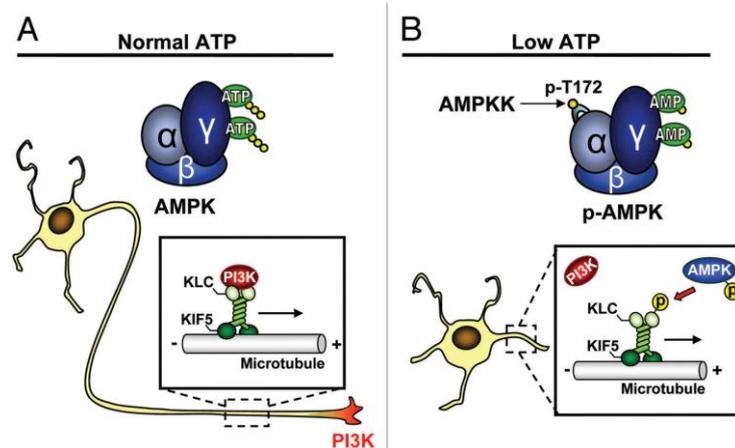


trois gènes codant chacun pour une des trois sous-unités de l'AMPK (Pan and Hardie, 2002). La réalisation d'un mutant pour la sous-unité  $\beta$  de l'AMPK, dénommé *alicorn* (*alc*), a ainsi permis de montrer que l'inhibition de l'expression de cette sous-unité provoque une dégénérescence rapide et importante des photorécepteurs présents au niveau de la rétine. Toutefois, comme cette dégénérescence se produit uniquement après la différenciation des neurones, cela suggère que l'AMPK joue un rôle essentiel dans le maintien des neurones matures plutôt que dans leur développement (Spasic et al., 2008). Le même phénotype a également été observé chez la drosophile *löchrig* (*loe*), au sein de laquelle la sous-unité  $\gamma$  de l'AMPK est fortement altérée (Tschäpe et al., 2002). Enfin, une étude réalisée cette fois-ci chez la souris par le groupe de Dasgupta, a permis de mettre en évidence l'implication de l'AMPK dans le développement neuronal. En effet, en utilisant un modèle murin transgénique pour la sous-unité  $\beta 1$  de l'AMPK, ils ont montré que celles-ci présentaient des anomalies structurales et fonctionnelles au niveau cérébral, dont notamment des atrophies de certaines régions cérébrales (hippocampe, cervelet) et une perte massive des neurones dans le système nerveux central (SNC). De plus, ces altérations ont été montrées pour être dues à une diminution de l'activité de l'AMPK et plus précisément à une réduction de la phosphorylation par l'AMPK de la protéine du rétinoblastome (Dasgupta and Milbrandt, 2009). Toutefois, la réalisation d'autres modèles murins transgéniques pour la sous-unité  $\beta 1$  n'ont pas permis de reproduire ce phénotype à ce jour (Dzamko et al., 2010). L'ensemble de ces données rend ainsi difficile l'élucidation du rôle que peut avoir l'AMPK dans le développement neuronal.

#### 4.2.2. Rôle dans la polarité neuronale

La polarisation des neurones est un processus essentiel du développement neuronal puisqu'elle permet d'assurer un transport efficace de l'information nerveuse permettant ainsi par la suite la formation des synapses et par conséquent, la fondation d'un réseau neuronal complexe et fonctionnel. La polarisation est initiée par la croissance rapide d'un prolongement neuronal appelé neurite qui deviendra l'axone. Ce dernier est reconnaissable des autres prolongements appelés dendrites, de part sa taille considérable par rapport aux autres neurites. La croissance de l'axone nécessite énormément d'énergie, et ce dans le but de produire les protéines nécessaires à son élongation. Il n'est donc pas surprenant que l'AMPK puisse jouer un rôle dans ce processus. En effet, des études effectuées dans des cultures primaires de neurones d'hippocampes montrent que lorsque celles-ci sont traitées avec l'activateur de l'AMPK, AICAR ou infectées avec le constitutif actif de l'AMPK, cela provoque une réduction de la taille de l'axone ainsi qu'une perte de la polarisation neuronale (Amato et al., 2011). Par ailleurs, au cours de la polarisation des neurones, la protéine PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) est transportée jusqu'à l'extrémité du futur axone grâce au moteur moléculaire Kif5 (Kinesin-related protein 5) provoquant ainsi un enrichissement de la PI3K qui est nécessaire pour promouvoir la polarisation neuronale. Or, il a été démontré que, dans des conditions de stress énergétique, l'AMPK

inhibe ce transport en phosphorylant les chaînes légères de la kinésine Kif 5 causant ainsi la dissociation entre la PI3K et Kif5 et par conséquent son maintien dans le compartiment somatique (Amato *et al.*, 2011) (Figure 24). D'autres études utilisant des approches génétiques dans le but de réprimer l'expression des sous-unités catalytiques de l'AMPK ont également permis de montrer que dans des conditions basales, l'AMPK n'induit pas l'inhibition de la formation de l'axone. En revanche, lors d'un stress énergétique induit avec l'AICAR ou la metformine, l'induction de l'activation de l'AMPK par ces composés empêche l'axonogenèse. En effet, suite à son activation l'AMPK stimule le complexe TSC1/2 qui à son tour inhibe le complexe mTOR (mammalian Target of rapamycin) et de ce fait, la synthèse des protéines nécessaires pour la formation de l'axone (Williams *et al.*, 2011). L'implication de l'AMPK dans la polarisation neuronale a aussi été retrouvée chez un modèle de *Drosophila melanogaster* présentant une invalidation du gène de l'AMPK (Lee *et al.*, 2007). Enfin, bien que les précédentes études aient montré un lien entre l'activation de l'AMPK dans des conditions de stress énergétiques et l'inhibition de l'axonogenèse uniquement, une étude plus récente a mis en évidence que l'AMPK pouvait aussi empêcher l'arborisation neuronale et la croissance des dendrites en plus de celle axonale et ce au cours des différents stades de développement neuronal (Ramamurthy *et al.*, 2014). Ces études semblent ainsi montrer que dans des conditions de stress énergétiques, l'activation de l'AMPK provoque l'inhibition des processus coûteux en énergie tel que la polarisation des neurones dans le but de préserver/maintenir les niveaux énergétiques des neurones.



**Figure 24 : Mécanisme d'action de l'AMPK dans la polarité axonale.** Dans des conditions normales (*gauche*), la protéine PI3K est transportée aux extrémités des neurites grâce à la protéine motrice Kif5, afin de promouvoir la signalisation à l'origine de la croissance axonale. En condition de stress énergétique (*droite*), l'AMPK est activée et phosphoryle les chaînes légères (KLC) de Kif5 provoquant la dissociation entre la KLC et la PI3K et empêchant par conséquent le transport de la PI3K aux extrémités des neurites. (D'après Amato *et al.*, 2012).

### 4.2.3. Rôle dans le remodelage synaptique

En plus de ses fonctions dans le développement neuronal, l'AMPK joue aussi un rôle dans le cerveau adulte. Au cours du vieillissement, de nombreux changements ont lieu au niveau du système nerveux central telle que l'altération des fonctions neuronales qui est majoritairement due à des dysfonctionnements synaptiques. Afin d'étudier ces altérations synaptiques, le groupe de *Samuel et al.* a utilisé comme modèle les synapses de la rétine externe de l'œil. Ces synapses ont comme particularité d'être beaucoup plus larges que celles présentes au niveau cérébral et de subir des altérations liées à l'âge à la fois chez le rongeur et chez l'humain. En effet, contrairement aux souris jeunes qui présentent des synapses au niveau de la couche plexiforme externe de la rétine, chez les souris âgées on observe la formation de synapses ectopiques en dehors de cette couche. Grâce à l'utilisation de ce modèle, il a été mis en évidence que ce remodelage synaptique menant à la formation de synapses ectopiques était accompagné par une diminution du niveau de LKB1 et de l'AMPK sous sa forme active (*Samuel et al.*, 2014). De plus, la répression de l'expression de l'AMPK et de LKB1 chez des souris jeunes induit également des défauts rétinien similaires à ceux observés chez les souris adultes montrant ainsi que la voie de signalisation LKB1/AMPK joue un rôle important dans le maintien des synapses de la rétine.

## 4.3. Rôle dans les fonctions cognitives, la mémoire, la plasticité synaptique

### 4.3.1. Effets de l'activation périphérique de l'AMPK sur la mémoire

Il est connu que l'activité physique joue un rôle bénéfique dans les fonctions cognitives telles que la mémoire et l'apprentissage (*Hillman et al.*, 2008). Etant donné que l'exercice physique nécessite énormément d'énergie et que le métabolisme énergétique musculaire est régulé par l'AMPK, certains chercheurs se sont demandés si l'AMPK pouvait jouer un rôle dans les effets bénéfiques que procurent l'exercice sur la mémoire. Des études réalisées par le groupe de *van Praag* ont permis de mettre en évidence que l'administration par injections intrapéritonéales (IP) d'AICAR durant 3 jours chez des jeunes (5 à 7 semaines) souris sédentaires permet d'améliorer la mémoire spatiale ainsi que l'endurance de ces souris (comparé à des souris non injectées) (*Kobilo et al.*, 2014 ; *Kobilo et al.*, 2011). En revanche, chez des souris âgées de 23 mois, il faut augmenter la durée des injections IP à 14 jours pour pouvoir retrouver cet effet bénéfique sur la mémoire montrant ainsi que les effets de l'AICAR sont dépendant de la durée du traitement et de l'âge des souris. De plus, des injections IP d'AICAR ont également été effectuées chez des souris transgéniques déficientes pour la sous-unité  $\alpha 2$  de l'AMPK ( $AMPK\alpha 2^{-/-}$ ) musculaire et ont permis de montrer que dans ces conditions, l'AICAR n'induit plus son effet protecteur sur la mémoire laissant ainsi suggérer que cet effet passe par l'AMPK au niveau musculaire ) (*Kobilo et al.*, 2014). Une analyse de l'expression de certains gènes a

également été effectuée par microarray et a révélé que dans l'hippocampe l'expression des gènes impliqués dans le développement et la plasticité neuronale dont notamment le BDNF est augmentée (Guerrieri and van Praag, 2015 ; Kim and Leem, 2016). Ces données sont consistantes avec les résultats montrant que lorsque l'AICAR est injecté durant une courte période (7 j) chez des jeunes souris, cela améliore la neurogenèse hippocampique en plus de la mémoire spatiale cependant, si les injections sont effectuées durant 14 j, ces effets sont perdus (Kobilo et al, 2011). On voit donc qu'en fonction de l'âge des souris et du temps d'administration du traitement, l'AICAR ne va pas avoir les mêmes effets. De plus, comme l'activateur AICAR a une très faible perméabilité pour passer à travers la barrière hémato encéphalique (BHE) (Marangos *et al.*, no date), l'ensemble des résultats bénéfiques observés sur les fonctions cognitives semble plutôt être un effet indirect. Ces effets pourraient en effet être dus au relargage de myokines par le muscle (e.g. BDNF) qui peuvent passer à travers la BHE, accéder à l'hippocampe et ainsi induire l'amélioration des fonctions cognitives.

Outre l'exercice physique, la restriction calorique a également été montrée pour provoquer un effet bénéfique sur la mémoire. En effet, il a été mis en évidence que le fait d'induire une légère restriction calorique de 30 % chez des souris provoque une augmentation du niveau de phosphorylation de l'AMPK neuronale et permet d'améliorer les performances mnésiques de ces souris lors d'un test de mémorisation spatiale (Morris Water Maze) via la modulation de la voie AMPK/mTORC1 (Ma *et al.*, 2018). Ces mêmes résultats ont également été montrés dans une étude de Dagon *et al.* (Dagon *et al.*, 2005). Toutefois, au cours de cette même étude, il est montré qu'une forte restriction calorique de 60 % a pour conséquence d'entraîner une augmentation plus importante de l'activité de l'AMPK provoquant cette fois-ci une altération des performances cognitives ainsi qu'une apoptose neuronale. Ces effets sont également retrouvés lorsqu'ils injectent par IP l'AICAR durant 10 jours (Dagon *et al.*, 2005).

L'ensemble de ces données montrent que la modulation pharmacologique de l'activité de l'AMPK pourrait jouer un rôle dans la modulation des fonctions cognitives et qu'en fonction de son temps d'activation, l'AMPK peut avoir des effets bénéfiques ou néfastes sur la mémoire. Par ailleurs, il est important de noter que dans ces travaux, seules des administrations périphériques de l'activateur de l'AMPK ont été effectuées. D'autres études visant à établir l'impact de l'AMPK sur la mémoire se sont intéressées à étudier l'effet d'une administration d'AICAR au niveau central sur les fonctions cognitives.

#### *4.3.2. Effets d'une activation centrale de l'AMPK sur la mémoire*

Bien que la majeure partie des travaux consistant à administrer de l'AICAR par voie périphérique montrent que l'activation de l'AMPK pourrait avoir des effets bénéfiques sur la mémoire,

d'autres études visant à activer l'AMPK au niveau central semblent à l'inverse mettre en évidence que l'activation de l'AMPK neuronale pourrait avoir un impact négatif sur les fonctions cognitives. Il a par exemple été démontré que le fait de réaliser chez des souris des infusions intra-hippocampiques d'AICAR durant des tests de mémorisation spatiale altère de façon significative leur performance à mémoriser l'emplacement d'une plateforme cachée (Dash et al, 2006). Ces résultats sont également observés lors d'infusions intra-hippocampiques avec un inhibiteur de la voie mTORC1 : la rapamycine. En revanche, l'administration de glucose qui provoque par conséquent l'inhibition de l'AMPK neuronale induit quant à elle une amélioration de la mémoire spatiale à long terme des souris. Par ailleurs, des résultats similaires ont également été obtenus en utilisant un autre type de test mnésique cité précédemment et dénommé le conditionnement contextuel par la peur. En effet, lorsqu'un conditionnement contextuel par la peur est effectué chez une souris, celui-ci provoque une diminution de l'activité de l'AMPK et une stimulation du complexe mTORC1 dans la région CA1 de l'hippocampe (Han *et al.*, 2016). Cependant, lorsque des souris sont infusées avec la forme constitutivement active de l'AMPK ou avec AICAR, cela provoque une altération de leur mémorisation par la peur à long terme qui est associée à une inhibition de la voie mTORC1 (Han *et al.*, 2016). Ces données semblent ainsi montrer que dans le cerveau, l'AMPK pourrait être un régulateur négatif de la plasticité neuronale et de la mémorisation par la peur. Enfin, l'AMPK a également été montrée pour jouer un rôle néfaste sur la phase tardive de la potentialisation à long terme (L-LTP) qui nécessite la formation de protéines par la voie mTORC1. En effet, des études d'électrophysiologie menées à partir de coupes d'hippocampes incubées ou non avec des drogues permettant d'activer l'AMPK telles que le 2-deoxyglucose, la metformine et l'AICAR ont mis en évidence que l'activation d'AMPK dans ces conditions empêche le maintien de la L-LTP mais ne joue pas sur la précoce (E-LTP) qui elle ne nécessite que la synthèse protéique *de novo* (Potter *et al.*, 2010).

## 5. Rôle de l'AMPK dans les maladies neurodégénératives

La régulation du métabolisme énergétique est un processus essentiel pour le bon fonctionnement des neurones et qui, comme nous venons de le voir, fait intervenir la protéine AMPK. Il n'est donc pas étonnant de constater que dans de nombreuses pathologies où ont lieu des altérations du métabolisme énergétique, se produit également une altération de l'activité de l'AMPK. L'AMPK est en effet dérégulée dans un grand nombre de maladies neurodégénératives dont les principales sont : la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington et la sclérose latérale amyotrophique (SLA). Ces pathologies présentent toutes des altérations du métabolisme énergétique et sont également caractérisées par des accumulations intra-neuronales de protéines agrégées et/ou mal conformées. Au cours de cette introduction, nous décrirons principalement l'implication de la dérégulation de l'AMPK

dans la MA. Toutefois, l'implication de l'AMPK dans l'ensemble de ces pathologies neurodégénératives a fait l'objet d'une revue que nous avons publié et qui est présentée en **Annexe 2**.

## 5.1. Implication de l'AMPK dans le développement de la maladie d'Alzheimer

### 5.1.1. Rôle de l'AMPK dans le métabolisme de l'APP

Depuis plusieurs années, il a été émis l'hypothèse que l'AMPK pourrait jouer un rôle dans le développement physiopathologique de la MA. En effet, des études ont montré que l'AMPK peut moduler la pathologie amyloïde et notamment le métabolisme de l'APP. Une diminution de la production du peptide A $\beta$  a été observée dans des cultures primaires de neurones traitées avec l'AICAR, un activateur de l'AMPK, alors qu'une augmentation des niveaux d'A $\beta$  a été mise en évidence dans des cultures neuronales présentant une délétion de la sous-unité  $\alpha 2$  de l'AMPK (Won *et al.*, 2010). Des travaux ont également mis en évidence que le traitement de cultures primaires neuronales avec du resvératrol, un polyphénol activant indirectement l'AMPK, provoque l'activation de l'AMPK via la kinase CaMKK $\beta$  ce qui a alors pour conséquence de promouvoir la dégradation lysosomale du peptide A $\beta$  via la stimulation de la voie de l'autophagie (Vingtdeux *et al.*, 2010 ; Vingtdeux, *et al.*, 2011b). Ces résultats ont également été confirmés *in vivo* chez la souris, via l'administration orale de resvératrol au cours de ces mêmes études. A l'inverse, des études effectuées par le groupe de Chen *et al.* montrent que l'activation de l'AMPK via la metformine provoque une augmentation de la transcription de BACE1 induisant ainsi une augmentation des niveaux d'A $\beta$  (Chen *et al.*, 2009). Toutefois, dans des conditions de privation d'énergie, ils constatent que la metformine perd sa capacité à stimuler la transcription de BACE1 et donc d'augmenter les niveaux d'A $\beta$  (Chen *et al.*, 2009). Les effets de l'AMPK sur la clairance du peptide amyloïde semblent donc pouvoir être modulés selon le statut énergétique des cellules. L'activation de l'AMPK via la metformine dans des modèles murins transgéniques pour la pathologie amyloïde (APP/PS1) semble aussi améliorer les déficits cognitifs et aurait un effet neuroprotecteur via la régulation des voies AMPK/mTOR/S6K/Bace1 et AMPK/P65 NF- $\kappa$ B dans l'hippocampe (Ou *et al.*, 2018). Enfin, le traitement de neurones avec la berberine, un autre activateur indirect de l'AMPK, réduit la formation d'A $\beta$  et diminue l'expression de BACE1 en culture primaire et N2A/APP695sw (Zhang *et al.*, 2017) et contribue à améliorer la mémoire des patients atteints de la MA. De plus, l'administration de resvératrol dans un modèle de souris triple transgénique pour la MA a été montrée pour améliorer les déficits cognitifs (Corpas *et al.*, 2018). Ces études laissent suggérer que l'activation de l'AMPK pourrait avoir un effet bénéfique sur l'élimination du peptide A $\beta$  et de ses agrégats notamment via l'induction de la voie de l'autophagie. Toutefois, il est important de noter que lors des stades tardifs de la MA, les voies de dégradation sont altérées (Nixon and Yang, 2011). En effet, malgré le fait que

l'initiation de l'autophagie puisse être stimulée via l'AMPK, le flux autophagique est quant à lui altéré et mène ainsi à une accumulation d'autophagosomes contenant des protéines agrégées telles que A $\beta$  et tau (Pickford *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2010).

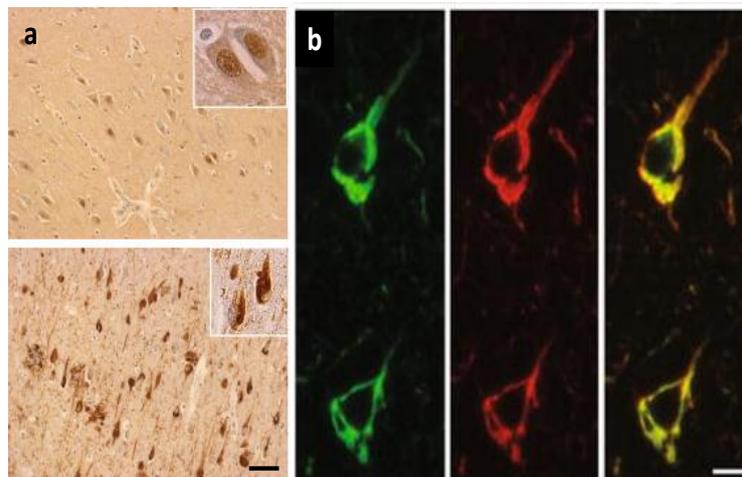
Bien que ces études montrent que l'AMPK est capable de réguler le métabolisme de l'APP, il a également été reporté dans la littérature, que le peptide A $\beta$  peut impacter l'activité de l'AMPK afin de promouvoir ses effets synaptotoxiques. En effet, il a été démontré que la perte des épines dendritiques induite par une exposition des neurones au peptide A $\beta$  fait intervenir la voie CaMKKII/AMPK. Une fois activée, la CamKKII phosphoryle l'AMPK qui à son tour phosphoryle la protéine tau sur son résidu sérine262 menant alors à une perte des épines dendritiques (Mairet-Coello *et al.*, 2013). Par ailleurs, une autre étude a également permis de mettre en évidence que l'inhibition pharmacologique ou génétique de l'AMPK dans un modèle murin transgénique pour la pathologie amyloïde (APP/PS1) empêche la mise en place des altérations de la plasticité synaptique et notamment, les dysfonctionnements de la LTP via la modulation de l'activité de la kinase eEF2K (Ma *et al.*, 2014). De plus, l'activation de l'AMPK induite par une exposition au peptide A $\beta$  induit aussi une activation de la réponse UPR (Unfolded Protein Response) ayant ainsi pour conséquence de faciliter l'endocytose de l'APP et la formation du peptide amyloïde (Yoon *et al.*, 2012). Enfin, il a été montré que les oligomères d'A $\beta$  répriment l'activation de l'AMPK via l'élimination des récepteurs au glucose (GLUT) au niveau des dendrites. Ces données suggèrent qu'en modulant l'activité de l'AMPK, le peptide amyloïde pourrait impacter le métabolisme énergétique neuronal (da Silva *et al.*, 2016) (*Figure 26*).

### *5.1.2. Rôle de l'AMPK dans la pathologie tau*

L'AMPK neuronale est dérégulée dans un grand nombre de pathologies neurodégénératives telles que la paralysie supranucléaire progressive (PSP), la maladie de Pick, les démences frontotemporales liées au chromosome 17 associées à un parkinsonisme, les dégénérescences corticobasales et bien évidemment, la MA (Vingtdeux *et al.*, 2011). Ces pathologies présentent toutes des altérations de la protéine tau et sont par conséquent regroupées sous le terme de Tauopathies. Au cours de cette thèse, nous nous intéresserons uniquement à l'implication de l'AMPK dans le développement de la MA.

Des études effectuées à partir de cerveaux issus de patients atteints de la MA ont permis de montrer que, dans les neurones en dégénérescence, l'AMPK activée est dérégulée et co-localise avec les protéines tau hyperphosphorylées (*Figure 25*). Des marquages de l'AMPK phosphorylée ont également été observés au sein de neurones ne possédant pas ou peu de protéines tau

hyperphosphorylées lors de cette même étude (Vingtdeux, *et al.*, 2011). De plus, il a aussi été mis en évidence que l'AMPK est une kinase de tau *in vitro* puisqu'elle phosphoryle la protéine tau au niveau de plusieurs épitopes tels que les sérines 262/356, les sérines 396/404 et la thréonine 231 (Thornton *et al.*, 2011 ; Vingtdeux *et al.*, 2011). Il a également été montré que certains de ces résidus correspondent au site consensus de l'AMPK (LXRXXS\*/T\*) (Vingtdeux *et al.*, 2011). Une étude réalisée dans un modèle murin de sénescence accélérée (SAMP8) a par ailleurs permis de mettre en évidence une augmentation des niveaux de phosphorylation de l'AMPK précédant l'augmentation de la phosphorylation de la protéine tau dans le cortex (Kim *et al.* 2017). Ces données laissent ainsi suggérer que la dérégulation de l'AMPK pourrait précéder l'hyperphosphorylation de la protéine tau.



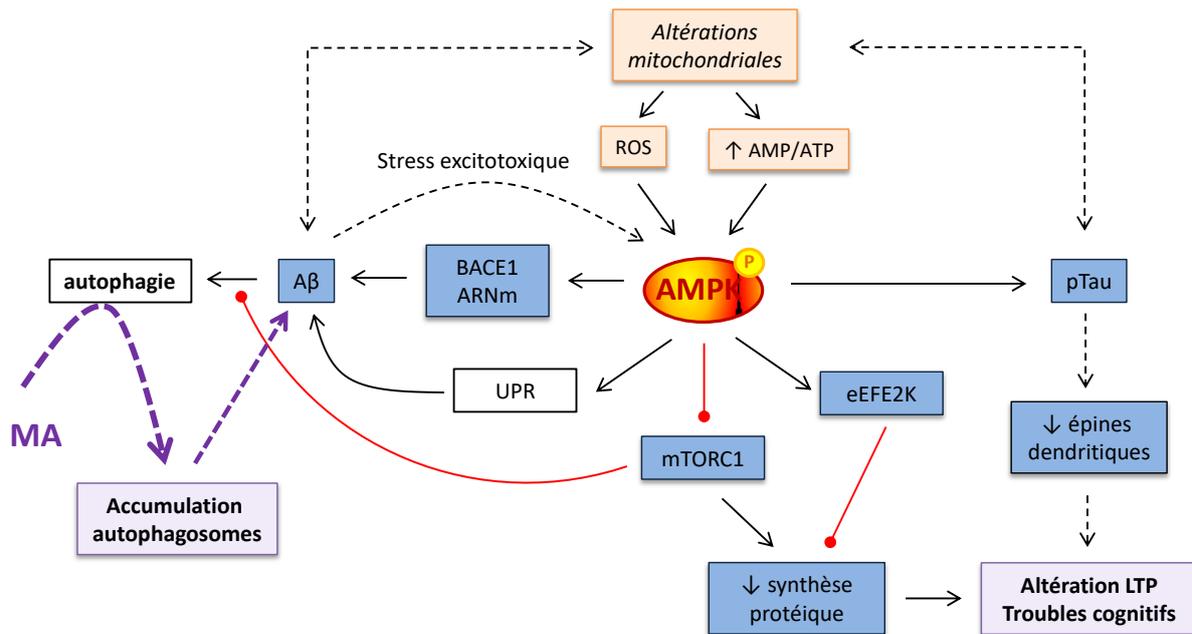
**Figure 25 : Immunomarcage de l'AMPK phosphorylée dans le cerveau de patients atteints de la MA. (a)** Immunomarcage de p-AMPK-Thr<sup>172</sup> dans la région hippocampique CA1 d'un cerveau sain (*haut*) ou issu d'un patient atteint de la MA (*bas*). Echelle : 50 µm. **(b)** Co-immunomarcage de p-AMPK-Thr<sup>172</sup> (vert) et de p-Tau-Ser<sup>202</sup> (rouge) dans l'hippocampe de patient atteint de la MA montrant la co-localisation de l'AMPK activée et de la protéine tau phosphorylée. Echelle : 10 µm. (*D'après Vingtdeux et al., 2011*)

Dans ce contexte, il a également été mis en évidence que l'AMPK pourrait jouer un rôle dans l'hyperphosphorylation et l'agrégation de la protéine tau ainsi que dans la perte de la densité des épines dendritiques induite par la surexpression de l'histone déacétylase 2 (HDAC 2), qui est connue pour être impliquée dans la pathogenèse de la MA (Liu *et al.* 2017). De plus, en utilisant un modèle *in vivo* de Drosophile, l'équipe de Galasso *et al.*, a démontré que la phosphorylation de tau par l'AMPK au niveau du résidu sérine 262 augmente la toxicité de la protéine tau via une altération de sa dégradation (Galasso *et al.*, 2017). Par ailleurs, des travaux réalisés par le groupe de Majd *et al.*, semblent également mettre en évidence que l'AMPK peut phosphoryler la protéine tau en sérine 262 suite à une ischémie cérébrale (Majd *et al.*, 2017). Enfin, le traitement de souris avec de l'haloperidol a été montré pour provoquer une diminution de l'activité de l'AMPK associée à une réduction de la phosphorylation de tau dans un modèle murin de MA (Koppel *et al.*, 2016).



Toutefois, d'autres études suggèrent à l'inverse qu'une activation de l'AMPK via la leptine ou la metformine – un agent utilisé dans le traitement contre le diabète et connu pour activer indirectement l'AMPK – pourrait induire une réduction du niveau de phosphorylation de la protéine tau (Greco *et al.*, 2009 ; Greco *et al.*, 2011 ; Kickstein *et al.*, 2010). Cependant, l'effet provoqué sur le l'état de phosphorylation de tau semble être indépendant de l'AMPK. En effet, l'utilisation de la metformine dans des cultures primaires de neurones montre que celle-ci provoque une activation de la phosphatase PP2A indépendamment de l'activité de l'AMPK entraînant par conséquent une réduction de la phosphorylation de tau. De plus, dans cette même étude l'utilisation de l'AICAR n'induit pas la déphosphorylation de tau confirmant ainsi que ces effets sont indépendants de l'AMPK (Kickstein *et al.*, 2010). Au cours d'une autre étude, il a été mis en évidence que la phosphorylation de l'AMPK au niveau de sa sérine 485 semble associée à une baisse de la phosphorylation de la protéine tau (Kim *et al.*, 2015). Cependant, il est intéressant de noter que la phosphorylation de l'épitope sérine 485 de l'AMPK semble induire une inhibition de l'AMPK en empêchant notamment sa phosphorylation activatrice au niveau de son résidu thréonine 172 (Horman *et al.*, 2006). De plus, l'activation indirecte de l'AMPK via le pimozide (un antagoniste des récepteurs à la dopamine utilisé dans le traitement de la schizophrénie) provoquerait une réduction des agrégats de tau ainsi qu'une réduction des déficits cognitifs associés à la pathologie tau via l'activation de la voie de l'autophagie dépendante de ULK1 (Kim *et al.* 2017). Enfin, des études semblent également montrer que l'administration intrapéritonéale de metformine chez des souris diabétiques (db/db), pourrait réduire l'hyperphosphorylation de la protéine tau et améliorer les déficits cognitifs induits par la pathologie tau tout en améliorant le flux autophagique (Chen *et al.*, 2018). Ces données de la littérature semblent montrer que dans des conditions de syndrome métabolique ou d'insulino-résistance, la phosphorylation de tau pourrait être régulée différemment. En effet, ces conditions pourraient moduler le statut d'activation de l'AMPK mais également induire une régulation passant par l'action des autres kinases de tau ainsi que de ses phosphatases (Kim *et al.*, 2015).

L'ensemble des données de la littérature laissent suggérer que l'AMPK pourrait jouer un rôle important dans le développement de la MA, aussi bien sur la pathologie amyloïde que la pathologie tau. Les potentiels effets d'une dérégulation de l'AMPK sur les mécanismes pathologiques qui se produisent au cours de la MA sont représentées dans la *figure 26*.



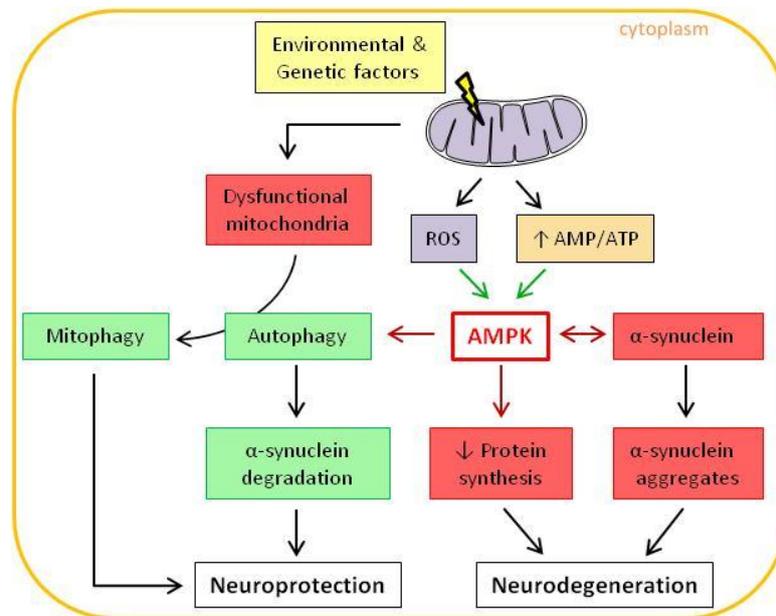
**Figure 26 : Schéma illustrant des mécanismes proposés lors d'une dérégulation de l'AMPK dans la MA.** La MA est caractérisée par l'accumulation de dépôts amyloïdes, de NFTs composés de protéines tau hyperphosphorylées et par la mise en place de différents stress (mitochondrial, excitotoxique, métabolique) qui sont tous capables d'induire l'activation de l'AMPK. Une fois activée, l'AMPK pourrait phosphoryler la protéine tau et favoriser la production de NFTs. Ceux-ci pourraient induire une réduction de la densité des épines dendritiques et aboutir par conséquent à des altérations cognitives. De plus, l'activation de l'AMPK semble aussi réguler la production du peptide A $\beta$  en augmentant le niveau de BACE1 et en jouant sur la réponse UPR. L'AMPK pourrait également réguler la synthèse protéique en phosphorylant eEF2K en S398 ou en inhibant mTORC1. De par l'inhibition de mTORC1, l'AMPK pourrait aussi stimuler l'autophagie afin de réguler la clairance du peptide A $\beta$ . Toutefois, au cours de la MA, l'élimination des autophagosomes est altérée et conduit alors à leur accumulation favorisant ainsi l'accumulation des agrégats protéiques de tau et d'A $\beta$ . LTP : potentialisation à long terme; NFTs : neurofibrillary tangles; ROS : espèces réactives de l'oxygène ; UPR : Unfolded Protein Response (*Modifié d'après Marinangeli et al., 2014*).

## 5.2. Rôle de l'AMPK dans les autres maladies neurodégénératives

### 5.2.1. AMPK et maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) est principalement caractérisée par la présence de tremblements au repos, on observe également chez les patients atteints de cette pathologie une instabilité posturale, une bradykinésie et une rigidité dans leur mouvement. D'un point de vue histopathologique, la MP est caractérisée par une accumulation intra-neuronale de protéines agrégées principalement constituées d' $\alpha$ -synucléine et qui sont appelées les corps de Lewy. Ces inclusions sont retrouvées dans les neurones dopaminergiques en dégenérescence au niveau de la substance noire (Beitz, 2014). Bien que la majorité des cas soient sporadiques, il existe aussi de rares cas familiaux qui font intervenir des mutations des gènes *PINK1*, *SNCA* et *Park2*. Des dérégulations de l'activité de l'AMPK sont également observées dans le cerveau MP puisque l'AMPK est retrouvée suractivée dans le cytoplasme

des neurones présentant des corps de Lewy. Il a été mis en évidence que l'AMPK pourrait interagir et phosphoryler directement le résidu sérine 129 de l' $\alpha$ -synucléine pouvant ainsi mener à des altérations de la clairance des agrégats composés d' $\alpha$ -synucléine et par conséquent participer à la dégénérescence neuronale (Jiang *et al.*, 2013). Par ailleurs, des études suggèrent que la suractivation de l'AMPK pourrait jouer à la fois un rôle neuroprotecteur puisqu'elle permet d'améliorer la mitophagie et les fonctions mitochondriales (Ferretta *et al.*, 2014), mais aussi un rôle néfaste car elle pourrait également participer au processus de neurodégénérescence en modulant la voie mTOR (Xu *et al.*, 2014) (Figure 27).

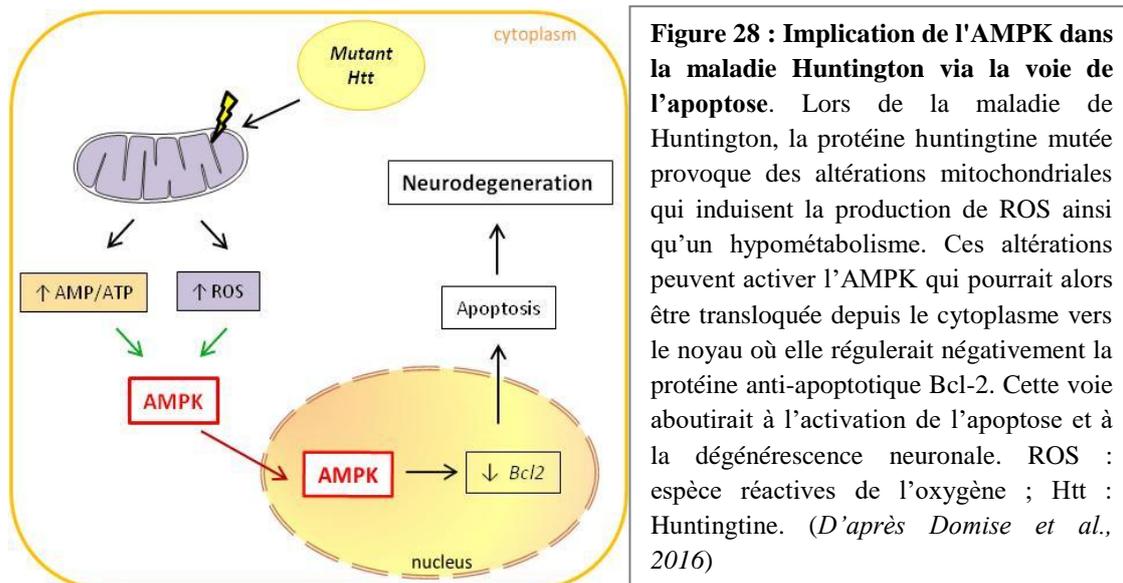


**Figure 27 : Rôle de la dérégulation de l'AMPK dans la maladie de Parkinson.** Le développement de la maladie de Parkinson peut être influencé par des facteurs de risque environnementaux et génétiques. Ceux-ci peuvent impacter le fonctionnement de la mitochondrie et aboutir à une production de ROS et à une diminution des niveaux énergétiques des cellules. Ces stress activent l'AMPK qui en retour, phosphoryle l' $\alpha$ -synucléine promouvant ainsi son agrégation et *in fine* la dégénérescence des neurones. Cette neurodégénérescence peut également résulter d'une diminution de la synthèse protéique induite par l'activation de l'AMPK. D'un autre côté, l'AMPK pourrait également exercer un rôle neuroprotecteur en stimulant l'autophagie et de ce fait la dégradation des mitochondries non fonctionnelles et les agrégats d' $\alpha$ -synucléines. ROS : espèce réactives de l'oxygène. (D'après Domise *et al.*, 2016)

### 5.2.2. AMPK et maladie de Huntington

La maladie de Huntington (MH) également appelée chorée de Huntington est une pathologie génétique autosomique dominante qui se traduit par la réalisation de mouvements anormaux (chorée) et des altérations cognitives et du comportement. La MH se caractérise principalement par une perte des neurones du striatum et par la présence d'agrégats cytoplasmiques et nucléaires composés de la

protéine huntingtine mutée (Walker, 2007). La mutation de la protéine huntingtine est due à une amplification du nombre de répétitions du trinuécléotide CAG dans sa région codante (The Huntington's Disease Collaborative Research Group., 1993). L'implication de l'AMPK dans la MH a été montrée grâce à l'utilisation d'un modèle de souris transgéniques pour la MH et dans lequel une augmentation de l'expression de l'AMPK a été observée dans le noyau des neurones du striatum (Chou *et al.*, 2005). En effet, la protéine huntingtine mutée semble induire l'activation de la sous-unité  $\alpha 1$  de l'AMPK provoquant ainsi sa relocalisation au noyau au sein duquel l'AMPK stimulerait les mécanismes d'apoptose et participerait de ce fait au processus de neurodégénérescence (Ju *et al.*, 2011) (Figure 28).



### 5.2.3. AMPK et Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA)

Contrairement aux deux précédentes pathologies où la neurodégénérescence affecte des régions cérébrales, la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) ou maladie de Charcot est caractérisée par une perte progressive des motoneurones localisés au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière. Cette pathologie se traduit de ce fait par une faiblesse et une atrophie musculaire pouvant mener à la paralysie. La SLA se caractérise également par la présence d'agrégats de protéines ubiquitinylées dont la principale est TDP-43 (TAR-DNA binding protein 43). Il existe également de rares cas de SLA familiaux qui impliquent des mutations de plusieurs gènes comme par exemple la *SOD1* (Superoxyde dismutase 1) ou *FUS* (fused in sarcoma) (Zarei *et al.*, 2015). Il a été mis en évidence que l'AMPK est dérégulée dans les motoneurones de la moelle épinière chez les patients atteints de SLA (Liu *et al.*, 2015). Cependant, son rôle dans cette pathologie reste assez controversé

puisque selon la mutation à l'origine de la SLA, l'AMPK peut se retrouver surexprimée ou à l'inverse inhibée provoquant ainsi des effets très variés (Perera *et al.*, 2014).

#### 5.2.4. AMPK et ischémie cérébrale

Hormis ces trois maladies neurodégénératives, il existe également une autre atteinte cérébrale au sein de laquelle l'AMPK est dérégulée et qui montre l'importance de la régulation du métabolisme énergétique pour le cerveau : il s'agit de l'ischémie cérébrale. Celle-ci correspond à une réduction des apports cérébraux en oxygène et en glucose et a pour conséquence d'induire des dommages cérébraux importants telle que la mort des tissus cérébraux. Des études réalisées à partir de modèle animaux d'ischémie cérébrale montrent que l'AMPK pourrait être impliquée dans la mise en place de ces dommages puisqu'elle est retrouvée sous sa forme activée peu de temps après l'induction de l'ischémie. Toutefois, alors que certains travaux affirment que l'inhibition de l'AMPK semble avoir des effets neuroprotecteurs (McCullough *et al.*, 2005), d'autres suggèrent à l'inverse que l'activation chronique de l'AMPK induite juste après l'ischémie pourrait quant à elle avoir des effets bénéfiques (Jiang *et al.*, 2015).

## *Objectifs du projet de thèse*



La MA est une pathologie neurodégénérative caractérisée principalement par l'apparition de deux types de lésions : les plaques amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire. Cette dernière résulte de l'accumulation et de l'agrégation intra-neuronale de protéines tau hyperphosphorylées. En plus de cette pathologie tau, on observe également dans le cerveau des patients atteints de la MA, une apparition précoce d'altérations du métabolisme énergétique tels qu'un hypométabolisme du glucose et des dysfonctionnements mitochondriaux (Jack et al., 2013 ; Atamna et Frey, 2007). De plus, il a également été reporté dans la littérature qu'au cours de la MA se produit également une perte des synapses qui est à l'origine des troubles cognitifs observés chez les patients atteints de la MA (Terry et al., 1991). Etant donné que les synapses sont les éléments consommant le plus d'énergie au sein des neurones, il est possible que les dysfonctionnements métaboliques constatés lors de la MA puissent impacter la perte synaptique. De façon intéressante, la protéine tau a été démontrée pour être impliquée à la fois dans la perte de cette intégrité synaptique ainsi que dans les altérations du métabolisme énergétique qui se mettent en place au cours de la MA (Tracy et al., 2018 ; Kopeikina et al., 2011 ; Kopeikina et al., 2012).

Depuis quelques années, il a été émis l'hypothèse que l'AMPK, qui pour rappel joue un rôle de senseur métabolique essentiel dans les cellules, pourrait également être impliquée dans le développement de la MA. En effet, il a été démontré dans la littérature que chez les patients atteints de la MA, l'AMPK est dérégulée dans les neurones en dégénérescence où elle co-localise avec les protéines tau hyperphosphorylées (Vingtdeux et al., 2011). De plus, il a aussi été mis en évidence que l'AMPK est une kinase de tau *in vitro* puisqu'elle est capable de phosphoryler cette protéine au niveau de plusieurs épitopes (Vingtdeux et al., 2011 ; Thornton et al., 2011). Cependant, étant donné que les études ayant montrées une implication de l'AMPK dans la phosphorylation de la protéine tau ont été principalement réalisées *in vitro*, d'autres investigations nécessitent d'être effectuées notamment dans des modèles cellulaires et *in vivo*. Par ailleurs, de par son rôle dans le maintien de l'homéostasie énergétique, l'AMPK, et notamment sa dérégulation, pourrait également participer à la mise en place des altérations du métabolisme énergétique et de la perte synaptique.

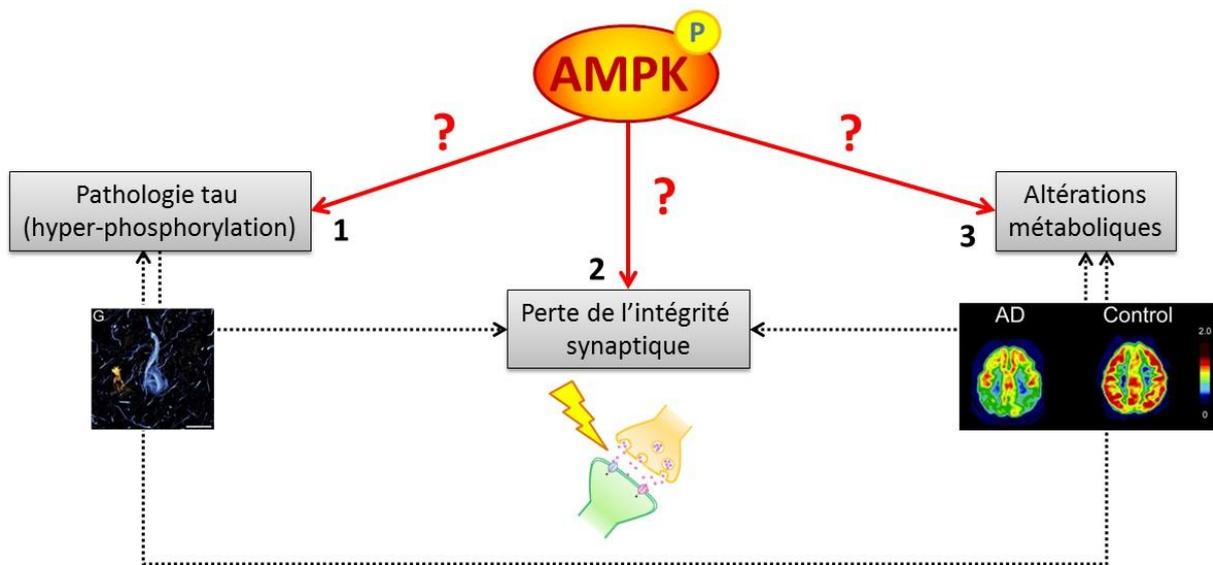
C'est dans ce contexte que s'est inscrit mon projet de thèse qui a eu pour finalité de mieux comprendre le rôle de la dérégulation de l'AMPK neuronale dans le développement des différentes caractéristiques de la MA.

Afin d'y parvenir, notre **premier objectif a été d'étudier l'implication de l'AMPK dans la phosphorylation de la protéine tau et dans le développement de la pathologie tau**. Pour cela, nous avons analysé l'impact d'une modulation pharmacologique de l'activité de l'AMPK sur la phosphorylation de tau et son affinité pour les MTs dans un modèle de culture primaire de neurones murins. Puis, nous avons analysé l'effet d'une délétion de la sous-unité  $\alpha 2$  de l'AMPK sur la



phosphorylation de la protéine tau et la pathologie tau *in vivo* dans un modèle murin transgénique pour la pathologie tau (modèle PS19).

Notre **second objectif** a quant à lui, eu pour but d'évaluer les conséquences d'une dérégulation de l'AMPK neuronale sur l'intégrité des synapses en culture primaire de neurones et *in vivo*, chez la souris. Puis, comme nous avons mis en évidence que cette dérégulation de l'AMPK provoquait une perte d'intégrité et de la densité synaptique, nous nous sommes ensuite intéressés à **identifier le mécanisme moléculaire à l'origine de ce processus**. Ces résultats nous ont ainsi amené à penser que la dérégulation de l'AMPK provoquait une perte des synapses dans le but de réduire la consommation d'énergie des neurones et ainsi préserver cette énergie pour permettre la survie des neurones. Cette hypothèse nous a ainsi mené à notre **dernier objectif** qui a eu pour but de **déterminer l'impact de cette dérégulation de l'AMPK sur le métabolisme énergétique neuronal**.



## ***Résultats***



# Chapitre 1 : Etude du rôle de l'AMPK dans la phosphorylation de la protéine tau et dans le développement de la pathologie tau

## 1. Introduction

Il est connu depuis de nombreuses années maintenant, que la MA est caractérisée par la présence de NFTs qui résultent de l'accumulation et de l'agrégation intra-neuronale de protéines tau hyperphosphorylées et qui participent au processus de neurodégénérescence. Comme nous l'avons vu en introduction, la protéine tau est une protéine associée aux microtubules codée par un gène unique qui après un épissage alternatif donne naissance à six isoformes contenant 3 ou 4 domaines de liaisons aux microtubules (MBDs, isoformes 3R et 4R). Cette protéine possède de nombreux sites de phosphorylation pouvant être phosphorylés par différentes kinases dont les principales sont la GSK3 $\alpha$  et  $\beta$ , la cdk5, les protéines kinases de la famille des MARK, la PKA et les MAPK (Buée *et al.*, 2000). De par ses MBDs, la protéine tau joue un rôle fondamental dans la régulation de la dynamique des microtubules, et par conséquent du transport axonal, et ce dépendamment de son statut de phosphorylation. Depuis plusieurs années, des études suggèrent que l'AMPK pourrait jouer un rôle dans le développement de la MA et notamment dans la pathologie tau qui se met en place au cours de cette maladie. En effet, des travaux réalisés *in vitro* ont permis de montrer que l'AMPK est capable de phosphoryler la protéine tau au niveau de plusieurs épitopes dont certains correspondent au site consensus de l'AMPK (Vingtdeux *et al.*, 2011 ; Thornton *et al.*, 2011). De plus, il a été démontré que dans le cerveau des patients atteints de la MA, l'AMPK est dérégulée et co-localise avec la protéine tau hyperphosphorylée (Vingtdeux *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'AMPK est également retrouvée dans des neurones ne présentant pas encore de NFTs, laissant ainsi suggérer que la dérégulation de l'AMPK qui a lieu lors de la MA pourrait être un événement précoce impliqué dans l'hyperphosphorylation de la protéine tau. Cependant, à ce jour, les études montrant une implication de l'AMPK dans la phosphorylation de tau ont été principalement réalisées dans des modèles *in vitro* et nécessitent par conséquent d'être confirmées dans des modèles cellulaires et *in vivo*.

C'est dans ce contexte que s'est inscrit le premier objectif de ma thèse qui a eu pour but d'étudier l'implication de l'AMPK dans la phosphorylation et la fonctionnalité de la protéine tau ainsi que dans la mise en place de la pathologie tau. Pour se faire, une modulation pharmacologique de l'AMPK a été effectuée dans un modèle de culture primaire de neurones murins afin d'analyser l'impact d'une activation et d'une inhibition de l'AMPK sur l'état de phosphorylation de la protéine

tau. L'effet de la modulation de l'activité de l'AMPK sur la capacité de tau à se lier aux microtubules a également été étudié. Enfin, l'impact d'une délétion de la sous-unité  $\alpha 2$  de l'AMPK dans un modèle murin transgénique pour la pathologie tau, a été analysé dans le but de déterminer le rôle de l'AMPK dans le développement de la pathologie tau et notamment, dans la formation des agrégats de tau.

## 2. Résultats

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article ci-dessous publié dans le journal Scientific Reports : Sci Rep. 2016; 6: 26758. Published online 2016 May 27. doi: [10.1038/srep26758]

<https://doi.org/10.1038/srep26758>

### **AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology in vivo**

Manon Domise, Sébastien Didier, Claudia Marinangeli, Haitian Zhao, Pallavi Chandakkar, Luc Buée, Benoit Viollet, Peter Davies, Philippe Marambaud & Valérie Vingtdeux

### 3. Conclusion

La réalisation de cette étude nous a permis de mettre en évidence que l'AMPK est une kinase de tau dans un modèle de culture primaire de neurones. En effet, en modulant pharmacologiquement l'activité de l'AMPK, nous avons démontré que l'AMPK phosphoryle les isoformes 3R et 4R de la protéine tau au niveau des épitopes Ser262/356 et Thr231 et régule par conséquent sa liaison aux MTs. De plus, l'utilisation d'un modèle murin déficient pour la sous-unité  $\alpha 2$  de l'AMPK, qui est celle majoritairement exprimée dans les neurones, a permis d'étudier *in vivo* le rôle de l'AMPK dans la phosphorylation de la protéine tau mais également son impact dans la pathologie tau. Il a ainsi pu être démontré que l'AMPK régule la phosphorylation de la protéine tau endogène ainsi que la pathologie tau chez des souris transgéniques PS19.

Les études que nous avons réalisées *in vivo* ont permis d'analyser l'impact d'une déficience de la sous-unité  $\alpha 2$  de l'AMPK sur la phosphorylation et la pathologie tau. Toutefois, il serait intéressant d'effectuer d'autres travaux dans le but de déterminer également l'effet d'une déficience de la sous-unité  $\alpha 1$  de l'AMPK sur ces deux processus. Etant donné que nos résultats montrent une baisse de la phosphorylation de la protéine tau malgré la présence de la sous-unité  $\alpha 1$  de l'AMPK, il est cependant possible que la délétion de la sous-unité  $\alpha 1$  n'ait pas le même effet sur la pathologie tau que celle de la sous-unité  $\alpha 2$ . En effet, des études ont mis en évidence que ces deux sous-unités peuvent avoir des effets différents puisqu'il a par exemple été démontré qu'une délétion de la sous-unité  $\alpha 2$  peut avoir un effet protecteur lors d'une ischémie cérébrale, ce qui n'est pas le cas pour la sous-unité  $\alpha 1$  (Li *et al.*, 2007). De plus, il a également été mis en évidence que seule la déficience de la sous-unité  $\alpha 2$  est capable d'induire un syndrome métabolique (Viollet *et al.* 2003a ; Villena *et al.*, 2004). A l'inverse, comme l'expression de la sous-unité  $\alpha 2$  de l'AMPK est majoritaire dans les neurones, il est également possible que la sous-unité  $\alpha 1$  soit aussi impliquée dans la phosphorylation de la protéine tau mais que son expression minoritaire ne soit pas capable de compenser l'absence de la sous-unité  $\alpha 2$ , et par conséquent, d'empêcher la baisse du niveau de phosphorylation de tau. Au vu de ces données, il serait aussi intéressant d'étudier l'impact d'une délétion simultanée des sous-unités  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  de l'AMPK sur la pathologie tau. Cependant, il a été démontré que le modèle double KO pour ces deux sous-unités est létal dès le stade embryonnaire (Viollet *et al.* 2003b). L'utilisation d'un modèle KO inductible neuronal serait de ce fait une bonne alternative pour évaluer le rôle de ces deux sous-unités dans la pathologie tau puisqu'il permettrait d'induire le KO à un temps bien défini (notamment, à l'âge adulte uniquement).

Il est important de noter que durant notre étude, nous nous sommes intéressés à quelques sites de phosphorylation de tau tous principalement localisés dans la partie C-terminale et connus pour

avoir un impact dans la MA. Toutefois, la partie N-terminale de tau possède également des sites de phosphorylation qui permettent à tau d'interagir avec d'autres protéines dont notamment des protéines localisées au niveau synaptique (Lee et al., 1998). Il serait de ce fait intéressant de déterminer si l'AMPK pourrait également être impliquée dans la phosphorylation de ces résidus et de ce fait dans la régulation de l'interaction de tau avec ses partenaires. Pour le déterminer, une analyse par spectroscopie de RMN (résonance magnétique nucléaire) pourrait être effectuée en utilisant des protéines recombinantes pour tau et l'AMPK. L'utilisation de cette technique permettrait alors d'analyser l'ensemble des épitopes de la protéine tau pouvant être phosphorylés par l'AMPK (Landrieu *et al.*, 2006). Par ailleurs, des co-immunoprécipitations pourraient également être réalisées après avoir traité les cultures neuronales avec un activateur de l'AMPK, afin d'identifier les partenaires interagissant avec la protéine tau dans des conditions où tau est phosphorylée par l'AMPK. Ainsi, en identifiant ces protéines, ces expérimentations pourraient peut-être permettre de suggérer un rôle de la phosphorylation de tau par l'AMPK.

Au vu de nos résultats, et étant donné que les fonctions de la protéine tau sont régulées par son niveau de phosphorylation, il est possible de suggérer que l'AMPK pourrait réguler certaines fonctions de tau en modulant son état de phosphorylation. Comme décrit précédemment, le transport axonal joue un rôle essentiel dans les neurones et est régulé par la protéine tau. En effet, des études montrent que l'hyperphosphorylation de la protéine tau provoque une altération du transport axonal en induisant la séquestration dans le soma de la molécule adaptatrice de la kinésine : JIP1 (c-Jun N-terminal kinase (JNK) interacting protein 1) (Kopeikina et al, 2012 ; Ittner, Ke and Götz, 2009). Il est donc possible d'émettre l'hypothèse que l'AMPK pourrait participer à la régulation du transport axonal en modulant la phosphorylation de la protéine tau et, que la dérégulation de l'AMPK pourrait à l'inverse provoquer l'altération du réseau microtubulaire et par conséquent, du transport axonal. Il est intéressant de noter que des études ont mis en évidence que l'AMPK pourrait être impliquée dans la régulation de la dynamique des MTs en phosphorylant directement CLIP-170, une autre protéine associée aux microtubules et impliquée dans la régulation de leur dynamique (Nakano *et al.*, 2010). De plus, il a également été démontré que durant le développement neuronal, l'AMPK peut moduler le transport axonal en phosphorylant la chaîne légère de la kinésine Kif5 ce qui provoque alors la dissociation de son cargo PI3K (Amato *et al.*, 2011). Ces études semblent donc montrer que l'AMPK pourrait jouer un rôle dans la régulation de la dynamique microtubulaire. Il serait donc intéressant d'étudier dans notre modèle, l'impact d'une modulation de l'activité de l'AMPK sur le transport axonal dans des cultures primaires WT et KO pour la protéine tau. Pour se faire, l'utilisation de chambres microfluidiques serait un outil idéal puisqu'il permet d'isoler dans des micro-canaux les prolongements axonaux. Cette technique pourrait également être utilisée pour analyser l'impact d'une activation de l'AMPK effectuée soit dans le compartiment somato-dendritique soit dans le compartiment axonal, sur le transport axonal.

En plus du transport axonal, des travaux laissent également suggérer que tau pourrait être impliquée dans la plasticité synaptique. En effet, l'utilisation d'un modèle murin KO pour la protéine tau a permis de montrer que l'absence de tau altère non seulement, les mécanismes de recyclage des récepteurs AMPA mais altère aussi la mémoire de ces souris (Regan *et al.*, 2015). Dans cette étude, les auteurs montrent également que la protéine tau joue un rôle important dans l'établissement de la LTD puisque sa phosphorylation en sérine 396 semble nécessaire pour induire la LTD hippocampique mais pas la LTP (Regan *et al.*, 2015). Nos résultats obtenus *in vivo* montrent que dans notre modèle, l'AMPK phosphoryle la protéine tau en Ser396. Etant donné que ce site est impliqué dans la LTD et par conséquent dans l'élaboration de la plasticité synaptique, il pourrait être intéressant d'envisager des expérimentations d'électrophysiologie pour déterminer si la phosphorylation de ce résidu par l'AMPK pourrait avoir un impact sur la LTD. Par ailleurs, il a également été démontré que la protéine tau pourrait interagir avec les filaments d'actine en réponse à une activation synaptique, ce qui a pour conséquence d'induire sa relocalisation au niveau des densités post-synaptiques (PSD) où elle semble jouer un rôle important dans la régulation de la plasticité synaptique (Franscomi *et al.*, 2014 ; Brian R. Hoover *et al.*, 2010). En effet, des études effectuées chez la drosophile et dans des modèles murins transgéniques pour la pathologie tau (rTg4510) montrent que la neurodégénérescence induite par les changements pathologiques de la protéine tau est associée à une stabilisation excessive des filaments d'actine qui conduit à la formation de faisceaux d'actine filamenteuse rendant ainsi rigide le cytosquelette (Fulga *et al.*, 2007). De plus, en utilisant un modèle murin double transgénique pour les pathologies amyloïde et tau, il a été mis en évidence que le peptide amyloïde peut exacerber la neurodégénérescence provoquée par tau (Fulga *et al.*, 2007). Ces données laissent suggérer qu'une altération de l'état de phosphorylation de la protéine tau pourrait induire des altérations de la plasticité synaptique et ainsi mener à une dégénérescence neuronale. Par ailleurs, d'autres études suggèrent que l'AMPK joue aussi un rôle dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine puisqu'une déficience de sa sous-unité  $\gamma$  a été montrée pour induire des altérations de la polymérisation des filaments d'actine (Cook *et al.*, 2014). Il serait donc intéressant de déterminer si la phosphorylation de la protéine tau par l'AMPK pourrait être impliquée dans la réorganisation anormale des filaments d'actine, et par conséquent, dans le processus de neurodégénérescence. Pour se faire, des cultures de neurones surexprimant une forme WT ou une forme non phosphorylable en sérine 262 et/ou 356 de la protéine tau, et exprimant un marqueur fluorescent des filaments d'actine (GFP, Actin-Ruby) pourraient être traitées avec des activateurs de l'AMPK pour pouvoir ensuite analyser le réseau d'actine.

Depuis la réalisation de notre étude, il y a d'autres travaux qui se sont également intéressés à étudier l'impact de l'AMPK sur la phosphorylation de la protéine tau et la pathologie tau. En effet, l'équipe de Galasso *et al.*, a notamment démontré en 2017 que la surexpression d'une forme



constitutivement active de l'AMPK dans un modèle *in vivo* de drosophile accentue la toxicité de tau en augmentant son niveau de phosphorylation et en altérant sa dégradation (Galasso *et al.*, 2017). De même, une autre étude a aussi mis en évidence que l'AMPK pouvait être impliquée dans la phosphorylation et l'agrégation de la protéine tau induite par une surexpression de l'HDAC2, qui est connue pour être impliquée dans le développement de la MA (Liu *et al.* 2017). L'inhibition de l'AMPK dans un modèle murin transgénique pour la pathologie tau a également été montrée pour provoquer une diminution du niveau de phosphorylation de la protéine tau (Koppel *et al.*, 2016). En revanche, d'autres données de la littérature montrent que la phosphorylation de l'AMPK en sérine 485 provoque une déphosphorylation de la protéine tau dans un modèle murin d'insulinorésistance (Kim *et al.*, 2015). Toutefois, contrairement à la thréonine 172, la sérine 485 de l'AMPK semble correspondre à un épitope impliqué dans l'inhibition de l'AMPK puisqu'elle empêcherait la phosphorylation du résidu thréonine 172 (Horman *et al.*, 2006). Cela pourrait en partie expliquer la divergence des résultats de cette étude par rapport à ceux que nous avons obtenus. Par ailleurs, une diminution de la phosphorylation de tau couplée à une réduction des troubles cognitifs a aussi été mise en évidence *in vivo* dans un modèle murin d'insulinorésistance (db/db) ayant reçu des injections intrapéritonéales de metformine (Chen *et al.* 2018). D'une manière intéressante, une autre étude a mis en évidence que l'activation de l'AMPK induite par la metformine, dans un modèle murin transgénique pour la pathologie tau (P301S), semble avoir des effets paradoxaux sur la pathologie tau (Barini *et al.*, 2016). En effet, dans ces travaux, les auteurs montrent que la metformine provoque une diminution du niveau de phosphorylation de la protéine tau au niveau du cortex et de l'hippocampe et que cette réduction serait due à une augmentation de l'expression de la phosphatase PP2A via la voie AMPK/mTOR. D'un autre côté, cette étude montre également que la metformine induit une augmentation des niveaux de protéines tau insolubles et des agrégats de tau associée à une réduction des boutons synaptiques (Barini *et al.*, 2016). Bien que l'ensemble de ces études semblent montrer des résultats quelque peu controversés, il est cependant clair que l'AMPK est capable de réguler la phosphorylation de la protéine tau. Toutefois, on constate qu'en fonction des conditions environnementales et expérimentales (modèle murin utilisé, mode d'activation de l'AMPK), la régulation de l'état de phosphorylation de la protéine tau par l'AMPK semble impliquer des mécanismes cellulaires différents pouvant être directs et/ou indirects et pouvant par conséquent expliquer la divergence des résultats de ces études.

Dans l'ensemble, ces données de la littérature laissent suggérer qu'en modulant la pathologie tau, l'AMPK pourrait jouer un rôle majeur dans la mise en place d'autres événements caractéristiques de la MA dont notamment, les altérations synaptiques ou encore la neurodégénérescence.

## Chapitre 2 : Rôle de la dérégulation de l'AMPK neuronale sur l'intégrité synaptique

### 1. Introduction

La réalisation de notre premier objectif a permis de mettre en évidence que l'AMPK régule la phosphorylation, la fonction et l'agrégation de la protéine tau. Ces résultats laissent ainsi suggérer que l'AMPK pourrait être impliquée dans le développement de la pathologie tau qui est observée lors de la MA. En plus de la pathologie tau, nous avons vu lors de l'introduction que la MA est également caractérisée par la mise en place dès les stades précoces, d'une perte synaptique qui est à l'origine des déficits cognitifs observés chez les patients atteints de la MA. En effet, les synapses jouent un rôle essentiel dans la formation de la mémoire et sont connues pour consommer la majorité de l'énergie fournie aux neurones et ce dans le but de maintenir leurs fonctions. Il est bien établi que l'AMPK joue au sein des cellules un rôle de senseur métabolique essentiel pour le maintien de leur niveau énergétique et par conséquent pour leur survie. Etant donné que lors de la MA, l'activité de l'AMPK est dérégulée, nous avons émis l'hypothèse que la dérégulation de l'AMPK pourrait avoir un impact sur la fonctionnalité et l'intégrité des synapses. Pour le vérifier, une dérégulation de l'AMPK a été induite dans un modèle de culture primaire neuronale afin d'analyser l'intégrité, la densité et la fonctionnalité des synapses. Une caractérisation de notre modèle a été effectuée au préalable, dans le but de déterminer la période optimale pour induire la dérégulation de l'AMPK. Puis, après avoir déterminé l'effet de cette dérégulation sur les synapses, nous nous sommes intéressés à identifier le mécanisme à l'origine de ce processus. Enfin, nous avons également étudié l'impact de la dérégulation de l'AMPK sur l'intégrité synaptique *in vivo* chez la souris.

## 2. Résultats

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article ci-dessous accepté en 2019 dans le journal *Cell Death & Disease* :

### **Neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) deregulation induces synaptic loss by an autophagy mediated process**

Manon Domise, Florent Sauvé, Sébastien Didier, Raphaëlle Caillerez, Séverine Bégard, Sébastien Carrier, Morvane Colin, Claudia Marinangeli, Luc Buée, Valérie Vingtdeux

## **Abstract**

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by synaptic loss which leads to the development of cognitive deficits. Synapses are neuronal structures that play a crucial role in memory formation and that are known to consume most of the energy used in the brain. Interestingly, AMP-activated protein kinase (AMPK), the main intracellular energy sensor, is deregulated in degenerating neurons in several neurodegenerative diseases, including AD. In this context, we asked whether AMPK deregulation could influence synapses integrity and function. AMPK deregulation in differentiated primary neurons led to a time-dependent decrease of pre- and post-synaptic markers which was accompanied by a reduction of synapses number and a loss of neuronal networks functionality. The loss of post-synaptic proteins was mediated by an AMPK-regulated autophagy-dependent pathway. Finally, this process was also observed *in vivo*, where AMPK deregulation primed synaptic loss. Overall, our data demonstrate that during energetic stress condition, AMPK might play a fundamental role in the maintenance of synaptic integrity, at least in part through the regulation of autophagy. Thus, AMPK might represent a potential link between energetic failure and synaptic integrity in neurodegenerative conditions such as AD.

## Background

Alzheimer's disease (AD) is the leading cause of dementia in the elderly. AD is characterized at the histopathological level by the presence of two lesions known as senile plaques and neurofibrillary tangles that are caused by the aggregation of  $\beta$ -amyloid peptides and tau proteins respectively. AD symptoms include progressive memory and cognitive functions impairment, which result from synaptic loss that occurs during the disease progression<sup>1,2</sup>. Synaptic loss is indeed largely reported both in *post-mortem* human AD brain tissues,<sup>3</sup> as well as in brain of AD mouse models<sup>4</sup>. Interestingly, a recent study investigated synaptic density *in vivo* in AD patients with SV2A (synaptic vesicle glycoprotein 2A, a vesicle-associated membrane protein expressed in all synapses) positron emission tomographic (PET) imaging. This study showed that AD patients displayed a reduction in the SV2A-PET signal in hippocampus, decrease that remained significant even after correction for atrophy and that correlated with episodic memory score<sup>5</sup>.

Interestingly, synapses represent the most energy requiring structures in the brain<sup>6,7</sup>. Energy is provided as ATP, which synthesis, either driven by glycolysis or mitochondrial respiration, is required to support synaptic functions<sup>8-10</sup>. It is well known that brain energy deficits lead to cognitive impairments and contribute to neurodegeneration. For instance, brain hypometabolism in AD has been reported in many studies and was recently stated to be one of the best predictive biomarker of this neuropathology<sup>11</sup>. Hence, energy control and homeostasis regulation is crucial for neuronal functionality.

AMP-activated protein kinase (AMPK) is the main sensor and regulator of cell metabolism. AMPK is a heterotrimer composed of one catalytic subunit  $\alpha$  ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ), one scaffolding subunit  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ) and one regulatory subunit  $\gamma$  ( $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  and  $\gamma 3$ ) which are all encoded by distinct genes. This kinase is expressed in many peripheral tissues and in the brain where it is mainly expressed in neuronal cells<sup>12</sup>. Once activated by phosphorylation on the  $\alpha$  subunit residue Thr<sup>172</sup>, AMPK inhibits anabolic pathways and stimulates catabolic pathways such as autophagy (for review<sup>13</sup>). Indeed, AMPK directly phosphorylates the autophagy initiator ULK1 (Unc-51-like kinase 1)<sup>14,15</sup>, and Raptor which inhibits the mTORC1 complex consequently switching on autophagy<sup>16</sup>. Importantly, AMPK was reported to be deregulated in neurons of AD patient's<sup>17</sup> as well as in Parkinson's and Huntington's<sup>18</sup>. In AD, AMPK signaling pathway was proposed to be involved in the degradation of  $\beta$ -amyloid peptides<sup>19,20</sup> and in tau phosphorylation<sup>17,21,22</sup>. Moreover, AMPK can be activated by  $\beta$ -amyloid peptides to mediate their synaptotoxic effects through tau phosphorylation<sup>23</sup>. Altogether, these studies strongly suggest that AMPK could be an upstream driver in AD progression.

Here, we investigated whether AMPK deregulation, as observed in AD, could have any impact on synapses integrity and function. We showed using primary neuronal cultures that AMPK deregulation,

induced either pharmacologically or genetically, led to a loss of synapses that impaired neuronal networks functionality. In addition, we provided evidences that post-synaptic proteins were eliminated through AMPK-mediated activation of the autophagic flux. Finally, we showed that this process was also observed *in vivo*, where AMPK deregulation also primed synaptic loss.

## **Methods**

### **Antibodies and reagents**

Antibodies directed against AMPK $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2, ACC, phospho-ACC-Ser79, PSD-95, GluA1, Raptor, phospho-Raptor-Ser792, ULK1, phospho-ULK1-Ser555, SQSTM1/p62 and LC3B were obtained from Cell Signaling Technology. Anti-phospho-AMPK-Thr172, synapsin I-ab, Homer 1bc, synaptophysin, GluN1 (NMDA zeta1), SNAP25 were from Santa Cruz Biotechnology. Anti-actin and Munc antibodies were from BD Transduction Laboratory. MAP2 antibody was from Sigma. SMI-312 antibody was from Biogen. AICAR and MRT68921 were purchased from Tocris, GSK621 was from Selleckchem, Bafilomycin A1 was from Cell Signaling.

### **Animals**

All animal experiments were performed according to procedures approved by the local Animal Ethical Committee following European standards for the care and use of laboratory animal (agreement APAFIS#4689-2016032315498524 v5 from CEEA75, Lille, France).

### **Surgical procedures and injections**

Hippocampal surgeries were performed as described<sup>24,25</sup>. Briefly, intracerebral injections of PBS/BSA 1% or PBS/BSA 1%/CA-AMPK (constitutively active form of AMPK) were performed into the hippocampus of anesthetized (100 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg of xylazine, i.p.) 10-weeks old male C57BL/6J mice at the following stereotaxic coordinates relative to the bregma: -2.2 mm anteroposterior [AP], +/- 1.4 mm mediolateral [ML], -2.1 mm dorsoventral [DV] according to the Paxinos and Franklin mouse brain atlas. These injections consisted to deliver 400 ng of viral particles diluted in PBS/BSA 1 % using a 10  $\mu$ l glass syringe with a fixed needle (Hamilton; Dutscher, Brumath, France) at a rate of 0.25  $\mu$ l/min.

### **Primary neuronal culture and treatments**

Primary neurons were obtained from C57bl6 wild-type mice as described previously<sup>22</sup>. Fetuses were obtained from females that were sacrificed at 18.5 days of gestation. Forebrains were dissected in ice-cold Hank's balanced salt solution containing 0.5% w/v D-glucose and 25 mM Hepes under a dissection microscope. Dissociation was carried out mechanically in ice-cold dissection medium containing 1.3 U/ml papain, 0.96 U/ml dispase II, and 500 U/ml DNase and by incubation at 37°C twice for 10 min. Cells were then spun down at 220 x g for 5 min at 4°C, resuspended in Neurobasal

medium supplemented with 2% B27, 1 mM sodium pyruvate, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM Glutamax (Invitrogen), filtered through a 40-µm cell strainer, counted, and plated on poly-L-ornithine- and laminin-coated plates at a density of about 10<sup>6</sup> cells/well. Culture medium was fed by adding new medium (1:3 of starting volume) every 3 days until the end of the culture period. Drug treatments were realized directly in the conditioned media.

### **Construct and production of lentiviral vectors**

AMPK $\alpha$ 2(1-312)-pLenti construct encoded the constitutive active (CA) truncated form of AMPK ending at position 312 as previously described<sup>10</sup>. FUGW-PK-hLC3 (mKate2-LC3) and FUGW-PK-hLC3 $\Delta$ G were a gift from Dr. Isei Tanida (Addgene plasmids # 61460, and #61461)<sup>26</sup>. The production of lentiviral vectors (LV) batches was as previously described<sup>25</sup>. Primary neurons were infected with LV at 17 DIV and were used for experiments 7 days after LV infections.

### **Cell-Stress Array**

For the cell-stress assay, array membranes were incubated with cell lysates (250 µg of total proteins per array) and subsequently processed according to the manufacturer's instructions (R&D systems).

### **Cytotoxicity assay**

Cell toxicity was assessed by the measurement of lactate dehydrogenase release as per manufacturer's instructions (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega). Absorbance measurements were obtained using a SpectraMax® i3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA 94089, USA).

### **Immunocytofluorescence**

Neurons grown on poly-D-lysine and laminin-coated glass coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized using 0.25% Triton X-100 before blocking in 1% BSA for 1h at RT. Neurons were then incubated with primary antibodies directed against MAP2 (1:200 dilution), SMI-312 (1:500 dilution), synaptophysin (SYP, 1:1000 dilution) and the post-synaptic density protein (PSD-95, 1:500 dilution) O/N at 4°C, followed with anti-IgG secondary antibodies coupled to Alexa Fluor 350, 488 or 568 (Invitrogen). Nuclei were visualized with DAPI. Images were acquired on a Zeiss Axio Imager Z2 microscope (Carl Zeiss, Germany) equipped with a Hamamatsu ORCA-Flash4.0 digital camera (Hamamatsu Photonics, Japan) and ApoTome.2 system (Carl Zeiss, Germany).

### **Puncta analyses**

After performing immunofluorescence with antibodies directed against the pre-synaptic marker synaptophysin and the post-synaptic markers PSD-95, images were acquired on a Zeiss Axio Imager Z2 microscope (Carl Zeiss, Germany) using an oil immersion 63x objective. Neurons that are at least

two cell diameters away from others neurons were selected in order to avoid bias in the synapses quantification. Synapses number was then quantified by the colocalization of puncta between synaptophysin and PSD-95. The number of these puncta were quantified using the plugin Puncta Analyzer from Image J (NIH) (written by Bary Wark) as described by Ippolito and Eroglu <sup>27</sup>. Briefly, regions of interest (ROI) were selected around the soma of the neuron of interest. The background values were subtracted and the threshold was adjusted manually for each channel and was the same within experiments. The minimum puncta size and the rolling ball radius were set to 4 pixels and 50 respectively. At least three independent experiments were performed.

### **Western Blot**

Cell extracts were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes as described previously <sup>22</sup>. Membranes were probed with the antibodies listed above and analyzed by enhanced chemiluminescence detection.

### **Multi Electrodes Arrays (MEA)**

Mouse primary neurons were plated on poly-D-lysine and laminin-coated Multi Electrode Arrays (MEA) at a density of 40,000 neurons by MEA and cultured at 37°C with 5 % CO<sub>2</sub>. Neuronal electrical activity was extracellularly recorded for 5 min after 15 min of acclimatization, using a MEA60 setup (Multi Channel Systems, Germany). Recorded signals are amplified by a filter amplifier and sent to the data acquisition card for conversion of analog signals to digital data streams. The culture medium temperature was maintained at 37°C during the recordings thanks to a thermal element. MEA are composed of 60 electrodes (30 µm diameter, 200 µm spaced) made of titanium nitride which are aligned in an 8 × 8 grid. Multi Channels Experimenter software was used to display the recorded signals (spikes) in real time and save them. All data were analyzed with Neuroexplorer software. For analysis, spikes having a mean frequency of 0.2 s were selected, bursts were considered as at least 2 successive spikes if the minimum interspikes interval was 0.01s and the minimum burst duration was 0.02 s. For the recording, an automatic threshold estimation which correspond to a falling edge of 10 was subtracted.

### **PSD fractionation**

PSD fractionation was performed as described by Frandemiche et al. <sup>28</sup>. Briefly, following treatment, primary neurons were recovered in cold lysis buffer containing 10 mM HEPES, 320 mM sucrose, pH 7.4. Homogenates were sonicated and centrifuged at 1,000 x g at 4°C for 10 min. Supernatants were collected and centrifuged at 12.000 x g at 4°C for 20 min. The remaining pellets were washed twice with a buffer containing 4 mM HEPES, 1 mM EDTA pH 7.4 and centrifuged at 12.000 x g at 4°C for 20 min. The remaining pellets were resuspended in a buffer containing 20 mM HEPES, 100 mM NaCl and 0.5 % Triton X-100, pH 7.2. Supernatants were collected as non PSD (post-synaptic densities)



fractions. Pellets were resuspended and slowly homogenized for 1 h at 4°C in a buffer containing 20 mM HEPES, 0.15 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % deoxycholic acid, 1 % SDS, pH 7.5 before centrifugation at 10.000 x g at 4°C for 15 min. Supernatants were collected as PSD fractions. Samples were mixed with loading buffer, and equal volumes were loaded and analyzed by Western blotting.

### **RT-qPCR**

Total RNA was extracted from primary neurons using the NucleoSpin® RNA kit (Macherey-Nagel) following manufacturer's instructions. Then, 1µg of RNA was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific). Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) analyses were performed using Power SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) on a StepOne™ Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) using the following primers: Cyclophilin A forward: 5'-AGCATACAGGTCCTGGCATC-3', reverse: 5'-TTCACCTTCCCAAAGACCAC-3'; p62 forward: 5'-GCTGCCCTATACCCACATCT-3', reverse: 5'-CGCCTTCATCCGAAC-3'. PCR reaction conditions were as follow: initial denaturation 95°C for 10 min, followed by 35 cycles of 95°C for 15s, and 60° for 1 min. Fold changes were computed using the  $\Delta\Delta C_t$  method.  $\Delta C_t$  values were normalized to an internal control the Cyclophilin A. Each sample was analyzed in triplicate.

### **Statistical analysis**

Group comparisons were made using one-way ANOVA with Bonferroni's *post-hoc* test or Student's t-test using GraphPad Prism (Prism 5.0d, GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). All data are reported as mean  $\pm$  SD or SEM, and a value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### ***Characterization of primary neuron cultures differentiation***

To study the role of AMPK deregulation on synaptic integrity, we first performed *in vitro* differentiation kinetics of mouse primary neurons. Primary neurons were maintained up to 31 days *in vitro* (DIV), and the expression levels of AMPK subunits, pre- and post-synaptic proteins were assessed by western-blotting (WB) and immunocytochemistry (ICC). During the first days of differentiation, AMPK subunits expression level increased to remain constant after 10 DIV (Fig. 1a, b). Regarding synaptic markers, an increased expression of the pre-synaptic proteins synaptophysin (SYP), SNAP25, and Munc was observed during the first 17 days of differentiation, which then remained stable up to 31 DIV, except for SNAP25 which expression decreased after 27 DIV (Fig. 1a and c). The post-synaptic protein PSD-95 (post-synaptic density 95), the GluN1 subunit of NMDA receptor (N-methyl-D-aspartate receptor), and the GluA1 subunit of AMPA receptor ( $\alpha$ -amino-3-

hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor) also rose during neuronal differentiation, reached a plateau at around 17 DIV and decreased after 27 DIV (Fig. 1a and d).

ICC using the axonal marker SMI-312 and the dendritic marker MAP2 was next performed and showed that during differentiation, cells developed a dense network (Fig. 1e). Co-staining with the pre-synaptic marker synaptophysin (SYP) and the post-synaptic marker PSD-95 demonstrated the high synaptic density of neuronal networks (Fig. 1f). Finally, the electrical activity of neuronal networks was evaluated using multi-electrode arrays (MEA). Neuronal culture on MEA allows a non-invasive and simultaneous recording of electrical activity of whole neuronal networks<sup>29</sup>. Results showed that neuronal cultures displayed an increasing electrical activity during the differentiation process, defined by an increase of active electrodes, spikes and bursts numbers (Fig. 1g-i). The maximal electrical activity was reached at 20 DIV and remained stable up to 27 DIV. Neuronal networks activity correlated perfectly with the expression of synaptic markers. Altogether, these data showed that after 20 DIV, neurons had developed extensive networks of dendrites and synapses that were functional and remained healthy for up to 27 DIV.

#### ***AMPK deregulation leads to synaptic loss***

To analyze the impact of AMPK deregulation on synaptic integrity, AMPK chronic activation was induced at 20 DIV, when neurons were well differentiated in order to avoid any potential effect of AMPK deregulation on axon growth as previously described<sup>30,31</sup>. Primary neurons were treated with AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) from 20 up to 24 DIV. AICAR is a cell-permeable nucleoside which is metabolized by the adenosine kinase in an AMP analog, ZMP (AICA ribotide) that binds to the regulatory subunit of AMPK thus activating it. Samples were collected every day and synaptic markers were assessed by WB and ICC. Upon AICAR treatment, AMPK Thr<sup>172</sup> phosphorylation was maintained up to 4 days (Fig. 2a, b) and ACC Ser<sup>79</sup> phosphorylation, that was used to monitor AMPK activity, was consistently up-regulated at every time points (Fig. 2a, c). WB analysis showed that starting from 48h of AICAR treatment, a significant reduction of the pre-synaptic proteins SNAP25, Munc, and Synapsin Ia and IIb (Syn Ia, Syn IIb) expression was observed, reaching of 40%, 20%, 30% and 20% of decrease respectively (Fig. 2e-i). Analysis of the post-synaptic proteins PSD-95 and Homer1 bc expression showed a similar trend, significant reductions were observed starting at 48h, and reached respectively 30% and 50 % of decrease as compared to controls (Fig. 2e, j, k). The expression levels of the glutamate receptors subunits GluN1 and GluA1 were also significantly decreased by 30% after 48h of AICAR treatment (Fig. 2e, l, m). Post-synaptic densities (PSD) extractions were next performed to determine whether the pool of PSD-localized glutamate receptors was decreased. Following PSD extraction, PSD-95 was exclusively detected in the PSD fraction whereas synaptophysin (SYP) was recovered in the non-PSD fraction, demonstrating the quality of the extraction protocol<sup>28</sup>. Results demonstrated that the expression of post-synaptically localized

glutamate receptors were significantly decreased following AICAR treatment (Fig. 2n-r). Altogether, these data showed that AICAR treatment led to a significant reduction of synaptic markers, and suggested that AMPK deregulation might induce a loss of synaptic integrity. In order to rule out the possibility that the decrease of these synaptic markers was due to any cellular toxicity, we performed a cytotoxicity assay. To this end, a quantitative measure of lactate dehydrogenase (LDH), a cytosolic enzyme which is released upon cell lysis, was realized in the cell media of neurons treated or not with AICAR up to 96h (Fig. 2d). Additionally, a cell stress array was performed to monitor the expression or activation of 26 cell stress-related proteins. Results demonstrated that no significant toxicity or induction of cell stress were detected (Fig. 2d and Fig. S1). Altogether, these results showed that pharmacological AMPK activation led to a reduction of synaptic proteins without inducing any toxicity or apparent cellular stress during the first 72h of treatment.

To go further, ICC was implemented using the pre-synaptic marker SYP and the post-synaptic marker PSD-95 to allow quantification of synapses number (Fig. 3a). To this end, puncta analysis using the synaptcountJ plugin for ImageJ was performed as previously described<sup>27,32</sup>. Pharmacological AMPK deregulation using AICAR showed that post-synaptic puncta were significantly reduced after 48h of treatment (1533 puncta  $\pm$  52 in control condition compared to 1342 puncta  $\pm$  59 upon AICAR treatment), while pre-synaptic puncta were significantly reduced starting at 72h (894 puncta  $\pm$  35 in control condition compared to 714 puncta  $\pm$  33 in AICAR condition). The decrease in post-synaptic and pre-synaptic puncta correlated with significant reduction of synaptic puncta (767 puncta  $\pm$  23 in control condition compared to 603 puncta  $\pm$  24 upon AICAR treatment), that correspond to the codistribution of both pre- and post- synaptic markers (Fig. 3a-e). Overall, these results correlated with the decreased expression of synaptic proteins detected by WB and demonstrated that AMPK deregulation led to a loss of synapses.

To further demonstrate the implication of AMPK, similar experiments were performed using a direct AMPK activator, GSK621<sup>33,34</sup>. We first determined the efficiency of this drug by analyzing by WB the phosphorylation levels of AMPK Thr<sup>172</sup> and ACC Ser<sup>79</sup> and showed that GSK621 induced a significant activation of AMPK up to 96h of treatment (Fig. S2a-c) without inducing any toxicity (Fig. S2d). Similar to AICAR, we found that GSK621 treatment for 48h led to a significant reduction of the expression of the pre-synaptic proteins SNAP25 and synapsin Ia by 60 % and 40 % respectively (Fig. S2e-g). The expression of the post-synaptic proteins PSD-95, Homer 1bc and the glutamate receptor subunit GluN1 were also significantly decreased by 50%, 50% and 30 % respectively (Fig. S2e, h-j). Additionally, quantification of synapses number showed that after 48h of treatment with GSK621, the number of pre-synaptic puncta were significantly reduced (860 puncta  $\pm$  29 in control conditions compared to 679 puncta  $\pm$  24 upon GSK621 treatment), as well as the number of post-synaptic puncta (1362 puncta  $\pm$  64 in control conditions compared to 1105 puncta  $\pm$  63 upon GSK621 treatment), and

therefore the number of the synaptic puncta (723 puncta  $\pm$  35 in control conditions compared to 514 puncta  $\pm$  34 upon GSK621 treatment) (Fig. S2k-o). Overall, these results confirm those obtained with AICAR showing that AMPK deregulation induced synaptic loss.

#### ***AMPK-mediated synaptic loss results in neuronal networks activity impairment***

To determine whether the synaptic loss mediated by AMPK deregulation had an impact on synapses functionality, we assessed the electrical activity of neuronal networks using MEA. Primary neurons were cultured on MEA, and AMPK deregulation was induced pharmacologically using AICAR. Neuronal networks activity were recorded before treatments and every day for 96h. Results showed that the number of active electrodes was significantly reduced by 16% following 48h of AICAR treatment (Fig. 4a). In parallel, the number of spikes and bursts, which represent at least 2 consecutive spikes, were also significantly reduced by 19% and 34 % respectively after the treatment (Fig. 4b, c). Altogether, these results demonstrated that besides inducing a reduction of synaptic proteins expression, AMPK deregulation led to an impairment of neuronal networks activity that correlated with the decrease of synapses number.

#### ***AMPK induces synaptic loss through autophagy mediated clearance***

Finally, we wanted to determine the mechanism by which the synaptic loss occurred. As mentioned previously, AMPK regulates the autophagic pathway by directly phosphorylating the autophagy initiator ULK1 at Ser<sup>317,555,777</sup><sup>14</sup> and by indirectly impairing mTORC1-dependent inhibition of ULK1 through the direct phosphorylation of the protein Raptor at Ser<sup>792</sup>. Therefore, we hypothesized that autophagy might be implicated in AMPK-mediated synaptic loss. We first determined whether autophagy markers were changed following AMPK deregulation by assessing phosphorylation levels of ULK1 and Raptor. We observed an increase of ULK1 and Raptor phosphorylation at Ser<sup>555</sup> and Ser<sup>792</sup>, respectively, following AICAR or GSK621 treatment during 72h for ULK and at all-time points studied for Raptor (Fig. 5a-c, and Fig. S3a). Next, we evaluated the levels of SQSTM1/p62, an ubiquitin-binding protein degraded in autolysosomes, and the lipidation of the microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) to assess the autophagic flux following AMPK activation. p62 levels were significantly increased following 24h AICAR (Fig. 5a, d). p62 increase could either results from an inhibition of autophagic vesicles clearance or from transcriptional upregulation. To address the latter possibility, *SQSTM1/p62* mRNA levels were monitored by qRT-PCR following AICAR. Results showed that *SQSTM1/p62* mRNA levels were significantly increased after 24h of treatment (Fig. 5f), suggesting that the increase of SQSTM1/p62 levels likely resulted from transcriptional upregulation. Likewise, LC3 levels and lipidation were not affected by AICAR treatment (Fig.5 a, e), further supporting an increased autophagic activity following AMPK activation. Finally, lysosomal degradation of autophagosomes was prevented by treating neurons with Bafilomycin A1 (BafA1), an inhibitor of the vacuolar H<sup>+</sup> ATPase known to inhibit autolysosomes acidification and

autophagosome-lysosome fusion, to confirm autophagic flux activation. Quantification of autophagosomes in LC3 (pHluorin-mKate2) expressing neurons showed that significantly more autophagosomes accumulated when neurons were co-treated with AICAR or GSK621 and BafA1 as compared to the BafA1 condition (Fig. 5g, h and Fig. S3b, c), thus clearly demonstrating that autophagic flux was stimulated following AMPK deregulation. These data are in line with a recent study showing that AMPK is involved in the autophagic flux by up regulating autophagosomes maturation and autolysosomes fusion<sup>35</sup>.

Next, to determine whether autophagy induction was involved in the synaptic loss induced by AMPK deregulation, primary neurons were pre-treated with the specific ULK1 inhibitor MRT68921 20 min before AMPK stimulation with AICAR or GSK621. Autophagy initiation blockade was evidenced by the significant increase of p62 protein levels following MRT68921 treatment (Fig. 5i, j and Fig. S3d). After 48h of AMPK stimulation, we found that the inhibition of autophagy initiation reversed the effects of AMPK activation on the synaptic proteins PSD-95, GluN1 and GluA1 (Fig. 5i, k-m and Fig. S3d, f, g). Finally, immunocytochemistry using an antibody directed against PSD-95 in neurons co-treated with AICAR or GSK and BafA1 showed the co-distribution of PSD-95 and LC3 positive vesicles (Fig. 5n, o and Fig. S4h, i), further supporting the finding that post-synaptic markers degradation following AMPK deregulation is mediated by autophagy. However, the blockage of autophagy by MRT68921 did not reverse the decrease of the pre-synaptic proteins, SNAP25, Munc and Synapsin, expression induced by AMPK deregulation (data not shown). Overall, these results showed that ULK1-induced autophagy was involved at least in the degradation of post-synaptic proteins mediated by AMPK deregulation.

### ***In vivo deregulation of AMPK leads to synaptic loss***

To assess the consequences of AMPK deregulation *in vivo*, we took advantage of a constitutively active AMPK construct (CA-AMPK). We first determined the consequences of overexpressing CA-AMPK *in vitro* in primary neurons on synaptic integrity. To this end, primary neurons were infected with lentiviral vectors to deliver the CA-AMPK at 17 DIV up to 24 DIV. Efficiency of the CA-AMPK was confirmed by assessing the phosphorylation level of ACC Ser<sup>79</sup> after 7 days of transduction (Fig. 6a, c). Then, we analyzed the expression of the pre- and post-synaptic proteins. Upon CA-AMPK expression, we observed a significant reduction of the expression of the pre-synaptic proteins SNAP25, Munc and synapsin Ia by 30 %, 30 % and 20 % respectively (Fig. 6a, d-f) and of the post-synaptic proteins PSD-95, GluN1 and GluA1 by 40 %, 35 %, 40 % respectively (Fig 6a, g-i) which were not associated to any cell toxicity (Fig. 6b). Quantification of synapses demonstrated that following CA-AMPK expression, the number of synapses was significantly decreased (puncta  $575 \pm 18$  in control conditions compared to puncta  $350 \pm 13$  upon CA infection) (Fig. 6j, k). CA-AMPK overexpression also led to an activation of the autophagic pathway. Indeed, upon CA-AMPK

expression, we observed a significant increase of Raptor phosphorylation level on Ser<sup>792</sup> and ULK1 on Ser<sup>555</sup> while p62 protein expression was significantly decreased (Fig. 6l-o). Moreover, the expression level of LC3 II was not impacted by the expression of the CA-AMPK (Fig. 6l, p). Altogether these data demonstrated that CA-AMPK displayed the same effect on synaptic integrity through the regulation of autophagy than the pharmacological deregulation of AMPK.

To further determine whether AMPK could also be involved in the regulation of synaptic integrity *in vivo*, CA-AMPK was expressed in the dorsal hippocampus of wild-type mice. A month after the injection of lentiviral vectors for the delivery of CA-AMPK, hippocampus were extracted and WB were performed. Our results showed that in the CA-AMPK group, the post-synaptic proteins PSD-95, GluN1 and GluA1 were significantly reduced as compared to the Ctrl group (Fig. 7 a, f-h). While non-significant, we also observed a decreasing trend for the pre-synaptic proteins SNAP25, Munc and Synapsin Ia (Fig. 7a, c-e). Altogether, these data demonstrated that AMPK deregulation *in vivo* in the mouse brain also led to a decrease of synaptic integrity.

## Discussion

Here, we report that AMPK deregulation, as it is observed in AD, led to a loss of synaptic markers in cultured primary neurons. This decrease of synaptic markers was associated with a loss of synapses and accompanied by a decrease of neuronal network functionality. Additionally, we found that autophagy was involved in the degradation of synaptic markers. Finally, we confirmed that AMPK deregulation also induced a loss of synaptic markers *in vivo* in the mouse hippocampus. These results are in line with previous study showing that AMPK mediated dendritic spine loss induced by  $\beta$ -amyloid oligomers in hippocampal primary neurons and *in vivo* in the APP<sup>SWE,IND</sup> transgenic mouse model <sup>23</sup>.

While physiological synapse elimination, known as synaptic pruning, occurs during adolescence in humans, synaptic loss in adults is associated with cognitive impairments and is an early hallmark of neurodegenerative diseases including Alzheimer's <sup>3</sup>. However, the exact cellular and molecular mechanisms that are responsible for synaptic loss remain poorly understood. Nonetheless, synaptic proteins elimination could be mediated through autophagy-dependent processes. For instance, AMPA receptors are degraded through autophagy after chemical long-term depression <sup>36</sup>. In addition, proper regulation of autophagy is necessary to preserve neuronal integrity. In particular, down-regulation of Atg7, an enzyme required for autophagosome formation, significantly reduces spines elimination in primary neurons <sup>37</sup>. Further studies showed that Atg5 or Atg7 knockout in animal models leads to neurodegeneration <sup>38,39</sup>. Here, we extend on these previous findings and demonstrate that post-synaptic proteins elimination, at least for PSD-95, GluN1, and GluA1, is mediated by an AMPK driven autophagy-dependent process. However, how these post-synaptic components are targeted for

lysosomal degradation remains to be established. It is possible that ubiquitination could be involved. Indeed, selective autophagy is a process that degrades K63-linked polyubiquitinated chained or monoubiquitinated substrates<sup>40,41</sup>. In this process, the polyubiquitin chain is recognized by adaptor proteins, such as p62, which act as bridges to link ubiquitin to autophagosomes<sup>42</sup>. Interestingly, PSD-95 was reported to undergo K63 polyubiquitination<sup>43</sup>, and the ubiquitination of GluA1 in response to AMPA was reported to mediate the endocytosis and lysosomal trafficking of GluA1-containing AMPA receptors<sup>44</sup>. Intriguingly, our results suggest that pre-synaptic proteins (SNAP25, synapsin and Munc) are eliminated following AMPK deregulation by a process that is not dependent on ULK1-regulated autophagy. Indeed, ULK1 inhibition could not reverse the loss of these pre-synaptic proteins in our model. However, it is worth noting that ULK1-independent autophagy can also occur<sup>45</sup>. Therefore, we cannot exclude the possibility that pre-synaptic autophagy occurs and might be involved in the elimination of these pre-synaptic proteins or of other pre-synaptic components, including synaptic vesicles. Further investigations will be required to address this question and to determine the mechanism by which SNAP25, synapsin and Munc are eliminated following AMPK deregulation.

Autophagy-mediated elimination of post-synaptic proteins also suggest that autophagy could play a role in synaptic plasticity. Interestingly, few studies have assessed the role of autophagy in synaptic functions and whether synaptic plasticity is affected by autophagic flux remains to be clearly established. Nonetheless, some interesting studies have shown a role for autophagy in pre-synaptic buttons. Autophagy is locally regulated in the pre-synaptic compartment by the scaffolding proteins of the pre-synaptic zone, Bassoon and Piccolo<sup>46</sup>. Pre-synaptic autophagy regulates synaptic vesicles elimination in motoneurons<sup>47</sup> and dopaminergic axons<sup>39</sup>, thus regulating neurotransmitter release. Autophagic degradation of post-synaptic proteins was also proposed to be involved in BDNF-induced synaptic plasticity<sup>48</sup>. Interestingly, a recent study demonstrated that autophagy is required to erase auditory fear memory through synaptic destabilization<sup>49</sup>. In our study, we found that deregulation of AMPK induced autophagic clearance of post-synaptic components that correlated with a loss of neuronal networks activity. Altogether, these results suggest that AMPK deregulation could impair synaptic plasticity and memory. Interestingly, pharmacological AMPK activation with AICAR or metformin was reported to impair synaptic plasticity in *ex vivo* hippocampal slices through a mechanism involving mTOR signaling<sup>50</sup>. Similarly, AMPK deregulation is also responsible for the synaptic defects mediated by  $\beta$ -amyloid peptides<sup>51</sup>. Overall, these studies showed that AMPK deregulation has a detrimental effect on synaptic plasticity and therefore could impact memory formation. In this context, previous studies have shown that intrahippocampal infusion of AICAR in WT rats impaired their spatial memory<sup>52</sup>, and that expression of the CA-AMPK construct in the CA1 region of rat hippocampus repressed the formation of long-term fear memory<sup>53</sup>. However, further work will be necessary to clearly establish the exact role of the AMPK-regulated autophagy pathway on these processes.

Beside its role in clearing misfolded or aggregated proteins and damaged organelles, autophagy is important for balancing energy sources in response to nutrient stress to allow cells to reutilize their own constituents (Review: <sup>54</sup>). Importantly, synapses, and in particular post-synaptic compartments, are the major site of energy consumption in the brain. Overall, our data suggest that AMPK deregulation through the enhancement of synaptic constituents degradation via autophagy could help preserve neuronal energy. In addition, the elimination of functional synapses by reducing neuronal energy consumption could promote neuronal survival in conditions of energy stress. It is interesting to note that AMPK was previously reported in other cell models to promote cellular senescence, an adaptation mechanism that allow cellular survival. For instance, increased AMPK activity is found in senescent fibroblasts <sup>55,56</sup>; and LKB1, the main AMPK kinase, is up-regulated in endothelial senescent cells and its overexpression can induce senescence through AMPK activation <sup>57</sup>. While senescence as long been attributed to dividing cells, evidences also suggest that a senescence-like phenotype can be observed in post-mitotic neurons <sup>58</sup>. Very interestingly, two recent papers investigated the role of cellular senescence in neurodegeneration and showed that the elimination of senescent neurons or glial cells using genetic tools or senolytics prevented or slowed neurodegeneration and cognitive decline in mouse models of tauopathies <sup>59,60</sup>. It would be interesting in this context, to determine whether AMPK deregulation could induce a senescence-like phenotype in neurons.

## **Conclusions**

Here, we demonstrate that deregulation of the metabolic sensor and regulator AMPK, is sufficient to induce synaptic loss and neuronal networks dysfunction. Our data also show that autophagy is induced in response to AMPK deregulation and participate to the elimination of post-synaptic proteins.

Altogether, our work has established AMPK as a potential link between energetic failure and synaptic integrity in neurodegenerative conditions such as AD, and it suggests that autophagy might link environmental conditions with synaptic plasticity through the AMPK pathway.

## **Author contributions**

Conceptualization, V.V.; Formal Analysis, M.D. and V.V.; Investigation, M.D., S.D., F.S., R.C., and C.M.; Resources, S.B., S.C., M.C., and L.B.; Writing – Original Draft, M.D. and V.V.; Writing – Review & Editing, M.D., C.M., L.B., and V.V.; Visualization, M.D. and V.V.; Supervision, V.V.; Funding Acquisition, L.B. and V.V. All authors read and approved the final manuscript.

## **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## **Acknowledgements**



We thank the animal core facility (animal facilities of Université de Lille-Inserm) of “Plateformes en Biologie Santé de Lille” as well as C. Degraeve, M. Besegher-Dumoulin, J. Devassine, R. Dehaynin and D. Taillieu for animal care. We thank Dr. Isei Tanida for providing FUGW-PK-hLC3 and FUGW-PK-hLC3ΔG plasmids.

This work was supported by the French Fondation pour la coopération Scientifique – Plan Alzheimer 2008-2012 (Senior Innovative Grant 2013) to VV, by the Fondation Vaincre Alzheimer (n°FR-16071p to VV), and in part through the Labex DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary Approach to Alzheimer’s disease). MD holds a doctoral scholarship from Lille 2 University.

## References

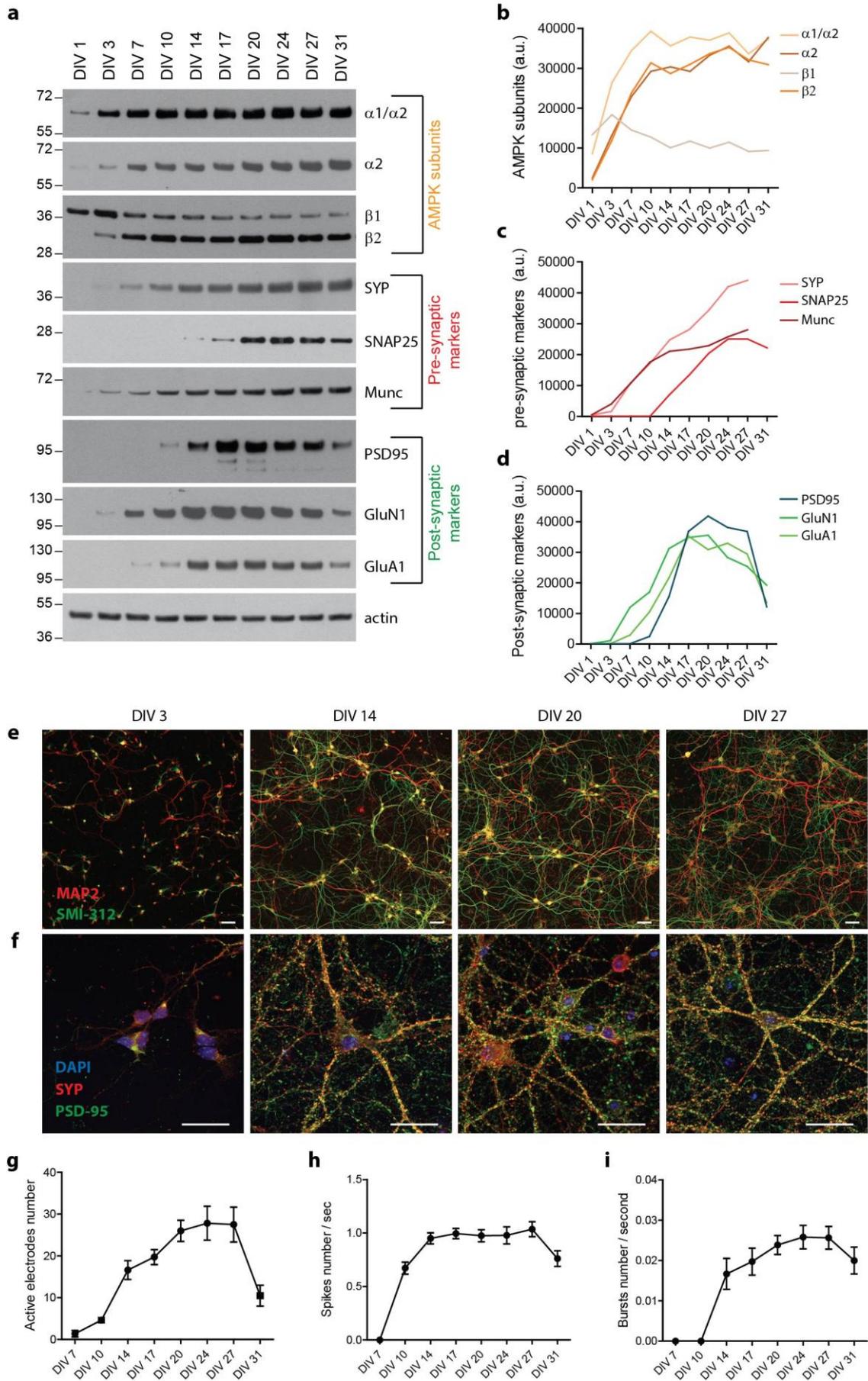
- 1 Terry, R. D. *et al.* Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of neurology* **30**, 572-580, doi:10.1002/ana.410300410 (1991).
- 2 DeKosky, S. T. & Scheff, S. W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Annals of neurology* **27**, 457-464, doi:10.1002/ana.410270502 (1990).
- 3 de Wilde, M. C., Overk, C. R., Sijben, J. W. & Masliah, E. Meta-analysis of synaptic pathology in Alzheimer's disease reveals selective molecular vesicular machinery vulnerability. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* **12**, 633-644, doi:10.1016/j.jalz.2015.12.005 (2016).
- 4 Baglietto-Vargas, D. *et al.* Impaired AMPA signaling and cytoskeletal alterations induce early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Aging cell*, e12791, doi:10.1111/accel.12791 (2018).
- 5 Chen, M. K. *et al.* Assessing Synaptic Density in Alzheimer Disease With Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Positron Emission Tomographic Imaging. *JAMA neurology*, doi:10.1001/jamaneurol.2018.1836 (2018).
- 6 Attwell, D. & Laughlin, S. B. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **21**, 1133-1145, doi:10.1097/00004647-200110000-00001 (2001).
- 7 Harris, J. J., Jolivet, R. & Attwell, D. Synaptic energy use and supply. *Neuron* **75**, 762-777, doi:10.1016/j.neuron.2012.08.019 (2012).
- 8 Rangaraju, V., Calloway, N. & Ryan, T. A. Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function. *Cell* **156**, 825-835, doi:10.1016/j.cell.2013.12.042 (2014).
- 9 Pathak, D. *et al.* The role of mitochondrially derived ATP in synaptic vesicle recycling. *The Journal of biological chemistry* **290**, 22325-22336, doi:10.1074/jbc.M115.656405 (2015).
- 10 Marinangeli, C. *et al.* AMP-activated protein kinase is essential for the maintenance of energy levels during synaptic activation. *bioRxiv*, doi:https://doi.org/10.1101/303867 (2018).
- 11 Caminiti, S. P. *et al.* FDG-PET and CSF biomarker accuracy in prediction of conversion to different dementias in a large multicentre MCI cohort. *NeuroImage. Clinical* **18**, 167-177, doi:10.1016/j.nicl.2018.01.019 (2018).

- 12 Turnley, A. M. *et al.* Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *Journal of neurochemistry* **72**, 1707-1716 (1999).
- 13 Carling, D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends in biochemical sciences* **29**, 18-24, doi:10.1016/j.tibs.2003.11.005 (2004).
- 14 Egan, D. F. *et al.* Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**, 456-461, doi:10.1126/science.1196371 (2011).
- 15 Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K. L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* **13**, 132-141, doi:10.1038/ncb2152 (2011).
- 16 Rabanal-Ruiz, Y., Otten, E. G. & Korolchuk, V. I. mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays in biochemistry* **61**, 565-584, doi:10.1042/EBC20170027 (2017).
- 17 Vingtdeux, V., Davies, P., Dickson, D. W. & Marambaud, P. AMPK is abnormally activated in tangle- and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Acta neuropathologica* **121**, 337-349, doi:10.1007/s00401-010-0759-x (2011).
- 18 Marinangeli, C., Didier, S. & Vingtdeux, V. AMPK in Neurodegenerative Diseases: Implications and Therapeutic Perspectives. *Current drug targets* **17**, 890-907 (2016).
- 19 Vingtdeux, V. *et al.* AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *The Journal of biological chemistry* **285**, 9100-9113, doi:10.1074/jbc.M109.060061 (2010).
- 20 Vingtdeux, V. *et al.* Novel synthetic small-molecule activators of AMPK as enhancers of autophagy and amyloid-beta peptide degradation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 219-231, doi:10.1096/fj.10-167361 (2011).
- 21 Thornton, C., Bright, N. J., Sastre, M., Muckett, P. J. & Carling, D. AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid beta-peptide exposure. *The Biochemical journal* **434**, 503-512, doi:10.1042/BJ20101485 (2011).
- 22 Domise, M. *et al.* AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology in vivo. *Scientific reports* **6**, 26758, doi:10.1038/srep26758 (2016).
- 23 Mairet-Coello, G. *et al.* The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of Aβ oligomers through Tau phosphorylation. *Neuron* **78**, 94-108, doi:10.1016/j.neuron.2013.02.003 (2013).
- 24 Brouillette, J. *et al.* Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight amyloid-beta<sub>1-42</sub> oligomers are revealed in vivo by using a novel animal model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**, 7852-7861, doi:10.1523/JNEUROSCI.5901-11.2012 (2012).
- 25 Caillierez, R. *et al.* Lentiviral delivery of the human wild-type tau protein mediates a slow and progressive neurodegenerative tau pathology in the rat brain. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **21**, 1358-1368, doi:10.1038/mt.2013.66 (2013).
- 26 Tanida, I., Ueno, T. & Uchiyama, Y. A super-ecliptic, pHluorin-mKate2, tandem fluorescent protein-tagged human LC3 for the monitoring of mammalian autophagy. *PloS one* **9**, e110600, doi:10.1371/journal.pone.0110600 (2014).
- 27 Ippolito, D. M. & Eroglu, C. Quantifying synapses: an immunocytochemistry-based assay to quantify synapse number. *Journal of visualized experiments : JoVE*, doi:10.3791/2270 (2010).
- 28 Frandemiche, M. L. *et al.* Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **34**, 6084-6097, doi:10.1523/JNEUROSCI.4261-13.2014 (2014).

- 29 Gross, G. W., Rieske, E., Kreutzberg, G. W. & Meyer, A. A new fixed-array multi-  
microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal  
activity in vitro. *Neuroscience letters* **6**, 101-105 (1977).
- 30 Williams, T., Courchet, J., Viollet, B., Brenman, J. E. & Polleux, F. AMP-activated protein  
kinase (AMPK) activity is not required for neuronal development but regulates axogenesis  
during metabolic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States  
of America* **108**, 5849-5854, doi:10.1073/pnas.1013660108 (2011).
- 31 Amato, S. *et al.* AMP-activated protein kinase regulates neuronal polarization by interfering  
with PI 3-kinase localization. *Science* **332**, 247-251, doi:10.1126/science.1201678 (2011).
- 32 Eroglu, C. *et al.* Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor  
responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* **139**, 380-392,  
doi:10.1016/j.cell.2009.09.025 (2009).
- 33 Chen, L. *et al.* AMPK activation by GSK621 inhibits human melanoma cells in vitro and in  
vivo. *Biochemical and biophysical research communications* **480**, 515-521,  
doi:10.1016/j.bbrc.2016.10.040 (2016).
- 34 Sujobert, P. *et al.* Co-activation of AMPK and mTORC1 Induces Cytotoxicity in Acute  
Myeloid Leukemia. *Cell reports* **11**, 1446-1457, doi:10.1016/j.celrep.2015.04.063 (2015).
- 35 Jang, M. *et al.* AMPK contributes to autophagosome maturation and lysosomal fusion.  
*Scientific reports* **8**, 12637, doi:10.1038/s41598-018-30977-7 (2018).
- 36 Shehata, M., Matsumura, H., Okubo-Suzuki, R., Ohkawa, N. & Inokuchi, K. Neuronal  
stimulation induces autophagy in hippocampal neurons that is involved in AMPA receptor  
degradation after chemical long-term depression. *The Journal of neuroscience : the official  
journal of the Society for Neuroscience* **32**, 10413-10422, doi:10.1523/JNEUROSCI.4533-  
11.2012 (2012).
- 37 Tang, G. *et al.* Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic  
pruning deficits. *Neuron* **83**, 1131-1143, doi:10.1016/j.neuron.2014.07.040 (2014).
- 38 Komatsu, M. *et al.* Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal  
homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proceedings of the National Academy  
of Sciences of the United States of America* **104**, 14489-14494, doi:10.1073/pnas.0701311104  
(2007).
- 39 Hernandez, D. *et al.* Regulation of presynaptic neurotransmission by macroautophagy. *Neuron*  
**74**, 277-284, doi:10.1016/j.neuron.2012.02.020 (2012).
- 40 Kirkin, V., McEwan, D. G., Novak, I. & Dikic, I. A role for ubiquitin in selective autophagy.  
*Molecular cell* **34**, 259-269, doi:10.1016/j.molcel.2009.04.026 (2009).
- 41 Kwon, Y. T. & Ciechanover, A. The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and  
Autophagy. *Trends in biochemical sciences* **42**, 873-886, doi:10.1016/j.tibs.2017.09.002  
(2017).
- 42 Cohen-Kaplan, V., Livneh, I., Avni, N., Cohen-Rosenzweig, C. & Ciechanover, A. The  
ubiquitin-proteasome system and autophagy: Coordinated and independent activities. *The  
international journal of biochemistry & cell biology* **79**, 403-418,  
doi:10.1016/j.biocel.2016.07.019 (2016).
- 43 Ma, Q. *et al.* Proteasome-independent polyubiquitin linkage regulates synapse scaffolding,  
efficacy, and plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States  
of America* **114**, E8760-E8769, doi:10.1073/pnas.1620153114 (2017).
- 44 Schwarz, L. A., Hall, B. J. & Patrick, G. N. Activity-dependent ubiquitination of GluA1  
mediates a distinct AMPA receptor endocytosis and sorting pathway. *The Journal of  
neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**, 16718-16729,  
doi:10.1523/JNEUROSCI.3686-10.2010 (2010).

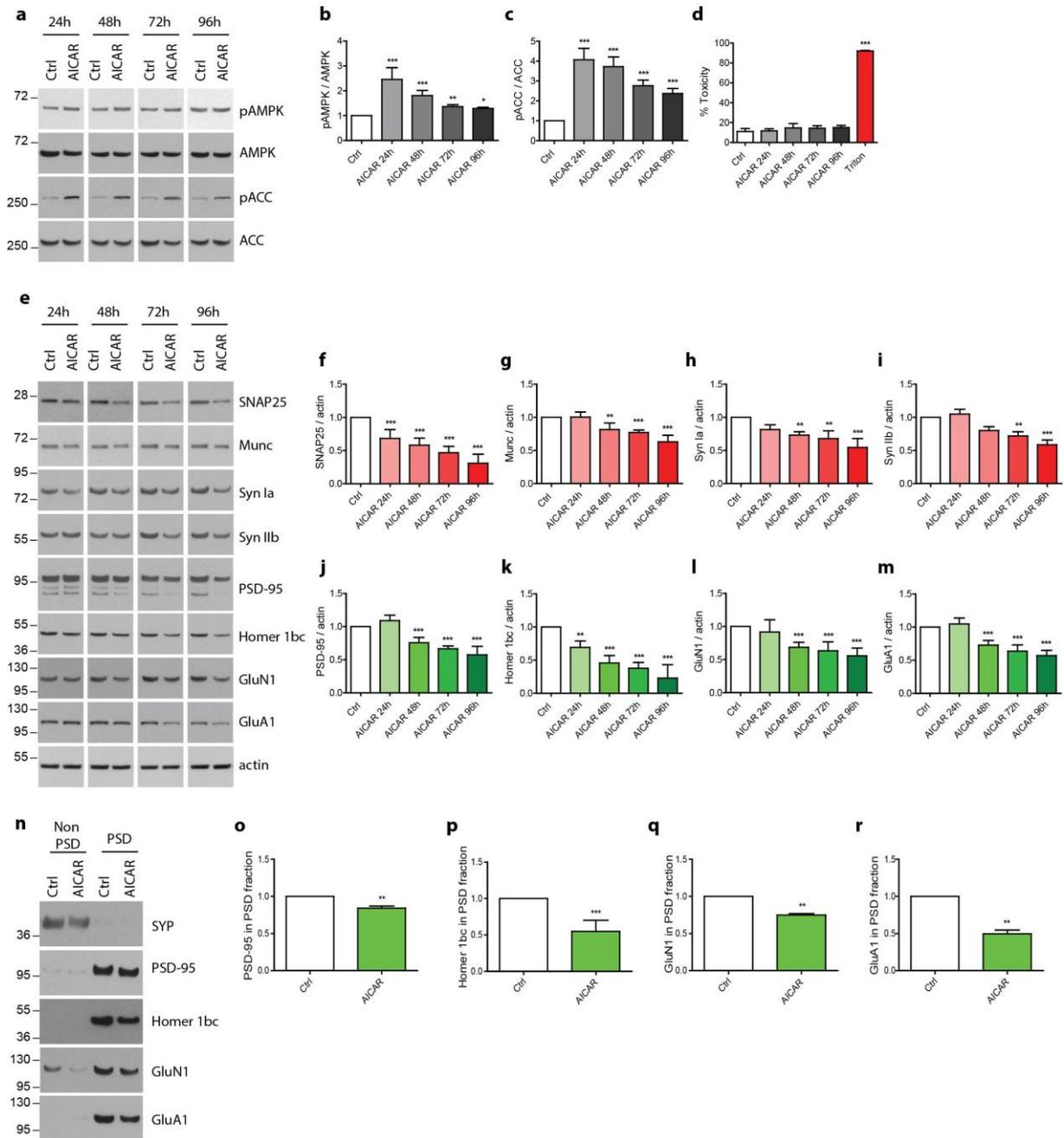
- 45 Cheong, H., Lindsten, T., Wu, J., Lu, C. & Thompson, C. B. Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 11121-11126, doi:10.1073/pnas.1107969108 (2011).
- 46 Okerlund, N. D. *et al.* Bassoon Controls Presynaptic Autophagy through Atg5. *Neuron* **93**, 897-913 e897, doi:10.1016/j.neuron.2017.01.026 (2017).
- 47 Luningschror, P. *et al.* Plekhg5-regulated autophagy of synaptic vesicles reveals a pathogenic mechanism in motoneuron disease. *Nature communications* **8**, 678, doi:10.1038/s41467-017-00689-z (2017).
- 48 Nikolettou, V., Sidiropoulou, K., Kallergi, E., Dalezios, Y. & Tavernarakis, N. Modulation of Autophagy by BDNF Underlies Synaptic Plasticity. *Cell metabolism* **26**, 230-242 e235, doi:10.1016/j.cmet.2017.06.005 (2017).
- 49 Shehata, M. *et al.* Autophagy Enhances Memory Erasure through Synaptic Destabilization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **38**, 3809-3822, doi:10.1523/JNEUROSCI.3505-17.2018 (2018).
- 50 Potter, W. B. *et al.* Metabolic regulation of neuronal plasticity by the energy sensor AMPK. *PloS one* **5**, e8996, doi:10.1371/journal.pone.0008996 (2010).
- 51 Ma, T. *et al.* Inhibition of AMP-activated protein kinase signaling alleviates impairments in hippocampal synaptic plasticity induced by amyloid beta. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **34**, 12230-12238, doi:10.1523/JNEUROSCI.1694-14.2014 (2014).
- 52 Dash, P. K., Orsi, S. A. & Moore, A. N. Spatial memory formation and memory-enhancing effect of glucose involves activation of the tuberous sclerosis complex-Mammalian target of rapamycin pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 8048-8056, doi:10.1523/JNEUROSCI.0671-06.2006 (2006).
- 53 Han, Y. *et al.* AMPK Signaling in the Dorsal Hippocampus Negatively Regulates Contextual Fear Memory Formation. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **41**, 1849-1864, doi:10.1038/npp.2015.355 (2016).
- 54 Singh, R. & Cuervo, A. M. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell metabolism* **13**, 495-504, doi:10.1016/j.cmet.2011.04.004 (2011).
- 55 Wang, W., Yang, X., Lopez de Silanes, I., Carling, D. & Gorospe, M. Increased AMP:ATP ratio and AMP-activated protein kinase activity during cellular senescence linked to reduced HuR function. *The Journal of biological chemistry* **278**, 27016-27023, doi:10.1074/jbc.M300318200 (2003).
- 56 Zwerschke, W. *et al.* Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *The Biochemical journal* **376**, 403-411, doi:10.1042/BJ20030816 (2003).
- 57 Zu, Y. *et al.* SIRT1 promotes proliferation and prevents senescence through targeting LKB1 in primary porcine aortic endothelial cells. *Circulation research* **106**, 1384-1393, doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.215483 (2010).
- 58 Jurk, D. *et al.* Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging cell* **11**, 996-1004, doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00870.x (2012).
- 59 Musi, N. *et al.* Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Aging cell*, e12840, doi:10.1111/accel.12840 (2018).
- 60 Bussian, T. J. *et al.* Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature*, doi:10.1038/s41586-018-0543-y (2018).

**Figure 1**



**Figure 1: Synaptic markers expression and networks activity during neuronal differentiation (a-d)** Primary neurons were harvested at the indicated days *in vitro* (DIV). Western Blot (WB) analysis (a) and quantification of the expression levels of the different AMPK subunits ( $\alpha 1/\alpha 2$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  and  $\beta 2$ ) (b), of the pre-synaptic markers synaptophysin (SYP), SNAP25 and Munc (c) and of the post-synaptic markers PSD-95, GluN1 subunit of NMDA receptor and GluA1 subunit of AMPA receptor (d). Results represent mean, n = 4, a.u. = arbitrary units. (e-f) Immunostaining of axons (SMI-312, green) and dendrites (MAP2, red) (e) and of the pre-synaptic marker SYP (red) and the post-synaptic marker PSD-95 (green) (f) in primary neurons during neuronal differentiation. (g-i) Electrical activity of neuronal networks recorded in primary neurons seeded on multi-electrodes arrays (MEA) at the indicated DIV. Quantification of the number of active electrodes (g), spikes per second (h) and bursts per second (i) during neuronal differentiation. Results represent mean  $\pm$  SEM, n = 5-6.

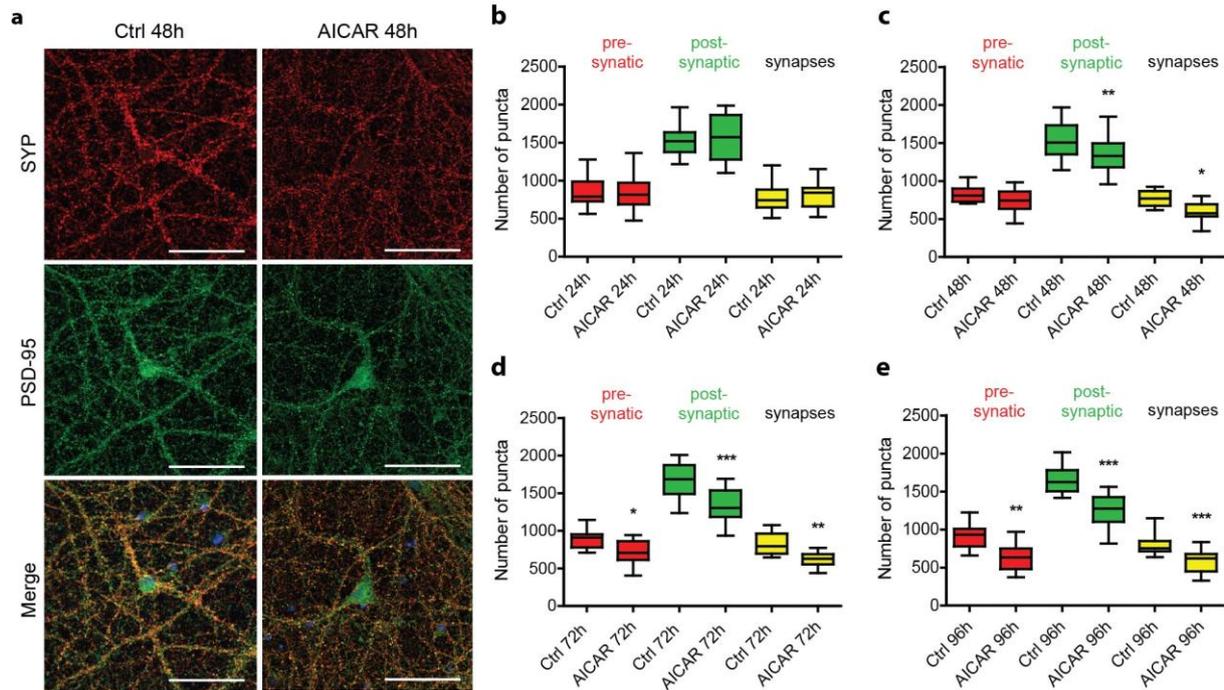
**Figure 2**



**Figure 2: Impact of AMPK deregulation on synaptic markers expression.** Primary neurons were treated at 20 DIV for the indicated times with the AMPK activator, AICAR (1 mM). **(a)** Cells lysates were analyzed by WB with antibodies directed against phospho-Thr<sup>172</sup>AMPK (pAMPK), AMPK, phospho-Ser<sup>79</sup>ACC (pACC), ACC and actin. **(b-c)** Quantification of the ratios pAMPK/AMPK **(b)** and pACC/ACC **(c)**. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 6. **(d)** Cytotoxicity was assessed using the lactate dehydrogenase (LDH) assay after 24h, 48h, 72h and 96h of AICAR treatment. Treatment with 0.9% Triton X-100 was used as a positive control. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 6. **(e-m)** Synaptic markers expression upon AMPK deregulation with AICAR treatment. WB analysis **(e)** and quantification of the pre-synaptic markers SNAP25 **(f)**, Munc **(g)**, synapsin Ia (Syn Ia) **(h)** and IIb (Syn IIb) **(i)** and the post-synaptic markers PSD-95 **(j)**, Homer 1bc **(k)**, GluN1 **(l)** and GluA1 **(m)**. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 6. **(n-r)** Post-synaptic densities extractions were performed after 48h AICAR treatment. Resulting non PSD and PSD fraction were analyzed by WB **(n)** and expression of the post-synaptic markers PSD-95 **(o)**, Homer 1bc **(p)**, GluN1 **(q)** and GluA1 **(r)** was quantified in the PSD fraction. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 4. One way ANOVA with Bonferroni's post hoc test was used for **(b-d and f-m)** experiments and Student's t-test was used for **(o-r)** experiments. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 compared to Ctrl.

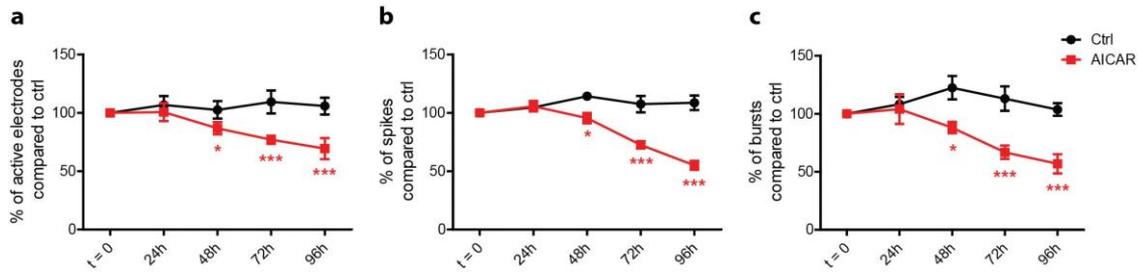


**Figure 3**



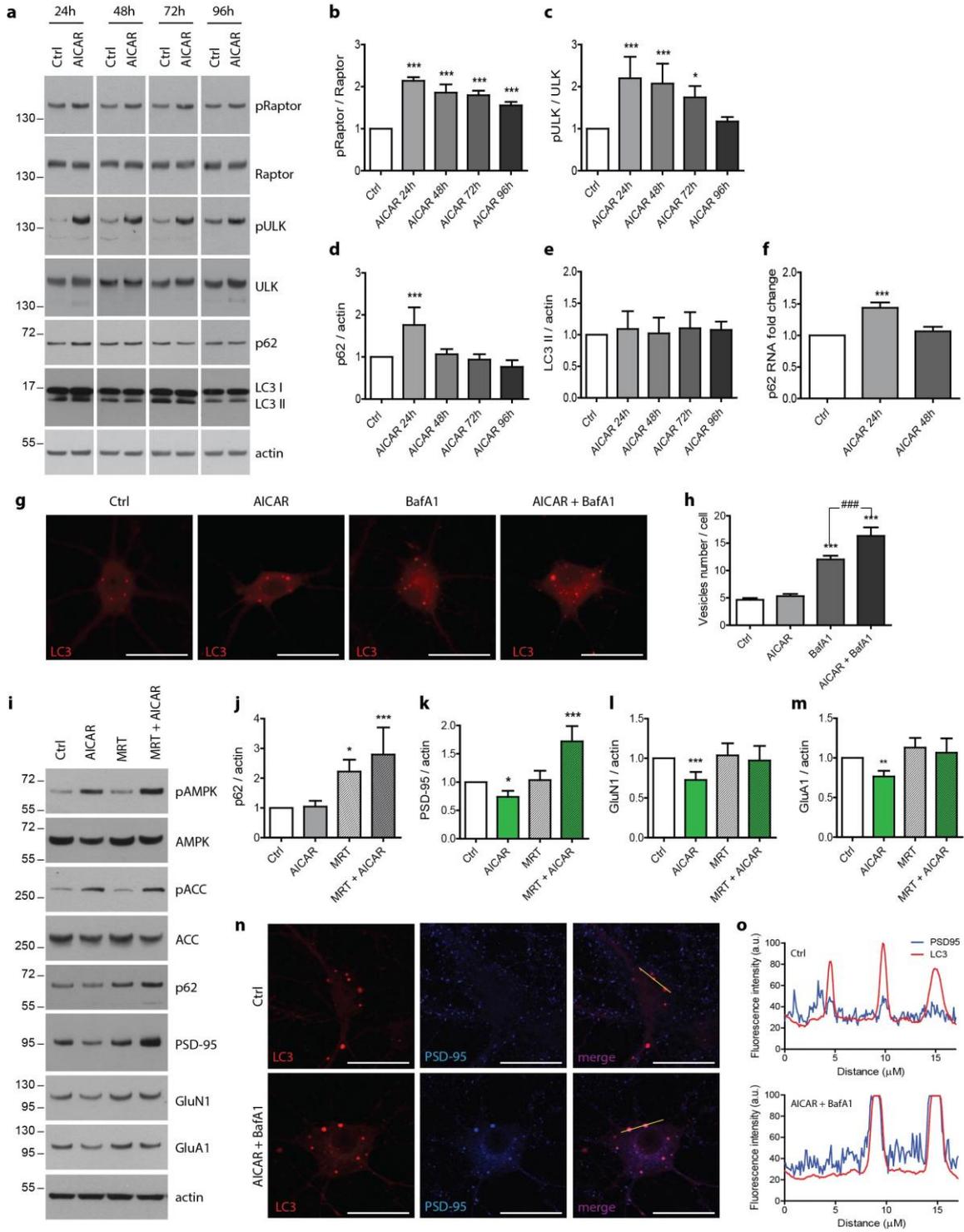
**Figure 3: Effect of AMPK deregulation on synaptic density.** AMPK deregulation was induced in primary neurons using AICAR (1 mM) at 20 DIV for the indicated times. **(a)** Immunostaining using antibodies directed against the pre-synaptic marker synaptophysin (SYP, red) and the post-synaptic marker PSD-95 (green) on neurons treated or not with AICAR for 48h. **(b-e)** Quantification of pre-synaptic (red), post-synaptic (green) and synaptic (yellow) puncta upon AICAR treatment for 24h **(b)**, 48h **(c)**, 72h **(d)** and 96h **(e)**. Results represent mean  $\pm$  SEM,  $n = 32$  neurons counted from 3 independent experiments. One way ANOVA with Bonferroni's post hoc test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .

**Figure 4**



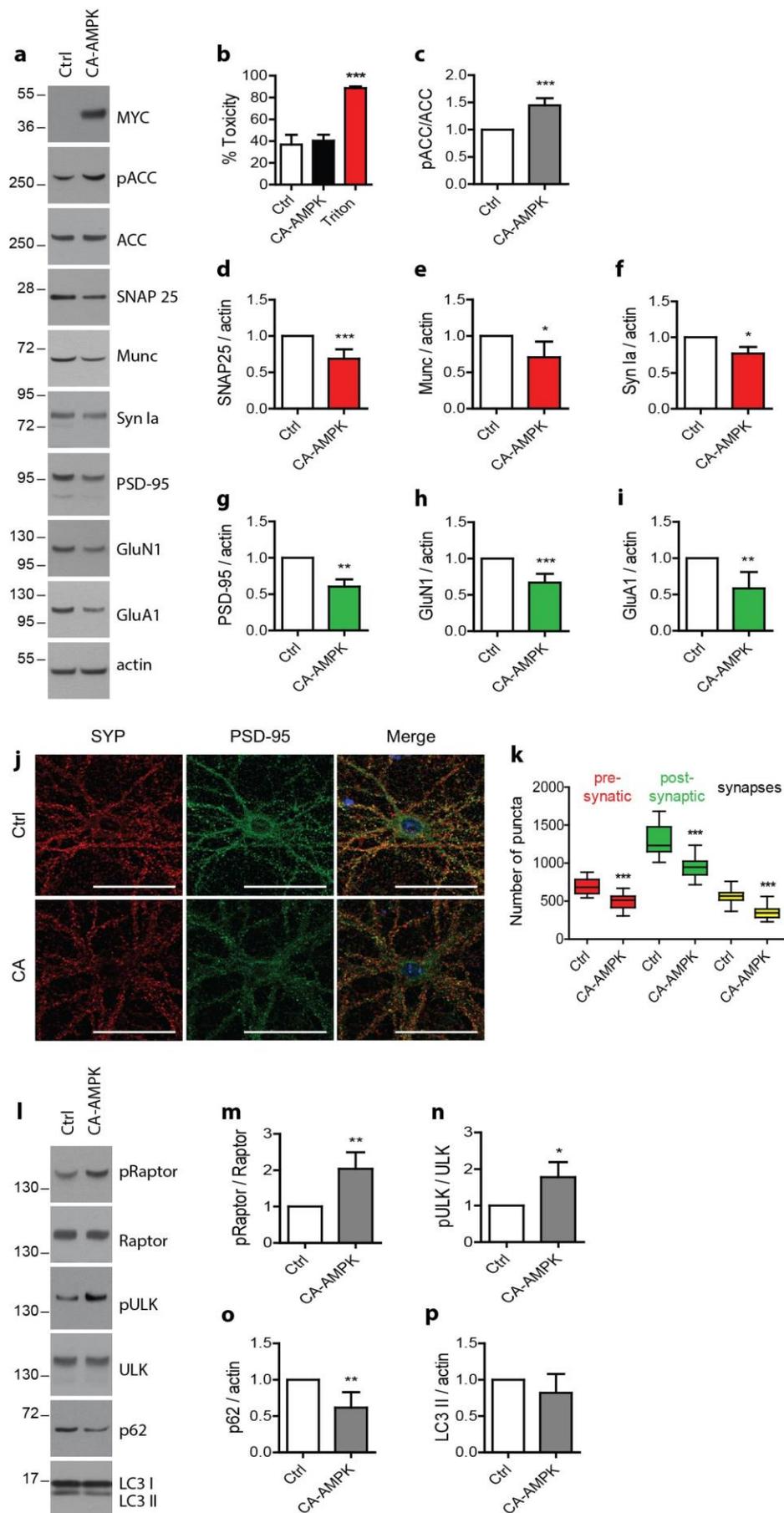
**Figure 4: Effect of AMPK deregulation on neuronal networks activity.** Primary neurons seeded on MEA were subjected or not to AMPK deregulation with AICAR (1 mM) at 20 DIV. (a-c) Electrical activity was recorded for the indicated times. Quantification of the number of active electrodes (a), spikes (b) and bursts (c) expressed in percentage of t = 0. Results represent mean  $\pm$  SEM, n = 5-6. One way ANOVA with Bonferroni's post hoc test. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 compared to t = 0.

**Figure 5**



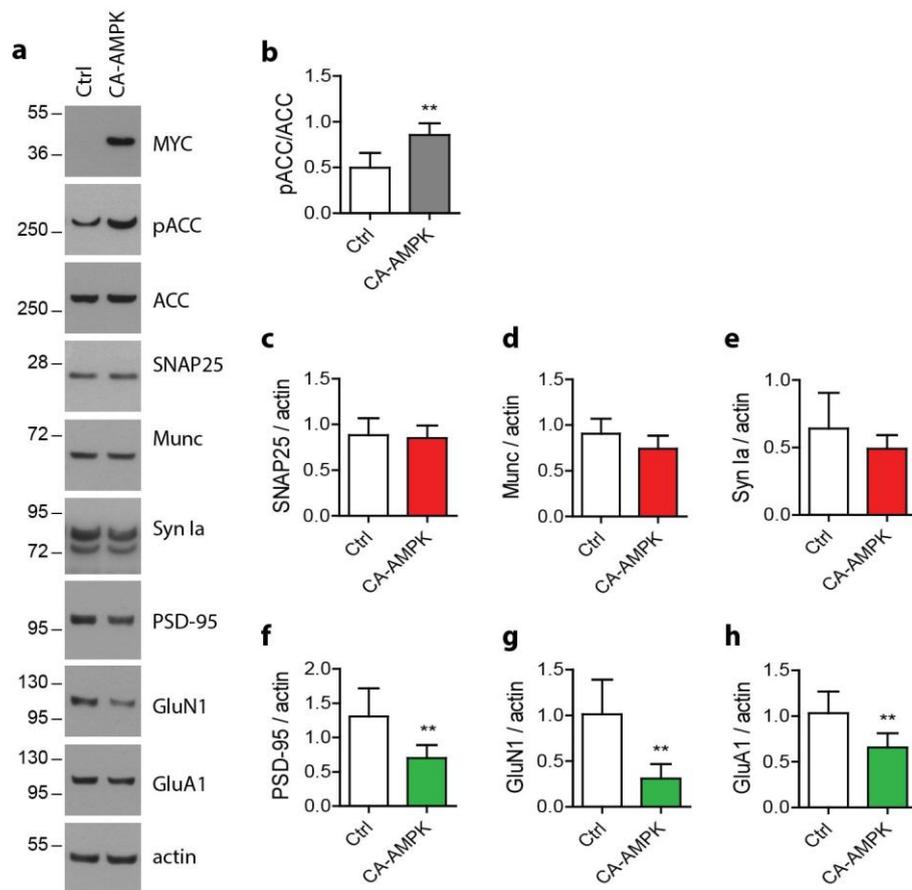
**Figure 5: Involvement of autophagy in post-synaptic markers degradation.** Neurons were treated with AICAR (1 mM) at 20 DIV for the indicated times. **(a)** Cell lysates were analyzed by WB for phospho-Ser<sup>792</sup>Raptor (pRaptor), Raptor, phospho-Ser<sup>555</sup>ULK (pULK), ULK1, and p62. **(b-e)** Quantification of the ratios pRaptor/Raptor **(b)**, pULK/ULK **(c)** p62/actin **(d)** and LC3 II/actin **(e)**. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 4. **(f)** p62 mRNA levels assessed by RT-qPCR after 24h and 48h of AICAR treatment. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 7. **(g)** Visualization of mKate2-LC3 in neurons treated with AICAR (1mM, 48h), BafilomycinA1 (BafA1, 100 nM, 24h) or both. **(h)** Quantification of mKate2-LC3 positive vesicles number by cell. Results represent mean  $\pm$  SEM, n = 30 neurons counted from 3 independent experiments. Scale bar = 25  $\mu$ m. **(i-m)** Primary neurons at 20 DIV were pre-treated with the autophagy inhibitor MRT68921 (MRT, 2.5  $\mu$ M) for 20 min prior to AICAR treatment (1 mM, 48h). WB analysis **(i)** and quantification of p62 **(j)**, PSD-95 **(k)**, GluN1 **(l)** and GluA1 **(m)**. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 4. **(n)** PSD-95 immunostaining (blue) in neurons expressing mKate2-LC3 (red) and co-treated with AICAR (1 mM, 48h) and BafilomycinA1 (BafA1, 100 nM, 24h). **(o)** Fluorescence profile corresponding to the yellow lines in **(n)** and showing the co-distribution of LC3 and PSD-95 in neurons co-treated with AICAR and BafA1. Scale bar = 25  $\mu$ m. a.u. = arbitrary units. One way ANOVA with Bonferroni's post hoc test was used for all experiments. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 compared to the Ctrl, ###p < 0.001 compared to BafA1 condition.

**Figure 6**



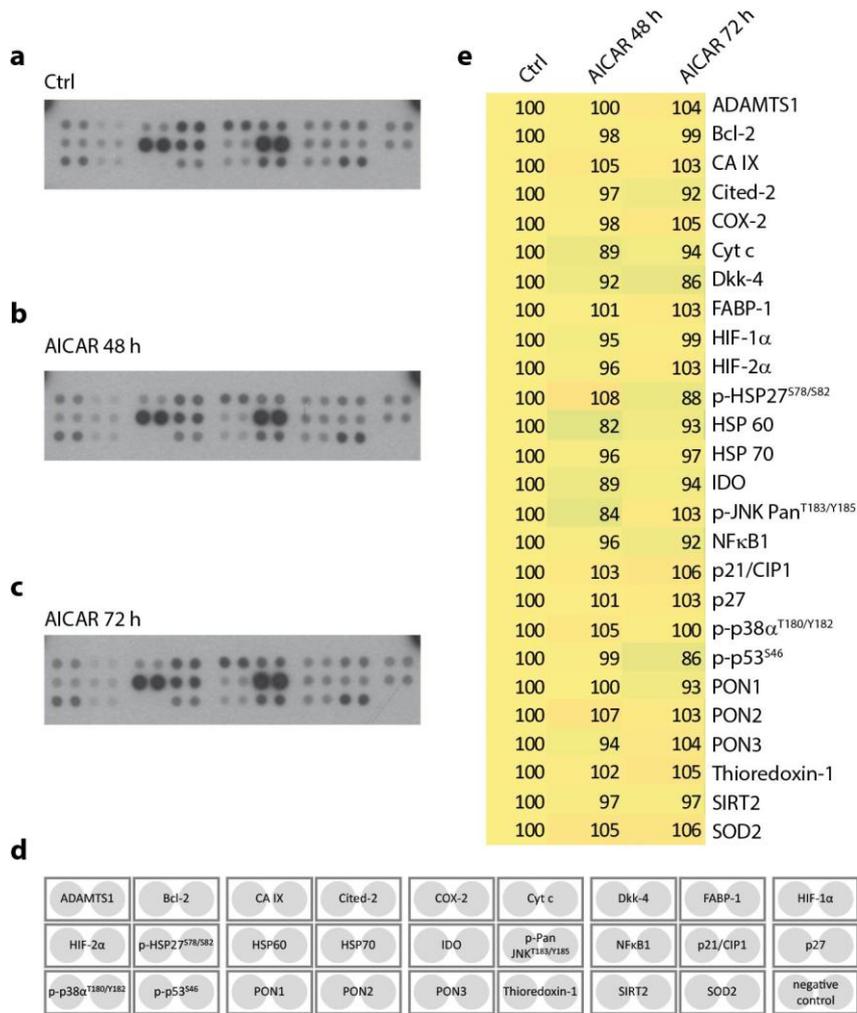
**Figure 6: Effect of CA-AMPK expression on synaptic integrity, density, and autophagic markers.** Primary neurons were infected at 17 DIV with a constitutively active form of AMPK (CA-AMPK) for 7 days. **(b)** Cytotoxicity was assessed by measuring the lactate dehydrogenase (LDH) released in cell media. Treatment with 0.9% Triton X-100 was used as a positive control. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 4. Cells lysates were analyzed by WB **(a)** and the ratio pACC/ACC was quantified **(c)**. **(d-i)** Quantification of the pre-synaptic markers SNAP25 **(d)**, Munc **(e)** and synapsin Ia **(f)** and the post-synaptic markers PSD-95 **(g)**, GluN1 **(h)** and GluA1 **(i)**. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 8. **(j)** Immunostaining of synaptophysin (SYP, red) and PSD-95 (green) in primary neurons infected at 17 DIV with the CA-AMPK for 7 days. **(k)** Quantification of pre-synaptic (red), post-synaptic (green) and synaptic (yellow) puncta upon CA-AMPK expression. Results represent mean  $\pm$  SEM, n = 38 neurons counted from 5 independent experiments. Scale bar = 50  $\mu$ m. **(l-p)** Analysis of the expression of proteins involved in autophagy pathway. Quantification of the ratios pRaptor/Raptor **(m)** and pULK/ULK **(n)** and of the expression level of p62 **(o)** and LC3 II proteins **(p)**. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 6. Student's t-test was performed for **(c-i)** and **(m-p)** experiments. One way ANOVA with Bonferroni's post hoc test was used for **(b, k)** experiments. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 compared to Ctrl.

**Figure 7**



**Figure 7: Impact of AMPK deregulation on synaptic markers *in vivo* in mice.** 2 months-old WT mice were injected with lentiviral vectors (LV) to allow the expression of the CA-AMPK in the hippocampus. Hippocampus were extracted 1 month after LV injections and lysates were analyzed by WB (a). WB quantification of pACC/ACC ratio (b) and of the expression level of SNAP 25 (c), Munc (d), Synapsin Ia (e), PSD-95 (f), GluN1 (g) and GluA1 (h) in the hippocampus of CA-AMPK or Ctrl mice. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 6 (Ctrl) and n = 8 (CA-AMPK). Student's t-test. \*\*p < 0.01, compared to Ctrl.

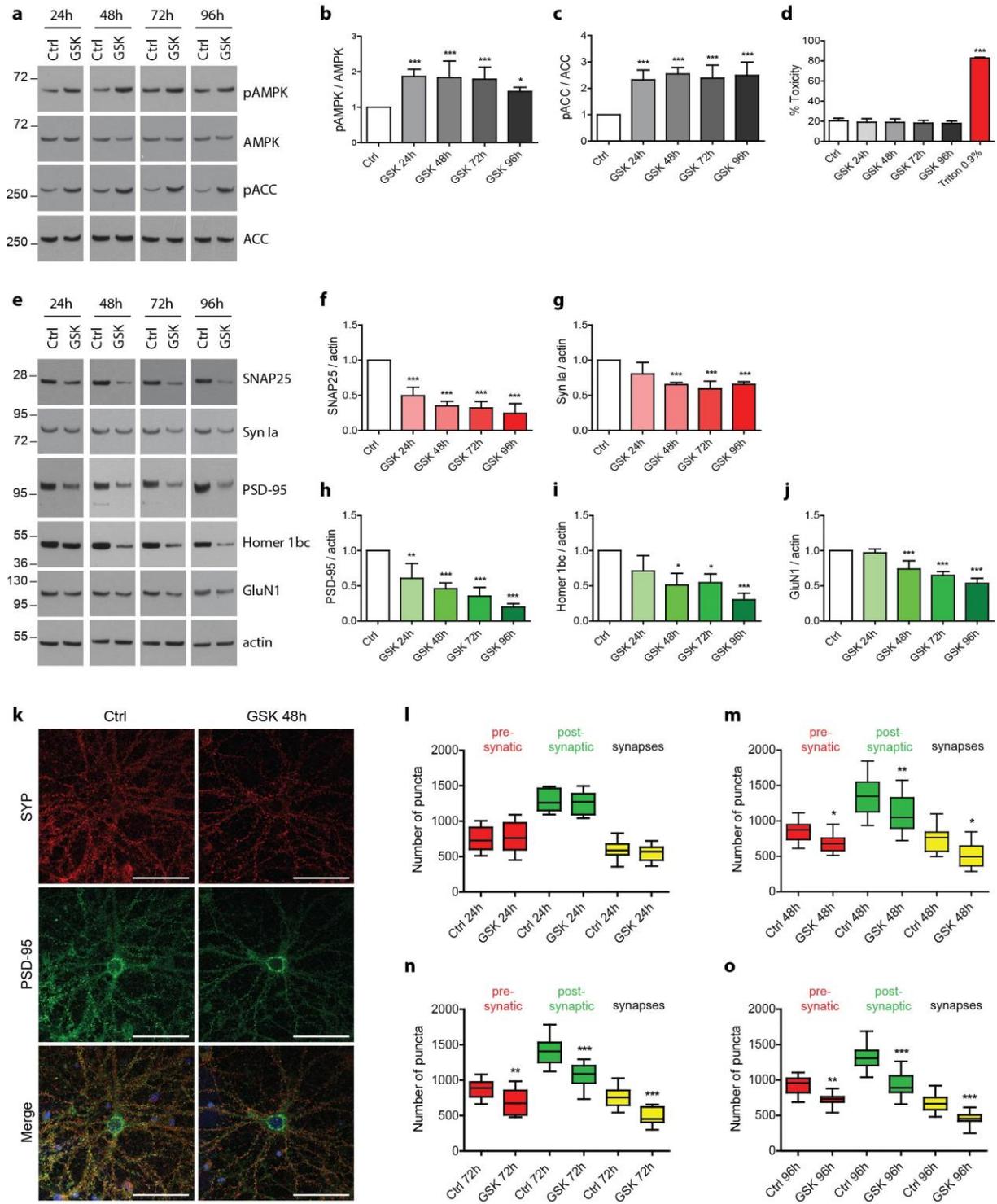
# Figure suppl 1



**Additional figure 1: AMPK deregulation-induced loss of synaptic markers was not mediated by cell stress.** (a-c) Lysates from differentiated primary neurons treated with AICAR (1 mM) at DIV 20 for the indicated times were subjected to a cell stress array. (d) Schematic representing the localization of stress proteins on the membrane-based antibody array. (e) Quantification of the cell stress array represented as a heat map, results are expressed as percentage of the Ctrl.

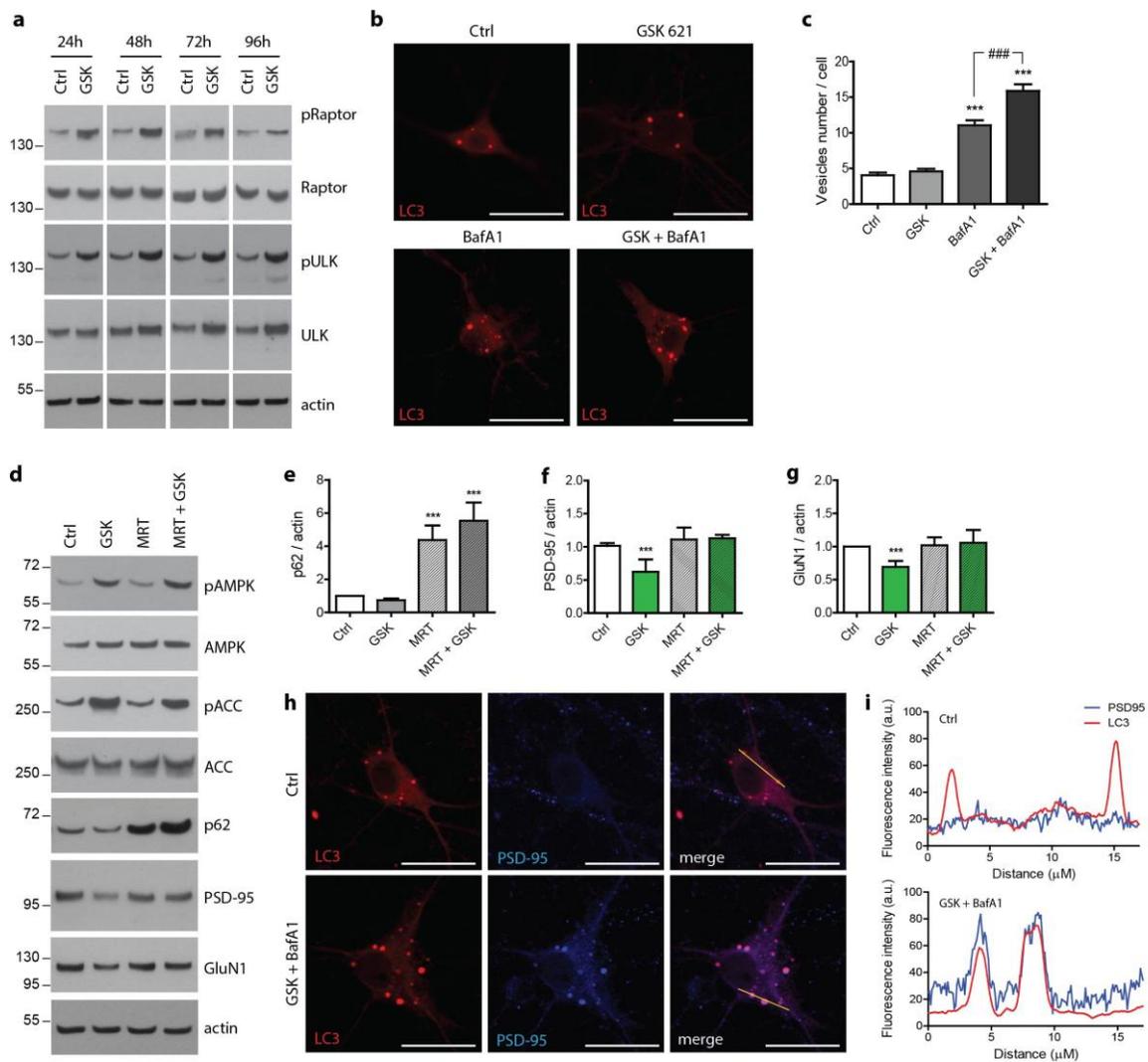


## Figure suppl 2



**Additional figure 2: Impact of AMPK deregulation on synaptic integrity using the direct AMPK activator GSK621.** Primary neurons were treated at 20 DIV for the indicated times with the direct AMPK activator, GSK621 (GSK, 10  $\mu$ M). **(a)** Cells lysates were analyzed by WB with antibodies directed against phospho-Thr<sup>172</sup>AMPK (pAMPK), AMPK, phospho-Ser<sup>79</sup>ACC (pACC), ACC and actin. **(b-d)** Quantification of the ratios pAMPK/AMPK **(b)** and pACC/ACC **(c)**. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 5. **(d)** Cytotoxicity was assessed using the lactate dehydrogenase (LDH) assay after 24h, 48h, 72h and 96h of treatment with GSK in conditioned media. Treatment with 0.9% Triton X-100 was used as a positive control. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 5. **(e-j)** Analysis of synaptic markers upon AMPK deregulation with GSK621 treatment. WB analysis **(e)** and quantification of the expression of the pre-synaptic markers SNAP25 **(f)** and synapsin Ia **(g)** and the post-synaptic markers PSD-95 **(h)**, Homer 1bc **(i)** and GluN1 **(j)**. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 6 **(k)** Immunofluorescence performed with antibodies directed against the pre-synaptic marker synaptophysin (SYP, red) and the post-synaptic marker PSD-95 (green) in neurons treated or not with GSK621 for 48h. **(l-o)** Quantification of pre-synaptic (red), post-synaptic (green) and synaptic (yellow) puncta upon GSK621 treatment for 24h **(l)**, 48h **(m)**, 72h **(n)** and 96h **(o)**. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 31 neurons counted from 3 independent experiments. Scale bar = 50  $\mu$ m. One way ANOVA with Bonferroni's post hoc test was performed for all experiments. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

### Figure suppl 3

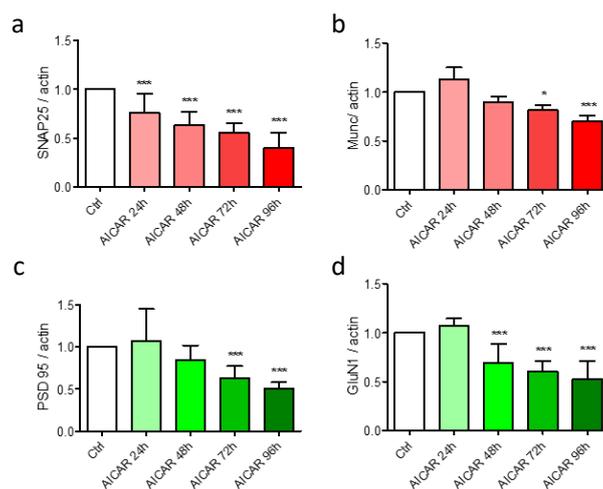


**Additional figure 3: Involvement of autophagy on synaptic loss induced by GSK621.** Neurons were treated at 20 DIV for the indicated times with GSK621 (GSK, 10  $\mu$ M). **(a)** Cell lysates were analyzed by WB for phospho-Ser<sup>792</sup>Raptor (pRaptor), Raptor, phospho-Ser<sup>555</sup>ULK (pULK), ULK1, and actin. Results are representative of 3 independent experiments. **(b)** Visualization of mKate2-LC3 in neurons treated with GSK621 (GSK, 10  $\mu$ M, 48h), BafilomycinA1 (BafA1, 100 nM, 24h) or both. **(c)** Quantification of mKate2-LC-3 positive vesicles number by cell. Results represent mean  $\pm$  SEM, n = 30 neurons counted from 3 independent experiments. Scale bar = 25  $\mu$ m. **(d-g)** Primary neurons at 20 DIV were pre-treated with the autophagy inhibitor MRT68921 (MRT, 2,5  $\mu$ M) for 20 min prior to GSK621 treatment (GSK, 10  $\mu$ M, 48h). WB analysis **(d)** and quantification of p62 **(e)**, PSD-95 **(f)** and GluN1 **(g)**. Results represent mean  $\pm$  SD, n = 4. **(h)** PSD-95 immunostaining (blue) in neurons expressing mKate2-LC3 (red) and co-treated with GSK (10  $\mu$ M, 48h) and BafilomycinA1 (BafA1, 100 nM, 24h). **(i)** Fluorescence profile corresponding to the yellow lines in **(h)** and showing the co-distribution of LC3 and PSD-95 in neurons co-treated with GSK621 and Bafilomycin A1. Scale bar = 25  $\mu$ m. a.u. = arbitrary units. One way ANOVA with Bonferroni's post hoc test was performed for all experiments. \*\*\*p < 0.001 compared to the Ctrl, ###p < 0.001 compared to BafA1 condition.

### 3. Résultats complémentaires

Au cours de cette étude, nous avons démontré que l'induction d'une dérégulation de l'AMPK en culture primaire de neurones est suffisante pour provoquer une perte synaptique ainsi que des altérations du réseau neuronal. Ces résultats sont en accord avec une étude montrant que l'AMPK induit les effets synaptotoxiques provoqués par le peptide A $\beta$  (Mairet-Coello *et al.*, 2013). En effet, dans ces travaux, les auteurs montrent qu'une suractivation de l'AMPK est suffisante pour induire une perte des épines dendritiques en culture primaire de neurones hippocampiques et *in vivo* dans un modèle murin transgénique pour la pathologie amyloïde (APP<sup>SWE,IND</sup>). Par ailleurs, ils suggèrent également que l'induction de ces effets synaptotoxiques nécessite la phosphorylation de la protéine tau en sérine 262 par l'AMPK. Dans ce contexte, il a aussi été mis en évidence que dans des cultures primaires de neurones, l'hyperphosphorylation de la protéine tau induit un changement de sa localisation dendritique provoquant ainsi une altération du recyclage des récepteurs AMPA et par conséquent des altérations synaptiques (Hoover *et al.*, 2010).

Au vu des données de la littérature, et étant donné que nous avons précédemment montré que l'AMPK régule la phosphorylation de tau ainsi que la pathologie tau *in vivo*, nous nous sommes demandés si la perte synaptique engendrée par la dérégulation de l'AMPK pouvait être due à un mécanisme impliquant la protéine tau. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons induit pharmacologiquement une dérégulation de l'AMPK (comme effectuée précédemment) dans un modèle de culture primaire de neurones KO pour la protéine tau. Nous avons ensuite réalisée une analyse par Western Blot de l'expression des protéines pré-synaptiques SNAP25 et Munc et de la protéine post-synaptique PSD-95 et la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA. Il a ainsi été constaté que malgré l'absence de la protéine tau, l'induction de la dérégulation de l'AMPK provoque tout de même une diminution significative de l'expression de l'ensemble de ces protéines pré- et post-synaptiques. De même, on constate que les valeurs obtenues sont similaires à celles obtenues dans les cultures primaires de neurones WT. Ces résultats laissent suggérer que la protéine tau ne semble pas ou peu impliquée dans la perte des synapses induite par la dérégulation de l'AMPK (*Figure 30*).



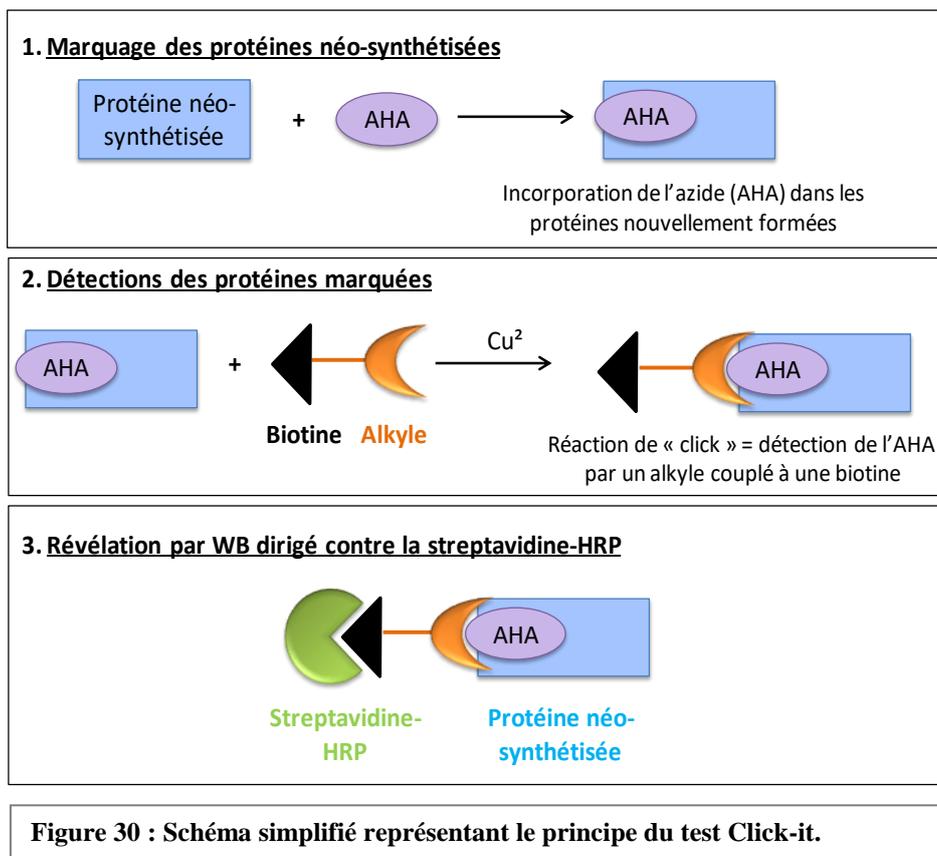
**Figure 29 : Etude de l'implication de la protéine tau dans la perte de l'intégrité synaptique induite par la dérégulation de l'AMPK.** La dérégulation de l'AMPK a été induite dans des cultures primaires de neurones issus de souris KO pour la protéine tau à l'aide de l'activateur de l'AMPK, AICAR (1mM). Quantifications de l'expression des protéines pré-synaptiques SNAP25 (a) et Munc (b) et post-synaptiques PSD95 (c) et GluN1 (d) exprimées en ratio sur l'actine. Les résultats représentent la moyenne des valeurs obtenues  $\pm$  SD, n=3. One way ANOVA avec test de Bonferroni, \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001 comparé au Ctrl.

## 4. Discussion

La réalisation de notre deuxième objectif a permis de mettre en évidence qu'une dérégulation de l'AMPK induite dans un modèle de culture primaire neuronale provoque une perte de l'expression de protéines pré- et post-synaptiques qui est associée à une réduction de la densité et de la fonctionnalité des synapses. Nous avons également démontré que la perte d'expression des protéines post-synaptiques analysées dans cette étude, fait intervenir une voie de signalisation impliquant l'autophagie dépendante d'ULK. De plus, l'injection d'une forme constitutivement active de l'AMPK dans l'hippocampe de souris WT a permis de confirmer *in vivo* l'effet de la dérégulation de l'AMPK sur la perte des protéines synaptiques. De façon surprenante, nos résultats montrent que la perte des protéines pré-synaptiques SNAP25, Munc et Synapsin Ia ne semble pas faire intervenir la voie de l'autophagie dépendante de ULK. En effet, l'inhibition de l'initiation de l'autophagie via un inhibiteur spécifique d'ULK n'est pas suffisante pour empêcher la perte d'expression de ces protéines pré-synaptiques induite par la dérégulation de l'AMPK. D'autres expérimentations nécessitent de ce fait d'être réalisées afin d'élucider le mécanisme par lequel se produit l'élimination de ces protéines dans notre modèle.

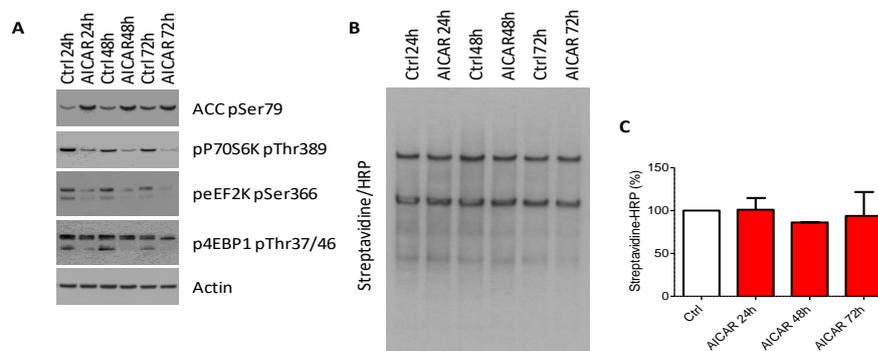
Il est aujourd'hui bien établi que la plasticité synaptique et les mécanismes de LTP reposent sur la synthèse de protéines – dont le principal régulateur est le complexe mTORC1 – et notamment sur l'expression des IEG (Immediate Early Gene) tels que Arc, c-Fos et EgrI (Miyashita *et al.*, 2008).

L'AMPK est connue pour inhiber la voie de signalisation mTORC1 via 1) l'induction de la phosphorylation inhibitrice de la kinase eEF2K qui ne peut donc plus activer le facteur d'élongation eEF2, 2) la phosphorylation de la protéine Raptor qui appartient au complexe mTORC1, 3) l'activation de TSC2 qui inhibe ensuite mTORC1 (Carling, 2004b). Etant donné que nous avons mis en évidence que la dérégulation de l'AMPK provoque une perte d'expression des marqueurs synaptiques, nous avons également émis l'hypothèse (en plus de celle impliquant tau) que cette perte pouvait être due à une réduction de leur synthèse protéique. Après avoir vérifié que l'AMPK provoquait bien une inhibition de cette voie de signalisation, nous avons analysé la synthèse protéique à l'aide d'un test Click-it, après avoir induit pharmacologiquement la dérégulation de l'AMPK en culture neuronale.



Brièvement, après avoir traité les neurones, les protéines néo-synthétisées ont été marquées avec de la L-azidohomoalanine (AHA). La détection de l'AHA a été réalisée avec un alkyne biotinylé au cours de la réaction nommée "Click-it". A l'issue de cette réaction, les échantillons obtenus ont ensuite été analysés par Western blot et un marquage dirigé contre la streptavidine-HRP a été effectué (Figure 31). Cependant, aucune diminution du marquage streptavidine n'a été observée suite à l'activation chronique de l'AMPK (Figure 32). Etant donné que ce test permet d'analyser la synthèse globale des protéines et non uniquement celles localisées aux niveaux des synapses, il reste possible qu'il y ait une diminution de la synthèse des protéines synaptiques mais que celle-ci soit masquée par

la synthèse des autres protéines produites dans les cellules. Il serait donc intéressant d'effectuer d'autres investigations plus poussées afin de vérifier cette hypothèse. En effet, un marquage à l'AHA pourrait par exemple être réalisé avant de réaliser une purification avec la streptavidine dans le but de retenir l'ensemble des protéines nouvellement synthétisées qui auront donc été marquées à l'AHA et "clickées" avec l'alkyle biotinylé. Puis à partir des échantillons générés, une analyse de l'expression des marqueurs pré- et post-synaptiques pourrait être effectuée afin de déterminer si une réduction de la synthèse des protéines synaptiques pourrait expliquer la perte des synapses induite par la dérégulation de l'AMPK. De plus, la technique du Click-it pourrait également être couplée à celle du Proximity Ligation Assay (PLA) qui permet, au sein des cellules, de détecter par fluorescence des interactions protéiques mais également des modifications présentes sur ces protéines. En effet, en adaptant cette technique et en utilisant notamment des anticorps dirigés contre les protéines synaptiques, le PLA pourrait nous permettre d'analyser la synthèse de ces protéines dans des conditions contrôle et de dérégulation de l'AMPK et par conséquent, de vérifier si cette synthèse est réduite lorsque l'AMPK est dérégulée. De plus, l'utilisation de cette technique pourrait aussi nous permettre de déterminer la localisation neuronale des protéines synaptiques néosynthétisées. Enfin, une analyse des niveaux d'ARNm codant pour les protéines pré- et post-synaptiques pourrait également être envisagée dans le but de confirmer ces résultats et notamment de déterminer si la dérégulation de l'AMPK a un impact sur la transcription des ARNm de ces protéines. Ces expérimentations pourraient peut-être ainsi expliquer le mécanisme à l'origine de la baisse d'expression des protéines pré-synaptiques observée dans notre modèle.



**Figure 31 : Etude de l'implication de la synthèse protéique dans la perte des synapses médiée par la dérégulation de l'AMPK.** La dérégulation de l'AMPK a été induite dans des cultures primaires de neurones à l'aide de l'activateur de l'AMPK, AICAR (1mM). **(A)** Western blot représentant l'analyse de l'expression des protéines impliquées dans la synthèse protéique et situées en aval de l'AMPK telles que la kinase phospho-T389-P70S6K responsable de la phosphorylation de pS6, la kinase eEF2K phosphorylée en Ser366 et la protéine 4EBP1 phosphorylée en Thr37 par mTOR. **(B-C)** Après avoir marqué les protéines néo-synthétisées (via le test Click-it) dans les neurones traités avec AICAR, une analyse par Western blot **(B)** et une quantification **(C)** du marquage à la streptavidine-HRP a été réalisée dans le but de détecter les protéines nouvellement synthétisées. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle et représentent la moyenne des valeurs obtenues  $\pm$  SD, n = 2.

Il est connu depuis de nombreuses années que le réseau d'actine joue un rôle important dans la voie de l'autophagie, et notamment dans le trafic et la biogenèse des autophagosomes. En effet, des études réalisées en 1992 ont permis de mettre en évidence que le fait de traiter des cellules en condition de privation énergétique (condition connue pour induire l'autophagie via l'activation de l'AMPK) avec des agents dépolymérisant de l'actine tel que la cytochalasine D, empêche la formation des autophagosomes (Aplin *et al.*, 1992). Par ailleurs, il a été démontré que l'inhibition du complexe Arp2/3 – complexe impliqué dans la nucléation des ramifications des filaments d'actine (Rotty, Wu and Bear, 2013) – induit une diminution du nombre d'autophagosomes et des niveaux d'expression de LC3 II (Kast and Dominguez, 2015). Il est intéressant de noter qu'au cours des stades précoces de la MA, des altérations de la signalisation AMPA sont observées et semblent être corrélées à des changements d'intégrité du cytosquelette d'actine. Ces changements ont été montrés pour modifier le nombre et la structure des épines dendritiques et, par conséquent, induire des altérations synaptiques (Baglietto-Vargas *et al.*, 2018). Il a en effet été établi que le trafic des récepteurs AMPA et leur ancrage au niveau des densités post-synaptiques joue un rôle clé dans les mécanismes de LTP et sont dépendants de la dynamique du cytosquelette d'actine (Okamoto *et al.*, 2004 ; Anggono and Huganir, 2012) laissant ainsi suggérer que des altérations de cette dynamique pourraient avoir un impact sur les fonctions synaptiques. Des études montrent que l'AMPK pourrait justement réguler les étapes de polymérisation et dépolymérisation des filaments d'actine et par conséquent, l'organisation du cytosquelette. En effet, Cook *et al.*, 2014 montrent que dans le modèle de drosophile transgénique *Loechnig* possédant une mutation de la sous-unité  $\gamma$  de l'AMPK, on observe des déficits comportementaux associés à des altérations de polymérisation d'actine. Ces travaux démontrent aussi que la mutation de la sous-unité  $\gamma$  induit une stimulation de la voie de signalisation Rho/LIMK (voie induisant l'activation de la cofiline) provoquant ainsi une augmentation de la phosphorylation de la cofiline en sérine 3, et par conséquent, une accumulation d'actine-F (fibrillaire) polymérisée (Cook, Bolkan and Kretschmar, 2014). D'autres études effectuées à partir de cellules épithéliales montrent également que la voie de signalisation LKB1/AMPK pourrait impacter la dynamique d'actine et par conséquent la réorganisation du cytosquelette, notamment via la phosphorylation de VASP, une protéine régulant la polymérisation de l'actine et impliquée dans les mécanismes de migration et d'adhésion cellulaire (Miranda *et al.* 2010 ; Thomson *et al.* 2011). Ces données de la littérature laissent donc suggérer que l'AMPK pourrait être impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine. Or, étant donné que ce dernier joue un rôle important dans le maintien de la structure des synapses et que nous avons démontré que la dérégulation de l'AMPK provoque une perte de l'intégrité des synapses, nous avons réalisé une expérience préliminaire dans le but de déterminer si cette perte synaptique pouvait impliquer en plus de l'autophagie, une dérégulation de ce réseau d'actine. Pour cela, nous avons analysé l'état de phosphorylation de la protéine cofiline en sérine 3 – protéine impliquée dans la dépolymérisation des filaments d'actine lorsqu'elle est phosphorylée – après avoir induit la dérégulation de l'AMPK dans nos cultures primaires. Les résultats de cette étude préliminaire montrent



que la dérégulation de l'AMPK induit une baisse du niveau de phosphorylation de la cofiline en sérine 3 laissant ainsi suggérer que la dérégulation de l'AMPK pourrait également induire une désorganisation du cytosquelette d'actine (données non montrées). Au vu de ces quelques résultats et des données de la littérature présentées ci-dessus, il serait très intéressant de réaliser d'autres investigations dans cet axe de recherche afin d'étudier l'impact que pourrait avoir cette éventuelle altération de la dynamique d'actine sur le trafic des récepteurs au glutamate, la morphologie des épines dendritiques et par conséquent la plasticité synaptique.

## Chapitre 3 : Conséquences d'une dérégulation de l'AMPK sur le métabolisme énergétique neuronal

### 1. Introduction

Nous avons vu lors de l'étude précédente que la dérégulation de l'AMPK provoque une réduction du nombre des synapses ainsi qu'une perte de leur fonctionnalité. Comme décrit précédemment, les synapses nécessitent un apport énergétique conséquent afin de maintenir leurs fonctions. La régulation du métabolisme énergétique neuronal nécessite de ce fait d'être finement régulée dans le but d'assurer la demande énergétique des neurones et, plus particulièrement, celle des synapses. Comme nous l'avons décrit précédemment, des études montrent que l'AMPK est dérégulée dans le cerveau de patients atteint de la MA (Vingtdeux *et al.*, 2011), maladie au cours de laquelle des altérations du métabolisme énergétique sont également observées dès les stades précoces (Jack *et al.*, 2013 ; Atamna and Frey, 2007). En effet, un hypométabolisme glucidique a pu être mis en évidence dans le cerveau des patients atteints de la MA (Mosconi, Pupi and De Leon, 2008 ; Laura K. Teune *et al.*, 2010).. De même, de nombreuses études montrent que la dynamique mitochondriale ainsi que la morphologie des mitochondries sont altérées lors de la MA (Hirai *et al.*, 2001 ; Macdonald *et al.*, 2018 ; Wang et al. 2009). Au vu de l'ensemble de ces données, la dernière partie de cette thèse a donc eu pour finalité d'étudier l'impact de la dérégulation de l'AMPK sur le métabolisme énergétique des neurones. Pour cela, nous avons à nouveau induit une dérégulation de l'AMPK dans les mêmes conditions que lors de l'étude précédente et ce, dans le but d'analyser l'effet de cette dérégulation sur l'expression des protéines mitochondriales, leur morphologie et leur fonctionnalité.

## 2. Résultats

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article ci-dessous qui est en cours de préparation.

### **AMPK deregulation causes neuronal hypometabolism and mitochondrial fission: relevance for Alzheimer's disease**

Claudia Marinangeli, Florent Sauvé, Manon Domise, Sébastien Didier, Anne Loyens, Philippe Marchetti, Luc Buée, Jérôme Kluza, Valérie Vingtdeux

**Abstract**

In the human brain, reduction in glucose metabolism, or hypometabolism, is a common feature of many neuropathologies, including Alzheimer's disease. Observations from our laboratory revealed that a dysregulation of the AMP-activated protein kinase (AMPK), a key regulator of intracellular energy homeostasis, occurs in degenerating neurons in the brain of Alzheimer's patients. The present study aimed to assess the impact of AMPK deregulation in controlling neuronal energy homeostasis. To answer that question, we chronically activated AMPK in primary neurons and determined the consequences on energy metabolism. Seahorse XFe respirometry assay results showed that prolonged AMPK activation caused a reduction in neuronal glucose metabolism, a picture reminiscent of the hypometabolism seen in AD patient's brain. Via further experimental analysis we showed that this decrease was not related to a toxic effect of the treatment, nor to a reduction in mitochondrial mass in the treated neurons. Rather, AMPK led to an increase fission of the mitochondrial network. This work suggests that controlled AMPK activity is fundamental to maintain the metabolic state of neurons, and that AMPK could play a key role in the processes occurring in the early phase of AD.

**Keywords**

AMPK, Alzheimer's disease, mitochondrial respiration, mitochondria, fission, dynamics, energy metabolism, neuron, Seahorse

## Introduction

Despite the first two independent observations in 1973 (Beg et al., 1973; Carlson and Kim, 1973), it required 16 years to understand that AMP-activated protein kinase (AMPK) is one key intracellular metabolic sensor and regulator. AMPK is an heterotrimeric complex composed of one catalytic subunit  $\alpha$ , and two regulatory subunits  $\beta$  and  $\gamma$ . The latter, in particular, contains adenine nucleoside binding sites, that allow the kinase to sense intracellular levels of AMP, ADP and ATP (Hardie et al., 1999; Scott et al., 2004). Consequently, any change in the ratio AMP:ATP, triggers AMPK activation by enabling its phosphorylation on the catalytic  $\alpha$  subunit. Once activated, AMPK restores intracellular energy levels by activating catabolic pathways or by repressing anabolic processes (Kahn et al., 2005; Viollet et al., 2009).

The brain is one of the most energy requiring organ in our body. While it accounts for only 2% of our body weight it consumes up to 20% of the oxygen and 25% of the glucose supplied by the body. In the brain, most of the energy is used by neurons and more particularly synapses (Attwell and Laughlin, 2001; Harris et al., 2012). Interestingly, AMPK is highly expressed in the brain, and particularly in neurons (Culmsee et al., 2001; Turnley et al., 1999). Neuronal AMPK was reported to regulate glucose uptake and metabolism by promoting the expression and translocation of the glucose transporters GLUT 3 and GLUT 4 cell surface expression (Ashrafi et al., 2017; Weisova et al., 2009) as well as via the direct and indirect phosphorylation of glycolytic enzymes (Marsin et al., 2000). In addition, AMPK was also described to regulate biogenesis, dynamics and function of neuronal mitochondria. Indeed, AMPK was reported to increase the transcription of Mitofusin 2 (Mfn2), and to regulate mitophagy and mitochondrial fission via the direct phosphorylation of the mitochondrial fission factor (MFF) (Ducommun et al., 2015; Toyama et al., 2016). Additionally, AMPK was proposed to play a role in mitochondrial biogenesis via the regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) and mitochondrial transcription factor A expression (Tfam) (Dasgupta and Milbrandt, 2007; Onyango et al., 2010). Finally, we recently reported that AMPK played a crucial role in the regulation of energy levels during synaptic activation by upregulating glycolysis and mitochondrial respiration (Marinangeli et al., 2018).

Beside, AMPK has been showed to be involved in the pathogenesis of several neurodegenerative disorders including Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's (Marinangeli et al., 2016). All these neurodegenerative disorders are preceded by brain hypometabolism decades prior to the onset of clinical symptoms. In the brain of Alzheimer's disease (AD) patients, reduction of glucose metabolism starts to occur in the medial temporal lobe, and expand, in later stages, to the frontal association cortex (Mosconi, 2013; Mosconi et al., 2009). In addition, The link between alteration of neuronal metabolism and neurodegeneration has been corroborated by several evidences, including post-mortem studies which revealed morphological and morphometric changes of mitochondria in neurons in several brain regions in the brain of AD patients (Baloyannis, 2006). Further studies showed that

mitochondria dynamics, notably fission and fusion, and functions are strongly affected in this disease (Manczak et al., 2011; Wang et al., 2008a). Finally, A $\beta$  and Tau, the two building blocks of the histopathological lesions observed in AD brains, were also reported to affect mitochondria axonal transport, dynamics and function (Cheng and Bai, 2018; Cho et al., 2009; Manczak and Reddy, 2012; Wang et al., 2008b). While these energy defects, detected by FDG-PET, are used as early diagnosis tool for AD (Caminiti et al., 2018; Jack et al., 2010; Mosconi et al., 2013), the causes of this hypometabolism and in particular the molecular mechanisms that might be involved remain poorly understood.

In this study we addressed the potential role of AMPK deregulation on neuronal energy metabolism, hereafter referred to as neurometabolism. Our data demonstrated that AMPK deregulation induced in differentiated primary neurons led to a reduction of glucose metabolism, and in particular of mitochondrial respiration that was not due to a reduction of mitochondrial mass but rather to an increase of mitochondrial fission. Finally, we propose that AMPK deregulation might provide neuroprotection.

## **Results**

### ***AMPK deregulation alters mitochondrial respiration***

To determine the consequences of AMPK deregulation on neuronal metabolism, differentiated primary neurons were treated with the AMPK activators 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR), which acts as an AMP mimetic, and GSK 621 (GSK), a direct AMPK activator (Chen et al., 2016; Sujobert et al., 2015). Previous study in our laboratory (Domise et al., submitted) showed that primary neuronal culture reach optimal synaptic network and activity between 20 and 27 *days in vitro* (DIV). For that reason, we decided to evaluate the impact of AMPK deregulation on primary neuronal culture between that range of DIV, starting the treatments at 21 DIV. Mitochondrial functions were assessed using the Seahorse XFe flux analyzer according to previously established protocols (Marinangeli et al., 2018). Results showed that mitochondrial basal respiration was significantly reduced following AMPK deregulation starting at 48 h of treatment. Additionally, mitochondrial maximal respiration (determined after FCCP treatment), mitochondrial spare respiratory capacity and hence ATP production were significantly reduced following AMPK activation (Fig. 1). Altogether, these results suggested that AMPK deregulation led to a decrease of the general metabolic state of neuronal cells as shown in the phenogram analysis (Fig. 1). Of note, neuronal glycolysis metabolism was also assessed after 48 h and 72 h of treatment using the Seahorse XFe flux analyzer. Starting at 48 h, decreased basal glycolysis as well as maximal glycolysis and glycolytic capacity were observed (Fig. S1). Altogether, these results showed that AMPK deregulation lead to neuronal hypometabolism.

### **AMPK deregulation does not impact mitochondrial mass**

To determine whether the decreased mitochondrial respiration observed was due to a reduction of mitochondrial mass, we next monitored the expression of several mitochondrial proteins by western-blotting. Results showed that the expression of the mitochondrial proteins, Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A (SDHA) Heat shock protein 60 (HSP60) and pyruvate dehydrogenase (PDH) were not changed following AMPK deregulation (Fig. 2 a-d).

Further, mitochondrial DNA (mtDNA) copy number was used as an additional indicator of mitochondrial mass. To this end, real-time PCR using mtDNA directed primers for ND1 and 16S rRNA and for the nuclear-encoded gene hexokinase 2 (HK2) was performed as previously described (Quiros et al., 2017). Analysis of mtDNA/nuclearDNA ratio was calculated and showed that AICAR or GSK treatments did not induce any change in mitochondrial DNA copy number at any time point studied (Fig. 2e-j).

Altogether, these results suggested that the decreased mitochondrial respiration was not due to a decrease in mitochondrial mass but rather to a reduction of mitochondrial respiration *per se*.

### ***AMPK deregulation leads to mitochondrial fission***

Finally, AMPK deregulation was recently reported to promote mitochondrial fission via acting on MFF (Toyama et al., 2016). Several studies showed a close connection between mitochondrial fission and fusion with bioenergetics. For instance, increased fusion leads to the formation of elongated mitochondria, which allows cell to respond to increased energy demand during energetic stress (Tondera et al., 2009), while aberrant fission is associated with a reduction in mitochondrial respiration (Alam et al., 2018). To determine whether mitochondrial dynamics were impacted in our model, we assessed mitochondrial morphology in DsRed (DsRed) transfected neurons (Fig. 3a). Mitochondrial network morphologic changes were then analyzed and quantified using the ImageJ plugin mitophagy ver 1\_44. Results showed that AMPK deregulation led to a fragmentation of the mitochondrial network in mouse primary neurons starting after 24 h of treatment. In particular, AMPK deregulation led to a significant decrease of mitochondria perimeter and size, as well as to an increase circularity, suggesting that AMPK deregulation promoted mitochondrial fission (Fig. 3b).

Further, we performed electron microscopy in neurons treated with AICAR up to 72 h. Individual mitochondria both in the pre-synaptic and post-synaptic/dendritic compartments were traced and minimum diameter within the traced areas were measured using ImageJ. Our results demonstrated that AICAR treatment led to a decrease of mitochondria size perimeter and area in both compartments as compared to the control condition (Fig. 4). Altogether, those results further supported that AMPK deregulation led to a fragmentation of the mitochondrial network by inducing mitochondrial fission (Fig. 3 and 4).

## Discussion

AMPK is deregulated in neurons in the brain of AD patients (Vingtdeux et al., 2011) as well as in other neurodegenerative disorders (Marinangeli et al., 2016). In general AMPK deregulation serves either to increase energy production as it could be the case in physiological conditions, (i.e. following synaptic activation or when extracellular energy is available. However, in pathological conditions, where environment is not favorable, it could be speculated that AMPK deregulation would rather repress energy consuming pathways. Given that synapses are the main energy consuming components in the brain, it would be reasonable to hypothesize that long lasting AMPK activation, would induce a reduction in energy consuming processes, such as synapses number or functionality. Interestingly, we previously demonstrated that AMPK deregulation led to a decrease of synaptic markers, synapses number and hence of neuronal networks functionality (Domise et al., submitted). Here, in addition, we provided evidence that this reduction of neuronal networks functionality is accompanied by a reduction of energy production in part via mitochondrial fission.

Excessive mitochondrial fission is associated with Alzheimer's disease pathology (Zhu et al., 2013). Drp1 GTPase activity was also found to be significantly elevated in postmortem AD brains as well as in cortical tissues of transgenic models of AD (APP, APP/PS1 and 3xTg AD mice) (Manczak and Reddy, 2012). Additionally, Drp1 was found to directly interact with hyperphosphorylated tau (Manczak and Reddy, 2012), and A $\beta$  (Manczak et al., 2011) leading to mitochondrial fragmentation. Tau expression inhibits mitochondrial Drp1 localization and leads to mitochondria elongation (DuBoff et al., 2012). Given these data, it has been proposed that acting on mitochondrial dynamics could represent a potential therapeutic target in the context of AD. Indeed, recent reports demonstrated that Drp1 inhibition has beneficial effect in APP/PS1 transgenic mouse model. Drp1 inhibition prevents mitochondrial fragmentation, A $\beta$  deposition and memory deficits in transgenic mouse models of AD (Baek et al., 2017). Genetic ablation of Drp1 (mice +/-) in APP transgenic mice (Tg2576) leads to reduction of mitochondrial dysfunction, synaptic toxicity and reduction of soluble A $\beta$  levels (Manczak et al., 2016). In addition, treatment of CRND8 mice with the Drp1 inhibitor, Mdivi-1, rescues mitochondrial fragmentation, mitochondrial function and decreases amyloid deposits and cognitive defects (Wang et al., 2017). Interestingly, in this model, mitochondrial fragmentation occurs as early as 3 months of age, before the accumulation of A $\beta$  pathology. Finally, Drp1 $^{+/-}$  mice crossed with tau transgenic mice (P301L) display reduced mitochondrial dysfunction and phosphorylated tau, while they display enhanced mitochondrial biogenesis and synaptic activity as compared to Tau mice (Kandimalla et al., 2016). Together, Tau/A $\beta$  and AMPK aberrant activation could lead to excessive mitochondria fragmentation and hence metabolic defects in neurons through Drp1 and MFF, respectively. Therefore, inhibiting this pathway, either by inhibiting Drp1 activity or MFF might bear potential therapeutic value in AD.



## **Conclusion**

Altogether, our data point out that AMPK might play a key role in the neurodegenerative process, and further strengthen the notion that Alzheimer's disease should be considered as a disorder of brain metabolism.

In conclusion, by decreasing neuronal energy requirement, AMPK might protect neurons from subsequent energy crises and hence neuronal death.

## **Materials and Methods**

### *Chemicals and reagents / antibodies*

AICAR and GSK 621 were purchased from Tocris, Oligomycin, Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), Antimycin A, and Rotenone were purchased from Sigma, 2-deoxy-D-glucose (2DG) from Acros. Antibodies directed against pyruvate dehydrogenase (PDH), VDAC (D73D12) antibodies were purchased from Cell Signaling technology. Actin antibody was from BD Transduction Laboratory.

### *Primary neuronal culture*

All animal experiments were performed according to procedures approved by the local Animal Ethical Committee following European standards for the care and use of laboratory animals (agreement APAFIS#4689-2016032315498524 v5 from CEEA75, Lille, France). Primary neurons were prepared as previously described (Domise et al., 2016). Briefly, foetuses at stage E18.5 were obtained from pregnant C57BL/6J wild-type female mice (The Jackson Laboratory). Forebrains were dissected in ice-cold dissection medium composed of Hanks' balanced salt solution (HBSS) (Invitrogen) supplemented with 0.5 % w/v D-glucose (Sigma) and 25 mM Hepes (Invitrogen). Neurons were dissociated and isolated in ice-cold dissection medium containing 0.01 % w/v papain (Sigma), 0.1 % w/v dispase (Sigma), and 0.01 % w/v DNaseI (Roche) and by incubation at 37 °C for 15 min. Cells were spun down at 220 x g for 5 min at 4 °C, resuspended in Neurobasal medium supplemented with 2% B27, 1 mM NaPyr, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM Glutamax (Invitrogen), and plated at a density of  $6 \times 10^6$  cells/plate. Fresh medium was added every 3 days (1:3 of starting volume). Cells were then treated and collected between 20-25 DIV.

### *Mito-DsRed transfections*

Neurons grown on poly-D-lysine and laminin-coated glass coverslips were at 3 DIV were transfected with mitoDs-red (DsRed)(Clontech) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as per manufacturer's instruction, in a 1:3 ratio (1µg of DNA and 3µl of Lipofectamine for well of a 12 well plate). Briefly

Lipofectamine 2000 was diluted in Opti-MEM medium (Invitrogen) pre-warmed at 37°C. The corresponding µg of DNA was diluted in pre-warmed Opti-MEM medium. After 5 min incubation at RT, diluted DNA was added to the diluted Lipofectamine 2000. The DNA-Lipofectamine 2000 mix was then incubated for 15 min at RT before being added to the cells in their conditioning medium. Expression of the mitochondrial probe was evaluated after 48 h. Cells were then treated and analyzed at indicated time. At the end of the treatment cells were rinsed with phosphate buffer solution (PBS), fixed in 4% PFA for 20 min and mounted. Images were acquired on a Zeiss Axio Imager Z2 microscope (Carl Zeiss, Germany) equipped with a Hamamatsu ORCA-Flash4.0 digital camera (Hamamatsu Photonics, Japan) and ApoTome.2 system (Carl Zeiss, Germany).

#### *Seahorse metabolic assay*

Primary neuronal culture at 20 DIV are treated for 48 h and 72 h with AICAR, a known activator of AMPK, to test the effects of prolonged activation of this kinase in neuronal metabolism. The extracellular acidification rate (ECAR in mpH/min), reflects the glycolytic activity of the cells. The oxygen consumption rate (OCR in pmoles/min) represents the mitochondrial respiration. ECAR and OCR values are analysed by Seahorse XFe respirometry assay (Agilent). For the glycolysis analysis, cells are incubated in a glucose free medium, followed by sequential treatment of glucose (10mM), oligomycin (1µM) and 2DG (150mM) (A) (Marinangeli et al., 2018). Maximal glycolytic capacity and glycolytic reserve, express the maximal glycolysis flux and the difference between maximal and basal glycolysis, respectively. For the mitochondrial stress test, cells are incubated in a glucose containing medium and sequentially treated with oligomycin (1µM), FCCP\NaPyruvate (0.5µM\10mM) and Rotenone with Antimycin A (Rot/AA). OCR results included basal respiration, ATP production, maximal respiration, spare respiratory capacity, the last expressed as the difference between maximal and basal respiration. The effects of AICAR treatment in the overall metabolic state of the cells are analysed by the phenogram (I), where OCR versus ECAR values at the basal state of the cells are plotted.

#### *Quantitative real-time RT-PCR*

Total RNA was isolated using the NucleoSpin® RNA (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG) kit according to the manufacturer's instructions. One microgram of total RNA was reverse-transcribed using the Applied Biosystems High-Capacity cDNA reverse transcription kit. Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis was performed on an Applied Biosystems Prism 7900 System with Power SYBR Green PCR Master Mix (Appliedbiosystems) using the following primers : TFAM-Fwd: TCCACAGAACAGCTACCCAA, TFAM-Rev1: CCACAGGGCTGCAATTTTCC; TFAM-Rev2: AGACGGTTGTTGATTAGGCGT; PGC1a-Fwd: GCAGTCGCAACATGCTCAAG, PGC1a-Rev: GGGAACCCTTGGGGTTCATTT; Drp1-Fwd:

ATGCCAGCAAGTCCACAGAA, Drp1-Rev: TGTTCTCGGGCAGACAGTTT; Fis1-Fwd: CAAAGAGGAACAGCGGGACT, Fis1-Rev: ACAGCCCTCGCACATACTTT; Opa1-Fwd: ACCTTGCCAGTTTAGCTCCC, Opa1-Rev: TTGGGACCTGCAGTGAAGAA; Mfn1-Fwd: GCAGACAGCACATGGAGAGA, Mfn1-Rev: GATCCGATTCCGAGCTTCCG; Mfn2-Fwd: TGCACCGCCATATAGAGGAAG, Mfn2-Rev: TCTGCAGTGAAGTGGCAATG; Nrf1-Fwd: AGAAACGGAAACGGCCTCAT, NRF1-Rev: CATCCAACGTGGCTCTGAGT; Nrf2-Fwd: ATGGAGCAAGTTTGGCAGGA, NRF2-Rev: GCTGGGAACAGCGGTAGTAT. The thermal cycler conditions were as follows: hold for 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of a two-step PCR consisting of a 95°C step for 15s followed by a 60°C step for 25s. Amplifications were carried out in triplicate and the relative expression of target genes was determined by the  $\Delta\Delta CT$  method using  $\beta$ -actin or GAPDH for normalization.

#### *mtDNA/nDNA quantification*

Quantitative PCR for the analysis of mtDNA/nDNA ratio was performed according to Quiros et al. 2017 (Quiros et al., 2017). Briefly, total genomic DNA was extracted from primary neurons treated as indicated using the DNA extraction kit. For measurement of mitochondrial DNA (mtDNA), the ratio of mtDNA to nuclear DNA (nDNA) was measured by RT-PCR using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Appliedbiosystems) as described above. The mtDNA number was evaluated by amplifying fragments of the mtDNA 16S rRNA and ND1, while the amount of nDNA was evaluated amplifying a fragment of the nuclear encoded gene Hexokinase 2 (HK2). Comparison of 16S rRNA and ND1 DNA expression relative to HK2 DNA expression using the  $\Delta\Delta CT$  method gives a measure of mtDNA copy number to nDNA number ratio.

#### *Western blotting (WB)*

For WB analysis, proteins were separated in 8-16% Tris-Glycine gradient gels and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were then blocked in 5% fat free milk in TBS containing 0.01% Tween-20, and incubated with specific antibodies overnight at 4°C. Proteins were then detected using HRP-conjugated secondary antibodies and ECL detection system (ThermoFisher Scientific).

#### *Electron microscopy*

Primary neurons at 21 DIV treated or not with AICAR were fixed by immersion in a solution of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PO<sub>4</sub>), pH 7.5, for 1 h at RT, and then washed/rinsed in 0.1 M phosphate buffer (PO<sub>4</sub>). Cell were then postfixed with 1% OsO<sub>4</sub> in phosphate buffer for 1 h at RT. After dehydration, cells were scraped and centrifuged to form a pellet, which was then embedded in Araldite. Pellets were cut in Ultrathin sections (85 nm thick) with an Ultracut EM UC7. Sections were collected on Parlodion-coated nickel grids and counterstained with uranyl acetate and lead citrate before observation on a Zeiss EM 900 electron microscope.

Several structural characteristics of mitochondria were analyzed using ImageJ. Each mitochondria in pre-synaptic and post-synaptic compartment/dendrites were individually traced, and area, perimeter and minimal Feret diameter were calculated according to the standard set scale for each image. Statistical comparisons were performed with GraphPad Prism.

#### *Statistical analysis*

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism (Prism 5.0d, GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

#### **Acknowledgements**

We thank the animal core facility (animal facilities of Université de Lille-Inserm) of “Plateformes en Biologie Santé de Lille” as well as C. Degraeve, M. Besegher-Dumoulin, J. Devassine, R. Dehaynin and D. Taillieu for animal care.

This work was supported by the French Fondation pour la coopération Scientifique – Plan Alzheimer 2008-2012 (Senior Innovative Grant 2013) to VV, by the Fondation Vaincre Alzheimer (n°FR-16071p to VV), and in part through the Labex DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary Approach to Alzheimer’s disease). MD holds a doctoral scholarship from Lille 2 University.

#### **Author contributions**

Author contributions: Conceptualization, C.M., J.K., V.V.; Formal Analysis, C.M., F.S., V.V.; Investigation, C.M., M.D., S.D., F.S., A.L.; Resources, P.M., L.B.; Writing – Original Draft, C.M., V.V.; Writing – Review & Editing, C.M., M.D., S.D., F.S., A.L., P.M., L.B., J.K., V.V.; Visualization, C.M., M.D., F.S.; Supervision, V.V.; Funding Acquisition, L.B. and V.V. All authors read and approved the final version.

#### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Alam, S., Abdullah, C.S., Aishwarya, R., Miriyala, S., Panchatcharam, M., Peretik, J.M., Orr, A.W., James, J., Robbins, J., and Bhuiyan, M.S. (2018). Aberrant Mitochondrial Fission Is Maladaptive in Desmin Mutation-Induced Cardiac Proteotoxicity. *Journal of the American Heart Association* 7.
- Ashrafi, G., Wu, Z., Farrell, R.J., and Ryan, T.A. (2017). GLUT4 Mobilization Supports Energetic Demands of Active Synapses. *Neuron* 93, 606-615 e603.
- Attwell, D., and Laughlin, S.B. (2001). An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21, 1133-1145.
- Baek, S.H., Park, S.J., Jeong, J.I., Kim, S.H., Han, J., Kyung, J.W., Baik, S.H., Choi, Y., Choi, B.Y., Park, J.S., *et al.* (2017). Inhibition of Drp1 Ameliorates Synaptic Depression, Abeta Deposition, and Cognitive Impairment in an Alzheimer's Disease Model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 37, 5099-5110.
- Baloyannis, S.J. (2006). Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 9, 119-126.
- Beg, Z.H., Allmann, D.W., and Gibson, D.M. (1973). Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochemical and biophysical research communications* 54, 1362-1369.
- Caminiti, S.P., Ballarini, T., Sala, A., Cerami, C., Presotto, L., Santangelo, R., Fallanca, F., Vanoli, E.G., Gianolli, L., Iannaccone, S., *et al.* (2018). FDG-PET and CSF biomarker accuracy in prediction of conversion to different dementias in a large multicentre MCI cohort. *NeuroImage Clinical* 18, 167-177.
- Carlson, C.A., and Kim, K.H. (1973). Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 248, 378-380.
- Chen, L., Chen, Q., Deng, G., Kuang, S., Lian, J., Wang, M., and Zhu, H. (2016). AMPK activation by GSK621 inhibits human melanoma cells in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 480, 515-521.
- Cheng, Y., and Bai, F. (2018). The Association of Tau With Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Frontiers in neuroscience* 12, 163.
- Cho, D.H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z., and Lipton, S.A. (2009). S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 324, 102-105.
- Culmsee, C., Monnig, J., Kemp, B.E., and Mattson, M.P. (2001). AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation. *Journal of molecular neuroscience : MN* 17, 45-58.
- Dasgupta, B., and Milbrandt, J. (2007). Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 7217-7222.
- Domise, M., Didier, S., Marinangeli, C., Zhao, H., Chandakkar, P., Buee, L., Viollet, B., Davies, P., Marambaud, P., and Vingtdeux, V. (2016). AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology in vivo. *Scientific reports* 6, 26758.

DuBoff, B., Gotz, J., and Feany, M.B. (2012). Tau promotes neurodegeneration via DRP1 mislocalization in vivo. *Neuron* 75, 618-632.

Ducommun, S., Deak, M., Sumpton, D., Ford, R.J., Nunez Galindo, A., Kussmann, M., Viollet, B., Steinberg, G.R., Foretz, M., Dayon, L., *et al.* (2015). Motif affinity and mass spectrometry proteomic approach for the discovery of cellular AMPK targets: identification of mitochondrial fission factor as a new AMPK substrate. *Cellular signalling* 27, 978-988.

Hardie, D.G., Salt, I.P., Hawley, S.A., and Davies, S.P. (1999). AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *The Biochemical journal* 338 ( Pt 3), 717-722.

Harris, J.J., Jolivet, R., and Attwell, D. (2012). Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75, 762-777.

Jack, C.R., Jr., Knopman, D.S., Jagust, W.J., Shaw, L.M., Aisen, P.S., Weiner, M.W., Petersen, R.C., and Trojanowski, J.Q. (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *The Lancet Neurology* 9, 119-128.

Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell metabolism* 1, 15-25.

Kandimalla, R., Manczak, M., Fry, D., Suneetha, Y., Sesaki, H., and Reddy, P.H. (2016). Reduced dynamin-related protein 1 protects against phosphorylated Tau-induced mitochondrial dysfunction and synaptic damage in Alzheimer's disease. *Human molecular genetics* 25, 4881-4897.

Li, J., Wang, Y., Wang, Y., Wen, X., Ma, X.N., Chen, W., Huang, F., Kou, J., Qi, L.W., Liu, B., *et al.* (2015). Pharmacological activation of AMPK prevents Drp1-mediated mitochondrial fission and alleviates endoplasmic reticulum stress-associated endothelial dysfunction. *Journal of molecular and cellular cardiology* 86, 62-74.

Manczak, M., Calkins, M.J., and Reddy, P.H. (2011). Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Human molecular genetics* 20, 2495-2509.

Manczak, M., Kandimalla, R., Fry, D., Sesaki, H., and Reddy, P.H. (2016). Protective effects of reduced dynamin-related protein 1 against amyloid beta-induced mitochondrial dysfunction and synaptic damage in Alzheimer's disease. *Human molecular genetics* 25, 5148-5166.

Manczak, M., and Reddy, P.H. (2012). Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Human molecular genetics* 21, 2538-2547.

Marinangeli, C., Didier, S., and Vingtdeux, V. (2016). AMPK in Neurodegenerative Diseases: Implications and Therapeutic Perspectives. *Current drug targets* 17, 890-907.

Marinangeli, C., Kluza, J., Marchetti, P., Buee, L., and Vingtdeux, V. (2018). Study of AMPK-Regulated Metabolic Fluxes in Neurons Using the Seahorse XFe Analyzer. *Methods in molecular biology* 1732, 289-305.

Marsin, A.S., Bertrand, L., Rider, M.H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M.F., Van den Berghe, G., Carling, D., and Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current biology : CB* 10, 1247-1255.

Mosconi, L. (2013). Glucose metabolism in normal aging and Alzheimer's disease: Methodological and physiological considerations for PET studies. *Clinical and translational imaging 1*.

Mosconi, L., Mistur, R., Switalski, R., Tsui, W.H., Glodzik, L., Li, Y., Pirraglia, E., De Santi, S., Reisberg, B., Wisniewski, T., *et al.* (2009). FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging 36*, 811-822.

Mosconi, L., Rinne, J.O., Tsui, W.H., Murray, J., Li, Y., Glodzik, L., McHugh, P., Williams, S., Cummings, M., Pirraglia, E., *et al.* (2013). Amyloid and metabolic positron emission tomography imaging of cognitively normal adults with Alzheimer's parents. *Neurobiology of aging 34*, 22-34.

Musi, N., Valentine, J.M., Sickora, K.R., Baeuerle, E., Thompson, C.S., Shen, Q., and Orr, M.E. (2018). Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Aging cell*, e12840.

Onyango, I.G., Lu, J., Rodova, M., Lezi, E., Crafter, A.B., and Swerdlow, R.H. (2010). Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health. *Biochimica et biophysica acta 1802*, 228-234.

Quiros, P.M., Goyal, A., Jha, P., and Auwerx, J. (2017). Analysis of mtDNA/nDNA Ratio in Mice. *Current protocols in mouse biology 7*, 47-54.

Scott, J.W., Hawley, S.A., Green, K.A., Anis, M., Stewart, G., Scullion, G.A., Norman, D.G., and Hardie, D.G. (2004). CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. *The Journal of clinical investigation 113*, 274-284.

Sujobert, P., Poulain, L., Paubelle, E., Zylbersztejn, F., Grenier, A., Lambert, M., Townsend, E.C., Brusq, J.M., Nicodeme, E., Decroocq, J., *et al.* (2015). Co-activation of AMPK and mTORC1 Induces Cytotoxicity in Acute Myeloid Leukemia. *Cell reports 11*, 1446-1457.

Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., *et al.* (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *The EMBO journal 28*, 1589-1600.

Toyama, E.Q., Herzig, S., Courchet, J., Lewis, T.L., Jr., Loson, O.C., Hellberg, K., Young, N.P., Chen, H., Polleux, F., Chan, D.C., *et al.* (2016). Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science 351*, 275-281.

Turnley, A.M., Stapleton, D., Mann, R.J., Witters, L.A., Kemp, B.E., and Bartlett, P.F. (1999). Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system. *Journal of neurochemistry 72*, 1707-1716.

Vingtdeux, V., Davies, P., Dickson, D.W., and Marambaud, P. (2011). AMPK is abnormally activated in tangle- and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Acta neuropathologica 121*, 337-349.

Viollet, B., Guigas, B., Leclerc, J., Hebrard, S., Lantier, L., Mounier, R., Andreelli, F., and Foretz, M. (2009). AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta physiologica 196*, 81-98.

Wang, W., Yin, J., Ma, X., Zhao, F., Siedlak, S.L., Wang, Z., Torres, S., Fujioka, H., Xu, Y., Perry, G., *et al.* (2017). Inhibition of mitochondrial fragmentation protects against Alzheimer's disease in rodent model. *Human molecular genetics 26*, 4118-4131.

Wang, X., Su, B., Fujioka, H., and Zhu, X. (2008a). Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *The American journal of pathology* *173*, 470-482.

Wang, X., Su, B., Siedlak, S.L., Moreira, P.I., Fujioka, H., Wang, Y., Casadesus, G., and Zhu, X. (2008b). Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 19318-19323.

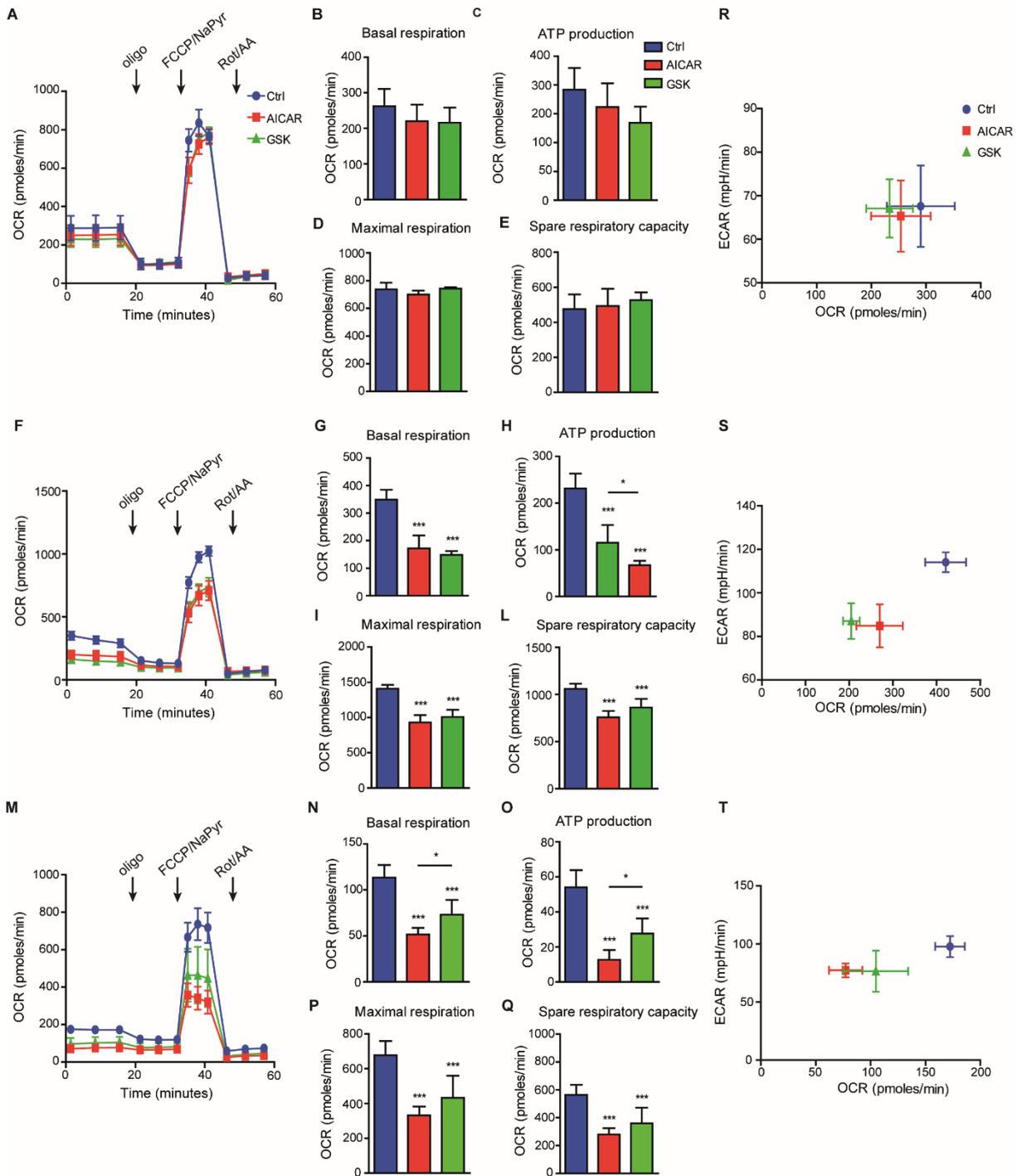
Weisova, P., Concannon, C.G., Devocelle, M., Prehn, J.H., and Ward, M.W. (2009). Regulation of glucose transporter 3 surface expression by the AMP-activated protein kinase mediates tolerance to glutamate excitation in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *29*, 2997-3008.

Wikstrom, J.D., Israeli, T., Bachar-Wikstrom, E., Swisa, A., Ariav, Y., Waiss, M., Kaganovich, D., Dor, Y., Cerasi, E., and Leibowitz, G. (2013). AMPK regulates ER morphology and function in stressed pancreatic beta-cells via phosphorylation of DRP1. *Molecular endocrinology* *27*, 1706-1723.

Zhu, X., Perry, G., Smith, M.A., and Wang, X. (2013). Abnormal mitochondrial dynamics in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* *33 Suppl 1*, S253-262.

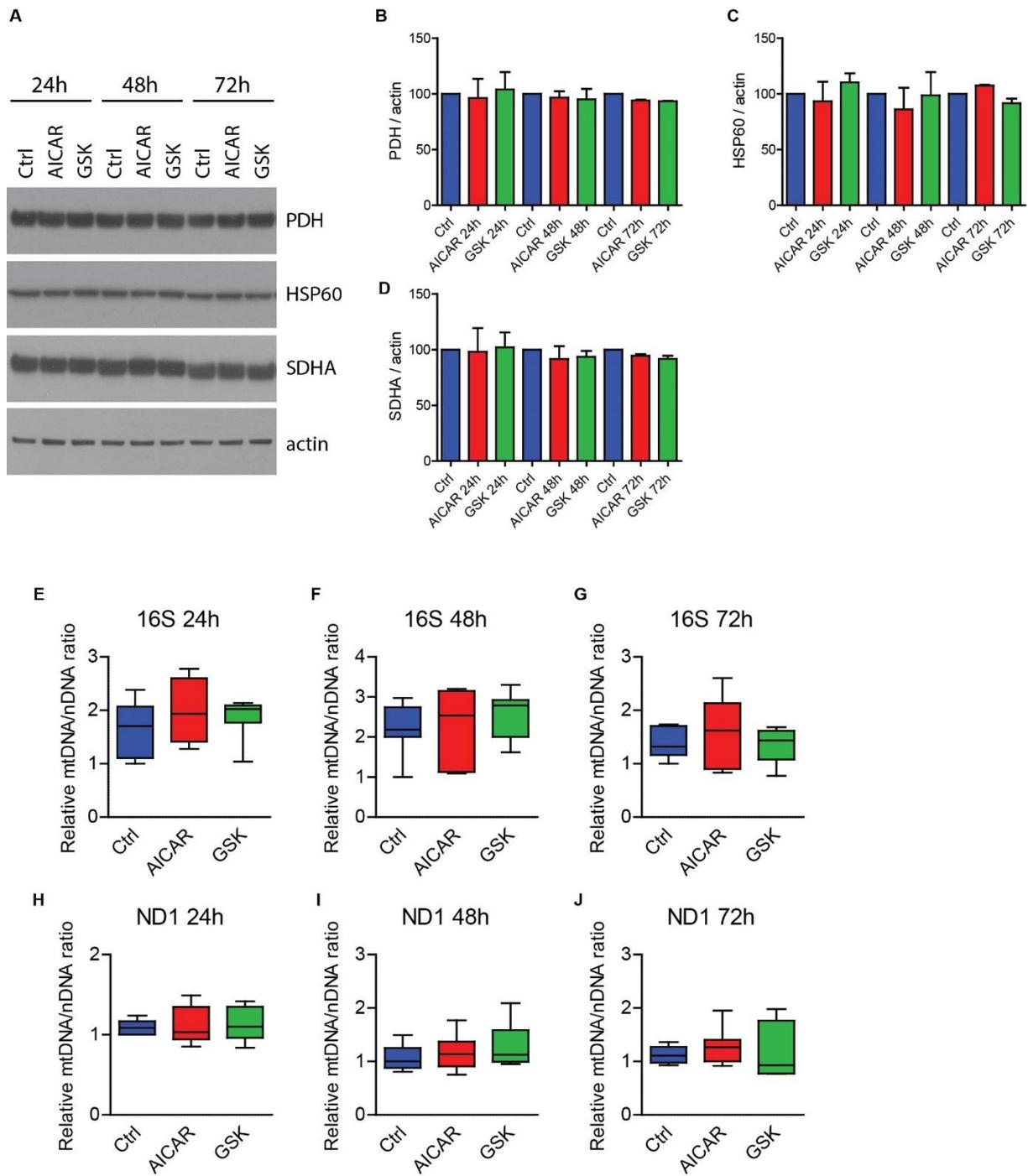


**Figure 1**



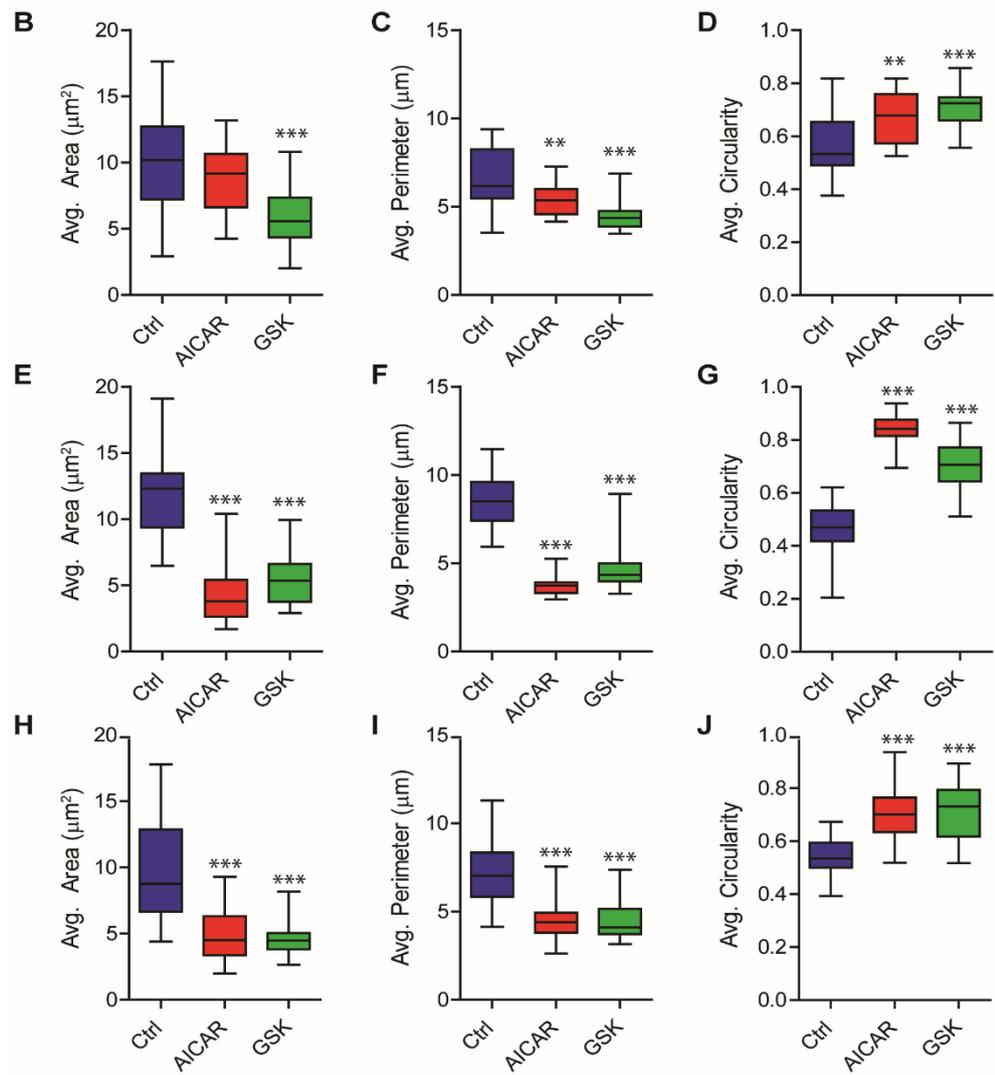
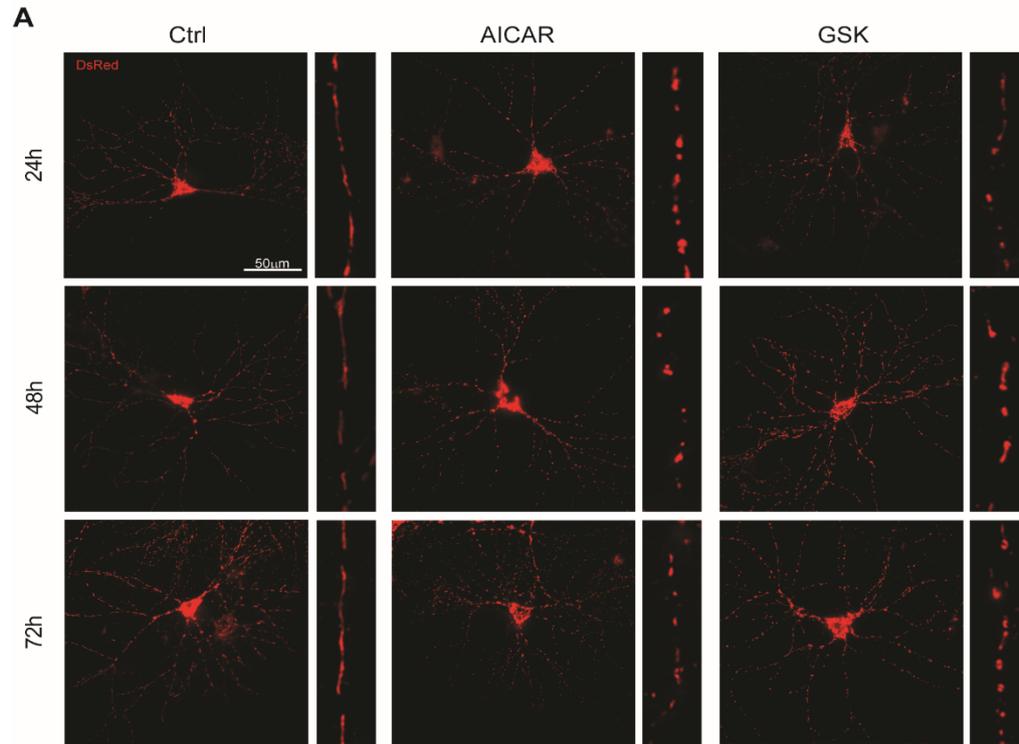
**Figure 1: Pharmacological deregulation of AMPK induces a reduction in mitochondrial respiration. (A-Q)** Seahorse XFe24 technology is used to monitor mitochondrial respiration in primary neurons in response to AMPK deregulation. **(A-F-M)** Primary neurons were treated with the pharmacological AMPK -activator AICAR and GSK621 (GSK) for 24h 48h and 72h. Oxygen consumption rate (OCR as pmolO<sub>2</sub>/min) in untreated (Ctrl) as well as treated cells is monitored under basal conditions and upon the sequential injection of oligomycin (oligo), FCCP, rotenone and antimycin A (Rot/AA) as indicated by arrows. **(B-G-N)** Basal respiration expresses the oxygen consumption rate of cells at basal condition/steady state, **(C-H-O)** ATP turnover is the value of oxygen consumed for the ATP turnover in neurons, **(D-I-P)** maximal respiration expresses the maximal respiration mitochondria can reach, **(E-L-Q)** spare respiratory capacity measures the maximal capability of the mitochondria to adapt to increased energy demand and calculated as the difference between the maximal and the basal respiration. **(R-S-T)** Phenogram indicates the energy state of the cells, and it obtained by plotting the values glycolysis (ECAR as mpH/min) and mitochondrial respiration in cells at basal conditions. Results show n=4-5 mean ± SD. One-way ANOVA (B-E, G-L, N-Q) and two-way ANOVA (R-T) followed by Bonferroni's post-test were used for evaluation of statistical significance. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

**Figure 2**



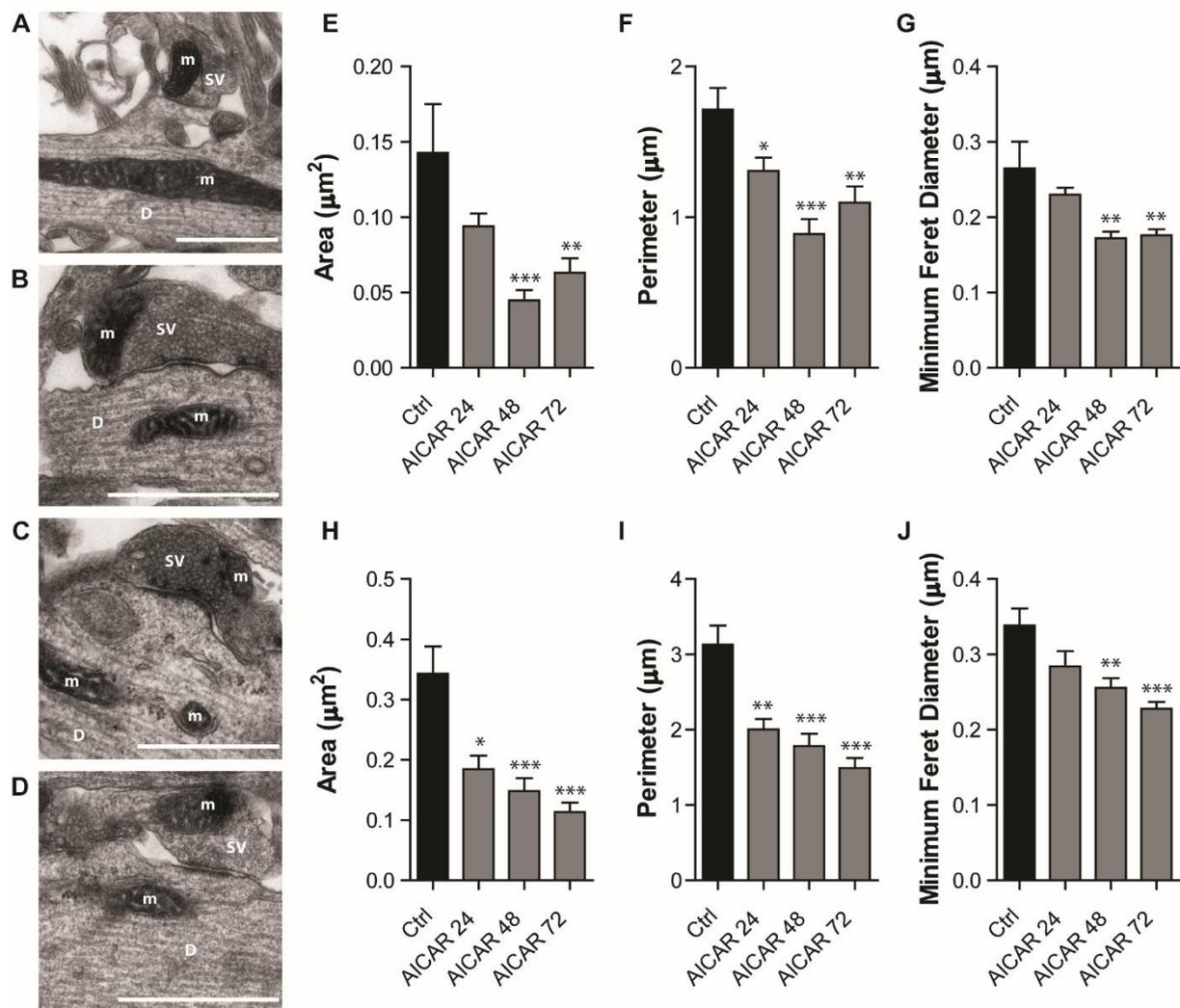
**Figure 2: Mitochondrial mass is not altered by AMPK deregulation in primary neurons.** Primary neurons were treated with AMPK activators AICAR and GSK621 (GSK) for 24 h 48 h and 72h. (A) Western blotting (WB) on total cell lysate from untreated and treated neurons, for the indicated time, and revealed for the mitochondrial marker pyruvate dehydrogenase (PDH), Heat shock protein 60 (HSP60) and Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A (SDHA) and loading control Actin. Results are representative of n=3 independent experiments. (B-D) WB quantifications as shown in A. (E-J) Real-time PCR using mtDNA was used to assess mitochondrial mass via quantification of mitochondrial DNA copy number in untreated (Ctrl) and treated cells with AICAR and GSK621 (GSK) for the indicated time. The primers used recognized the NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1 (ND1) and 16S ribosomal RNA (16S). Results were normalized with the nuclear-encoded gene hexokinase 2 (HK2) and expressed as mtDNA/nDNA ratio. n= 4, results are mean  $\pm$  SD. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test were used for evaluation of statistical significance. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

**Figure 3**



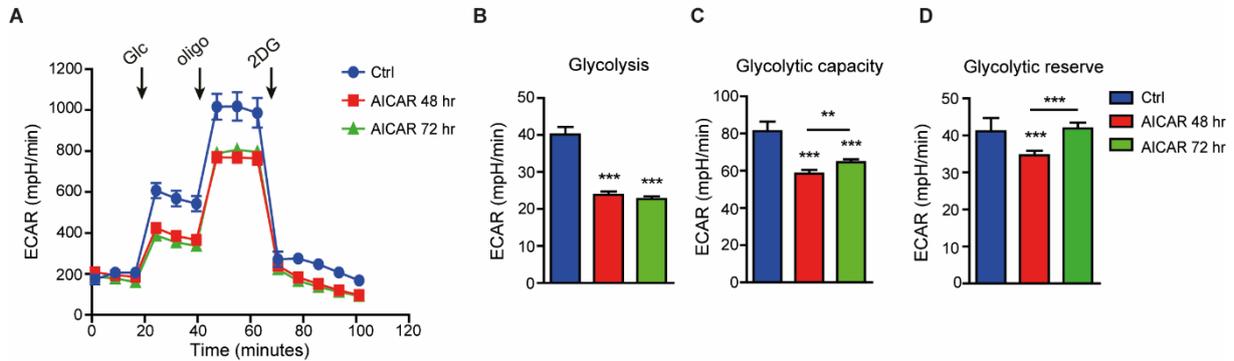
**Figure 3. Mitochondrial morphology is impacted by AMPK deregulation.** (A) Representative microscopy images of primary neuronal cells expressing mitochondria DsRed plasmid (mitoDsRed) were obtained to monitor mitochondrial morphology in untreated (Ctrl) and treated cells with AICAR at indicated time. On the right of each panel is associated a magnified detail from the picture. Scale bar= 50µm. (B) Analysis of mitochondrial morphology of untreated (Ctrl) and treated cells with AICAR as indicated time using ImageJ software. The parameters evaluated were the average perimeter, average size, % area and circularity. n= 4, results show mean ± SD. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test were used for evaluation of statistical significance. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

**Figure 4**



**Figure 4: Pre- and Post-synaptic mitochondria morphology in AICAR treated neurons.** (A-D) Representative electron micrographs showing synaptic regions of 21 DIV neurons not treated (A) or treated with AICAR for 24 (B), 48 (C), and 72 h (D). Individual mitochondria were traced and area (E, H), perimeter (F, I), and minimum Feret diameter (G, J) were determined in pre-synaptic (E-G) mitochondria, and post-synaptic/dendritic compartments (H-J). SV, synaptic vesicle cluster in the pre-synaptic terminal; D, post-synaptic dendrite; m, mitochondria. Scale bars = 1 μm. Results show mean ± SD. One way ANOVA with Tukey post-hoc test. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

**Figure S1**



**Figure S1. AMPK deregulation induced by AICAR reduces glycolytic flux in primary neuronal culture.**

Extracellular acidification rate (ECAR expressed as mpH/min) is monitored using the Seahorse XFe24 technology in untreated (Ctrl) and treated cells with the AMPK activator AICAR for the indicated time. (A) ECAR profile is assessed at basal conditions and in response to the sequential injection of saturating concentration of glucose, oligomycin (oligo) and 2-deoxy-D-glucose (2DG) as indicated by arrows. (B) Basal glycolysis calculated as the ECAR difference before and after the injection of glucose, (C) glycolytic capacity, which expresses the maximal glycolytic flux of the cells, and (D) spare glycolytic reserve, calculated as the difference between the ECAR values at maximal glycolysis and glycolysis. (A-D) Results are n = 4-5 mean are expressed as  $\pm$  SD. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test were used for evaluation of statistical significance. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.



### 3. Conclusion

La réalisation de ces travaux a permis de démontrer que la dérégulation de l'AMPK provoque une altération du métabolisme énergétique neuronal. En effet, en utilisant la technique du Seahorse en culture primaire de neurones, nous avons pu démontrer que le fait d'induire une dérégulation de l'AMPK réduit la respiration mitochondriale. Nous avons également mis en évidence que cette baisse n'est pas due à une diminution de la masse mitochondriale, puisqu'aucune modification de l'expression des protéines mitochondriales ou des niveaux d'ADN mitochondrial (ADNmt) n'a été observée. Toutefois, il est possible que cette diminution des fonctions mitochondriales fasse intervenir la dynamique mitochondriale puisque nos résultats montrent que la dérégulation de l'AMPK provoque un changement de morphologie des mitochondries et plus précisément, une augmentation de leur fission.

Des études montrent qu'au cours de la MA ont lieu de nombreuses altérations de la mitochondrie. En effet, il a par exemple été reporté que la MA est associée à une forte augmentation des processus de fission mitochondriale couplée à l'inverse à une réduction de la fusion (Wang et al. 2009). Il est intéressant de noter que, la protéine tau et le peptide A $\beta$  peuvent impacter cette dynamique mitochondriale. En effet, des études ont mis en évidence que ces deux protéines sont capables d'interagir avec Drp1 (protéine régulant la fission mitochondriale) afin de stimuler les mécanismes de fragmentation mitochondriale (Manczak and Reddy, 2012). De même, l'équipe de *DuBoff et al.*, a également permis de démontrer que dans un modèle de drosophile transgénique pour les FTDP-17, la protéine tau est capable d'interagir avec les filaments d'actine et de les stabiliser. La stabilisation de ce réseau d'actine a pour conséquence d'inhiber la localisation de Drp1 induisant ainsi une élongation des mitochondries qui deviennent alors non fonctionnelles conférant par conséquent une neurotoxicité (DuBoff et al, 2012). Etant donné que nos résultats montrent que la dérégulation de l'AMPK provoque une fragmentation des mitochondries, ces données laissent suggérer que l'AMPK pourrait participer à la mise en place des altérations mitochondriales qui ont lieu au cours de la MA. De même, on peut également émettre l'hypothèse que l'AMPK pourrait agir en synergie avec la protéine tau (via l'induction de sa phosphorylation) pour causer cet effet sur la dynamique mitochondriale. Enfin, comme l'AMPK est impliquée dans la clairance du peptide amyloïde (Vingtdeux *et al.*, 2010), il est également possible qu'en altérant ce mécanisme de dégradation, la dérégulation de l'AMPK puisse impacter la dynamique mitochondriale.

Par ailleurs, comme décrit au cours de l'introduction, le processus de fission mitochondriale semble être un pré-requis pour permettre ensuite l'élimination des mitochondries via la voie de l'autophagie (également appelée mitophagie) (Youle and van der Bliek, 2012b). Au vu de ces données,

nos résultats sont par conséquent intéressants puisqu'ils pourraient permettre d'expliquer comment la dérégulation de l'AMPK pourrait induire la mise en place des altérations métaboliques dans notre modèle. Comme nous l'avons vu précédemment, les mitochondries correspondent à la principale source de production d'énergie sous la forme d'ATP. Ainsi, nos résultats laissent suggérer qu'en provoquant la fission des mitochondries, la dérégulation de l'AMPK pourrait participer à la baisse de production d'énergie neuronale et par conséquent, au développement des déficits énergétiques qui sont observés dans le cerveau des patients atteints de la MA. Au vu de ces résultats, il serait donc intéressant d'approfondir notre étude et notamment, d'analyser le processus de mitophagie dans nos conditions de dérégulation de l'AMPK. Pour se faire, des immunofluorescences dirigées contre le marqueur de l'autophagie LC3 (sous sa forme lipidée) pourraient être effectuées dans des cultures primaires de neurones soumises à une dérégulation de l'AMPK et transfectées avec un marqueur mitochondrial, le DsRed. Comme nos résultats montrent une augmentation de la fission suite à la dérégulation de l'AMPK, il est possible de suggérer que cette dérégulation stimule le processus de mitophagie. Néanmoins, étant donné que nos données montrent également que la dérégulation de l'AMPK n'impacte pas la masse mitochondriale, il serait également intéressant d'étudier l'impact de la dérégulation de l'AMPK sur la biogenèse des mitochondries. La réalisation de ces expérimentations pourraient ainsi nous permettre de mieux comprendre comment la dérégulation de l'AMPK impacte le métabolisme énergétique neuronal, et notamment la fonctionnalité des mitochondries, au cours de la MA.

En plus des altérations des mécanismes de fusion et de fission mitochondriale, il a également été reporté dans la littérature que des dysfonctionnements du transport mitochondrial ont également lieu lors de la MA. De par son rôle dans la régulation du transport axonal, il n'est pas surprenant de constater que la protéine tau peut également avoir un impact sur le transport des mitochondries. En effet, l'utilisation de modèles murins transgéniques pour la pathologie tau a permis de mettre en évidence que l'hyperphosphorylation de la protéine tau entraîne une déstabilisation des MTs et par conséquent une altération de la localisation et de la distribution des mitochondries (Kopeikina *et al.*, 2011). Cette redistribution anormale des mitochondries semble alors impacter l'apport d'énergie aux synapses et pourrait par conséquent contribuer aux dysfonctionnements synaptiques qui ont lieu lors de la MA (Kopeikina *et al.*, 2012). Étant donné que la principale fonction de l'AMPK est d'assurer le maintien des niveaux énergétiques intracellulaires, et que nous avons vu que l'AMPK phosphoryle tau en sérine 262 – épitope jouant un rôle crucial pour la liaison aux MTs – on peut émettre l'hypothèse que l'AMPK pourrait participer à la régulation du transport axonal des mitochondries, notamment en modulant la phosphorylation de tau. Il serait donc très intéressant d'analyser l'impact de la dérégulation de l'AMPK sur le transport axonal des mitochondries. En utilisant les chambres microfluidiques, nous pourrions par conséquent, analyser le transport antérograde (vers les synapses) des mitochondries afin de déterminer si ce transport est perturbé et par conséquent, si l'apport

énergétique aux synapses est altéré dans notre modèle. Ces expérimentations pourraient ainsi permettre de mettre en évidence une implication de la dérégulation de l'AMPK dans les altérations du transport axonal mitochondrial, et notamment, dans les altérations du fonctionnement synaptique qui ont lieu au cours de la MA.

Etant donné que l'AMPK est connue pour être impliquée dans la restauration des niveaux d'énergie intracellulaire, les résultats de cette étude peuvent au premier abord paraître surprenants. En effet, on constate que dans notre modèle, la dérégulation de l'AMPK induit une réduction de la fonctionnalité des mitochondries qui est associée à une baisse des niveaux énergétiques des neurones. Toutefois, ces données sont intéressantes puisqu'elles peuvent être mises en lien avec les résultats de l'étude précédente où il a été montré que la dérégulation de l'AMPK provoque une perte synaptique. En effet, il est possible d'envisager que dans des conditions défavorables où le métabolisme énergétique basal est réduit, l'AMPK maintient les niveaux d'énergie des cellules en minimisant la dépense énergétique des neurones et par conséquent en inhibant les voies ou les fonctions qui en consomment le plus. Or, étant donné que les synapses utilisent la majorité de l'énergie produite par les neurones, il est possible de suggérer que la dérégulation de l'AMPK induit leur élimination afin de minimiser la dépense énergétique. L'ensemble de ces données laissent donc suggérer d'une part, que la dérégulation de l'AMPK pourrait être impliquée dans la mise en place des altérations du métabolisme énergétique observée dans le cerveau des patients atteints de la MA et d'autre part, que ces altérations pourraient jouer un rôle crucial dans la perte d'intégrité synaptique et par conséquent dans le développement des troubles cognitifs retrouvés chez les patients atteints de la MA. Ces données laissent également penser que la régulation du métabolisme énergétique est essentielle pour maintenir les fonctions neuronales et que son altération pourrait jouer un rôle central dans le développement de la MA.

## *Discussion générale*



La MA est une pathologie multifactorielle qui impacte de nombreux processus cellulaires. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction, cette maladie est principalement caractérisée par la présence de deux lésions histopathologiques : l'accumulation extracellulaire de peptides A $\beta$  et l'agrégation intracellulaire de protéines tau hyperphosphorylées. De plus, des altérations du métabolisme énergétique neuronal ainsi qu'une perte synaptique sont également observées dans le cerveau de patients atteints de la MA, et ce, dès les stades précoces de la pathologie (Atamna and Frey, 2007 ; Scheff et al., 2006). De plus en plus d'études montrent l'importance du métabolisme énergétique et notamment de son altération, dans le développement de la MA. En effet, en 2004, une étude a même proposé « l'hypothèse de la cascade mitochondriale » afin de mettre en avant l'importance de ces altérations dans la MA et par conséquent dans l'apparition des autres lésions (Swerdlow and Khan, 2004). Etant donné que ces altérations arrivent de manière très précoce dans le cerveau des patients atteints de la MA, il y a un intérêt majeur à déterminer les mécanismes pouvant aboutir à ces dysfonctionnements. L'AMPK est une kinase hautement conservée au cours de l'évolution de par son rôle critique dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Cette kinase peut moduler un grand nombre de voies de signalisation telles que la synthèse des protéines, la glycolyse, la respiration mitochondriale ou encore l'autophagie, et ce, dans le but de maintenir les niveaux d'énergie de la cellule. Il n'est donc pas surprenant de constater que dans l'ensemble des maladies neurodégénératives où se développent des altérations du métabolisme énergétique, dont notamment la MA, l'activité de l'AMPK est dérégulée. En effet, il a été démontré que dans le cerveau des patients atteints de la MA, l'activité de l'AMPK est fortement dérégulée (Vingtdeux et al., 2011). De plus, de nombreuses études se sont intéressées à étudier l'impact de l'AMPK sur la clairance et la toxicité du peptide A $\beta$ . (Vingtdeux et al., 2010 ; Vingtdeux et al., 2011b, Won et al., 2010 ; Chen et al., 2009). En revanche, peu d'études ont eu pour but d'étudier le rôle de l'AMPK dans les autres processus pathologiques qui se mettent en place au cours de la MA. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés à étudier l'impact de cette dérégulation de l'AMPK sur le développement de ces différents événements qui se produisent au cours de la MA, à savoir, la pathologie tau, la perte des synapses et les altérations du métabolisme énergétique.

➤ ***Implication de l'AMPK dans la phosphorylation de tau et la pathologie tau***

Le premier objectif de ma thèse a eu pour but d'élucider l'implication de l'AMPK dans la régulation de la phosphorylation de la protéine tau ainsi que dans la pathologie tau. Nos résultats ont permis de démontrer que la suractivation de l'AMPK a pour effet d'augmenter le niveau de phosphorylation de la protéine tau au niveau de plusieurs épitopes : les sérines 262/356, les sérines 396/404 et la thréonine 231. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment dans la littérature montrant que l'AMPK est une kinase de tau *in vitro* (Thornton et al., 2011 ; Vingtdeux et al.,

2011) et ont par conséquent permis de valider ces données dans des modèles cellulaires et animaux. Nous avons également montré, qu'en phosphorylant tau en sérine 262, l'AMPK modifie son affinité pour les MTs et induit par conséquent son détachement de ceux-ci. En effet, la phosphorylation de tau sur ce résidu induit des changements conformationnels au niveau des motifs de liaison aux MTs (R1 et R2), régions proches du site sérine 262, ce qui provoque une altération de sa liaison avec les MTs et par conséquent une déstabilisation du réseau microtubulaire (Fischer et al., 2009). De plus, ces changements conformationnels semblent également avoir un impact sur la susceptibilité de tau à former des agrégats puisque, des études réalisées *in vitro* montrent que la phosphorylation de tau en sérine 262 pourrait avoir un effet protecteur pour la MA en empêchant l'agrégation de tau (Schneider et al., 1999). Toutefois, d'autres travaux suggèrent que la sérine 262, tout comme la thréonine 231, feraient partie des sites de phosphorylation dits "anormaux" de la MA qui sont retrouvés dans les NFTs (Hasegawa et al., 1992 ; Morishima-Kawashima et al., 1995 ; Andronesi et al., 2008). Etant donné que nous avons montré que l'AMPK phosphoryle la protéine tau sur ces sites, il est possible de suggérer qu'elle pourrait jouer un rôle dans les changements pathologiques de tau qui se produisent au cours de la MA. Par ailleurs, en phosphorylant la protéine tau, l'AMPK pourrait également participer à la formation de ses agrégats puisque nos résultats montrent que la déficience de la sous-unité  $\alpha 2$  de l'AMPK provoque une réduction du marquage de l'épitope conformationnel de la protéine tau (MC1) dans notre modèle transgénique. Ces résultats laissent donc suggérer qu'au cours de la MA, l'AMPK pourrait jouer un rôle dans la mise en place de la pathologie tau.

➤ ***La dérégulation de l'AMPK altère l'intégrité synaptique***

Lors de notre deuxième objectif, nous avons démontré que la dérégulation de l'AMPK provoque une perte de l'expression des protéines pré- et post-synaptiques associée à une réduction de leur densité et de leur fonctionnalité. Ces résultats laissent fortement suggérer que dans des conditions physiologiques, l'AMPK joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité synaptique. En effet, les neurones, et notamment les synapses, ont besoin d'un apport énergétique conséquent afin d'assurer l'ensemble de leurs fonctions et de maintenir leur intégrité. Des études réalisées dans notre laboratoire ont récemment permis de démontrer, que l'AMPK est nécessaire pour assurer le maintien des niveaux énergétiques des neurones au cours d'une activation synaptique (**Annexe 3**). En effet, dans ces travaux auxquels j'ai participé, nous avons mis en évidence que suite à une activation synaptique (via un traitement avec de la bicuculline et de la 4-aminopyridine), l'AMPK est activée et stimule la respiration mitochondriale dans le but de maintenir les niveaux d'énergie du neurone. De plus, on constate aussi que dans ces conditions, l'AMPK induit l'expression des IEGs, gènes essentiels pour la formation de la mémoire, et que son inhibition empêche l'établissement de la LTP, montrant ainsi l'importance de l'AMPK dans la régulation de la plasticité synaptique. De même, en réalisant des

injections avec le composé C, l'inhibiteur de l'AMPK, dans l'hippocampe de souris WT, nous avons montré que l'inhibition de l'AMPK induit une altération de leur mémoire. Dans l'ensemble, cette étude démontre que l'AMPK joue un rôle crucial dans le métabolisme énergétique des neurones. Par ailleurs, en induisant une dérégulation de l'AMPK avant de réaliser l'activation synaptique, nous avons également constaté que cela provoquait une diminution de la respiration mitochondriale ainsi qu'une altération de la plasticité synaptique. Ces données laissent donc suggérer que la dérégulation de l'AMPK pourrait également jouer un rôle majeur dans la mise en place des altérations du métabolisme énergétique, mais aussi dans le développement des troubles cognitifs qui se développent lors de la MA. Au vu des résultats de cette étude, il paraît donc clair que l'AMPK soit nécessaire pour maintenir l'intégrité des synapses via notamment la régulation de l'homéostasie énergétique. Ces données montrent également que l'activité de l'AMPK neuronale nécessite d'être finement régulée puisque sa dérégulation perturbe l'apport énergétique des neurones et peut par conséquent mener à une perte synaptique.

De plus, nos résultats confirment les travaux de *Mairet-Coello et al.* montrant que l'AMPK promeut l'effet synaptotoxique induit par le peptide amyloïde, et ce, en phosphorylant la protéine tau en sérine 262 (Mairet-Coello et al., 2013). Toutefois, au cours de notre étude, nous avons également identifié le mécanisme à l'origine de la perte des protéines post-synaptiques et mis ainsi en évidence que dans notre modèle, leur élimination ne semblait pas faire intervenir la protéine tau mais implique la voie de l'autophagie dépendante de la protéine ULK. En effet, l'AMPK est connue pour réguler la voie de l'autophagie via deux mécanismes d'action 1) une voie directe qui consiste à phosphoryler la protéine ULK et ainsi initier la formation de l'autophagosome et 2) une voie indirecte lors de laquelle l'AMPK phosphoryle Raptor ce qui a pour conséquence d'inhiber l'activité du complexe mTORC1 et de lever l'inhibition qu'exerce ce complexe sur la kinase ULK (Levine and Kroemer, 2008). L'autophagie joue un rôle important dans la survie cellulaire puisqu'elle est responsable de l'élimination des protéines mal conformées et agrégées, des mitochondries défectueuses ou encore des constituants cellulaires non fonctionnels. Il est intéressant de noter que lors des stades tardifs de la MA, ont lieu des altérations des voies de dégradation par l'autophagie (Nixon & Yang, 2011). Celles-ci ont alors pour conséquences d'entraîner une augmentation de la production des autophagosomes sans pour autant induire l'augmentation de leur élimination par la voie lysosomale. Ces altérations provoquent de ce fait une accumulation de protéines mal conformées et agrégées dont le peptide A $\beta$  et la protéine tau et induisent également des dysfonctionnements mitochondriaux (Pickford et al., 2008 ; Wang et al., 2010). Ces altérations peuvent également être mises en lien avec la dérégulation de l'AMPK qui comme nous l'avons vu est impliquée dans l'initiation de l'autophagie. Ainsi, à travers sa dérégulation, l'AMPK pourrait par conséquent impacter la dégradation des protéines mal conformées et des mitochondries non fonctionnelles en plus de l'élimination des synapses.



➤ ***La dérégulation de l'AMPK altère le métabolisme énergétique neuronal***

La réalisation de notre troisième objectif a permis de démontrer que la dérégulation de l'AMPK provoque, en plus de la perte synaptique, une diminution de la production d'énergie en induisant une augmentation de la fission des mitochondries ainsi qu'une réduction de la respiration mitochondriale et de la glycolyse. Comme discuté précédemment, ces résultats laissent suggérer que lors d'un stress énergétique, la dérégulation de l'AMPK pourrait avoir pour but de minimiser la dépense énergétique neuronale et ce dans le but de préserver la survie du neurone. Autrement dit, la dérégulation de l'AMPK pourrait donc avoir pour conséquence de toujours assurer le maintien des niveaux d'énergie, non plus en stimulant la production d'ATP mais en éliminant les voies qui en consomment le plus. Par ailleurs, il est également possible de suggérer que les altérations métaboliques qui se mettent en place dans notre modèle pourraient être à la fois la cause et la conséquence de la perte synaptique. En effet, deux questions pourraient de ce fait se poser : est-ce la perte des synapses qui provoque *in fine* la réduction de la production d'énergie (puisque l'on élimine la région qui consomme le plus d'énergie) ou est-ce la diminution de la production d'énergie qui induit la perte synaptique (puisque les synapses n'auraient plus assez d'énergie pour rester fonctionnelles et maintenir leur intégrité) ? Il serait très intéressant de pousser davantage ces investigations pour pouvoir répondre à ces questions puisque nous avons vu précédemment que la mise en place de ces deux altérations arrivent dès les stades précoces de la MA et peuvent par conséquent avoir un impact majeur dans le développement de la MA, et notamment dans l'apparition des déclin cognitifs. Plusieurs stratégies pourraient alors être employées pour tenter de vérifier ces deux hypothèses.

*Hypothèse n°1 : la perte des synapses serait à l'origine de la mise en place des altérations du métabolisme énergétique.*

Nous avons montré lors de notre deuxième étude, que l'autophagie est impliquée dans l'élimination des synapses. Par conséquent, afin de vérifier notre première hypothèse, il serait intéressant d'induire une dérégulation de l'AMPK dans des cultures primaires neuronales préalablement traitées avec un inhibiteur pharmacologique de l'autophagie. Puis, suite à ce co-traitement, nous pourrions ensuite analyser la respiration mitochondriale ainsi que la glycolyse grâce à la technique du SeaHorse. Cela nous permettrait ainsi de déterminer si dans des conditions où on bloque la perte synaptique, la dérégulation de l'AMPK altère la fonctionnalité de la mitochondrie, et par conséquent, la production d'énergie. Une analyse de l'expression des marqueurs mitochondriaux, des niveaux d'ADNmt et de la fission mitochondriale pourrait également être effectuée dans ce même but. Par ailleurs, l'ensemble de ces expérimentations pourraient aussi être réalisées via une approche virale. En effet, les cultures de neurones pourraient aussi être infectées avec des shRNA dirigés contre les protéines Atg3, Atg7 ou Atg9, qui jouent un rôle crucial dans les différents stades de l'autophagie, avant d'être soumises à la

dérégulation de l'AMPK. Cela permettrait ainsi de confirmer les résultats à l'aide d'une autre approche.

*Hypothèse n°2 : la mise en place des altérations du métabolisme énergétique serait à l'origine de la perte des synapses*

Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions cette fois induire une dérégulation de l'AMPK tout en empêchant la perte de fonctionnalité des mitochondries pour ainsi déterminer l'effet de cette inhibition sur la perte des synapses. Etant donné que nous avons mis en évidence que la dérégulation de l'AMPK stimule la fission mitochondriale, et que cette dernière induit une réduction des fonctions mitochondriales, il serait possible de bloquer la fission des mitochondries en traitant les neurones avec un inhibiteur de Drp1 (protéine nécessaire pour induire la fission) puis d'induire la dérégulation de l'AMPK. A l'issue de ce co-traitement, une analyse de l'expression des marqueurs synaptiques, de la densité et de la fonctionnalité des synapses pourrait être réalisée dans le but de déterminer si en empêchant la réduction du métabolisme énergétique, on inhibe aussi la perte synaptique. Par ailleurs, nous pourrions également stimuler la biogenèse des mitochondries dans les neurones soumis à la dérégulation de l'AMPK afin d'empêcher d'une autre façon, la baisse de production d'énergie pour pouvoir ensuite analyser l'impact sur l'intégrité synaptique.

La réalisation de ces expérimentations pourraient alors permettre d'améliorer la compréhension des mécanismes à l'origine de la perte des synapses et/ou des altérations énergétiques et pourrait ainsi montrer davantage l'importance du rôle que pourrait avoir l'AMPK dans le développement de la MA.

➤ ***La dérégulation de l'AMPK : un impact pour la mémoire ?***

En jouant à la fois sur la pathologie tau, le métabolisme énergétique et l'intégrité des synapses, l'AMPK pourrait également être impliquée dans le développement des altérations mnésiques qui se produisent chez les patients atteints de la MA. De nombreuses études peuvent appuyer cette hypothèse. En effet, la formation de la mémoire et notamment, de la plasticité synaptique repose sur la synthèse de protéines et nécessite par conséquent une importante quantité d'énergie. De plus, comme nous l'avons vu lors de l'introduction, l'AMPK est impliquée dans les processus de mémorisation puisque sa suractivation altère la formation de la mémoire (Dash et al, 2006 ; Han *et al.*, 2016) ainsi que la LTP dans des coupes hippocampiques *ex-vivo* (Potter et al., 2010). De même, nous avons aussi mis en évidence dans un modèle *in vivo* que l'AMPK est impliquée dans la formation de la mémoire à long terme puisque l'injection de l'inhibiteur de l'AMPK chez des souris WT provoque une perte de la mémoire (***Annexe 3***). Dans notre contexte, comme nous avons vu que la dérégulation de l'AMPK induit une perte synaptique, il serait par conséquent très intéressant de pousser plus loin cette étude et

d'analyser dans notre modèle *in vivo* de dérégulation de l'AMPK, si cette dernière a un impact sur la formation de la mémoire. Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'un autre modèle *in vivo* de dérégulation de l'AMPK pourrait également être utilisé pour analyser cet impact : il s'agit d'un modèle murin porteur de mutations dans la sous-unité  $\gamma 2$  de l'AMPK. En effet, des études ont permis de mettre en évidence que des mutations de cette sous-unité sont retrouvées chez l'homme et induisent une suractivation de l'AMPK au niveau des cellules cardiaques (Zhang *et al.*, 2013) et qui est à l'origine du syndrome de Wolff-Parkinson-White. Afin d'analyser l'impact de ces mutations sur le métabolisme énergétique, des études ont par conséquent développé des modèles de souris porteuses de ces mutations et ont mis en évidence que ces mutations aboutissent au développement d'une obésité et d'une altération de la sécrétion de l'insuline (Yavari *et al.*, 2016). Etant donné que ces troubles métaboliques correspondent aux principaux facteurs de risque de développer une MA, il serait intéressant de déterminer si ces mutations peuvent engendrer des troubles cognitifs dans ces modèles mais également chez l'Homme. Par ailleurs, nous pourrions également analyser l'impact de ces mutations dans notre modèle de culture primaire neuronal afin de déterminer si l'on retrouve les mêmes effets sur la phosphorylation de la protéine tau, l'intégrité des synapses et le métabolisme énergétique.

➤ ***La dérégulation de l'AMPK : un médiateur d'entrée en sénescence ?***

Il est très intéressant de constater que les effets induits par la dérégulation de l'AMPK, notamment sur le métabolisme énergétique mitochondrial ressemble très fortement à un phénotype de sénescence, un phénomène se produisant normalement dans les cellules qui se divisent. En effet, la sénescence est un mécanisme qui certes, provoque un arrêt irréversible du cycle cellulaire, mais qui est également caractérisé par des altérations du fonctionnement des mitochondries, une stimulation de l'autophagie qui correspondrait à un effecteur de la sénescence, ainsi qu'une sécrétion de molécules toxiques pour l'environnement des cellules, le SASP (senescence-associated secretory phenotype). Récemment, une étude a montré que ce phénotype de sénescence est retrouvé dans les cellules neuronales issues de cerveau de patients atteints de la MA ou d'un modèle murin transgénique pour la pathologie tau (Musi *et al.*, 2018). En effet, en réalisant une analyse transcriptomique des neurones contenant des NFTs, les auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans les processus de survie cellulaire et d'inflammation associée à une diminution de ceux impliquée dans l'apoptose et la mort cellulaire. De manière intéressante, il a également été démontré que dans ces neurones, ont lieu des altérations mitochondriales similaires à celles que nous avons observées dans notre modèle, à savoir une réduction de la respiration mitochondriale non associée à une diminution de la masse mitochondriale. De plus, ce phénotype semble également être impliqué dans la neurodégénérescence puisque le traitement des souris transgéniques pour la pathologie tau avec des sénolytiques réduit cette dégénérescence neuronale (Musi *et al.*, 2018). Par ailleurs, il est

intéressant de constater que des études ont mis en évidence que l'AMPK est capable de réguler la sénescence dans d'autres modèles cellulaires. En effet, des études ont démontré qu'une surexpression de la kinase LKB1 (qui pour rappel, est la principale kinase activant l'AMPK) peut provoquer une entrée en sénescence via l'activation de l'AMPK (Zu *et al.*, 2010). De même, une augmentation de l'activité de l'AMPK a également été reportée dans des cellules fibroblastiques en sénescence (Wang *et al.* 2003 ; Zwerschke *et al.*, 2003) laissant ainsi suggérer que l'AMPK pourrait jouer un rôle dans l'induction de la sénescence. Au vu de l'ensemble de ces données et de nos résultats, il serait de ce fait tentant de suggérer que la dérégulation de l'AMPK pourrait induire un phénotype de sénescence dans le but de préserver l'énergie des neurones et par conséquent de maintenir la survie neuronale. Pour le vérifier, une analyse de l'expression des marqueurs de sénescence tels que  $\gamma$ -H2AX, p16 et p21 pourrait être réalisée à partir de neurones soumis à la dérégulation de l'AMPK. De même, une analyse quantitative des niveaux d'ARNm codant pour les protéines impliquées dans la sénescence (les SASP) dont Ilb1, Cxcl1, Tnf $\alpha$  ou encore TLR4 pourrait être réalisée par RT-qPCR dans le but de déterminer si la dérégulation de l'AMPK pourrait stimuler l'expression de leur gènes. Enfin, pour confirmer cette hypothèse, nous pourrions également traiter les cultures neuronales avec des sénolytiques après avoir induit la dérégulation de l'AMPK afin de déterminer si l'inhibition de la sénescence pourrait empêcher la perte synaptique (en régulant négativement l'autophagie) et les altérations métaboliques induites par l'AMPK.

➤ *L'AMPK dans la MA : amie ou ennemie ?*

A travers tous ces résultats, force est de constater que l'AMPK semble jouer un rôle central dans la mise en place de l'ensemble des caractéristiques qui se développent au cours de la MA. En effet, en impactant les différents aspects de la MA, la dérégulation de l'AMPK pourrait par conséquent faire le lien entre les altérations précoces du métabolisme énergétique et les autres événements pathologiques observés lors de la MA. Au vu de nos résultats, il serait tentant de penser que d'inhiber l'AMPK neuronale pourrait être un moyen de remédier à la mise en place de ces altérations dans notre modèle, et notamment, dans la MA. Toutefois, il est très intéressant de noter que l'ensemble de nos études met en évidence deux facettes de l'AMPK. En effet, alors que son activation à long terme a des conséquences néfastes pour le neurone (modulation de la pathologie tau, perte synaptique, et altération du métabolisme énergétique) celle à court terme induit quant à elle des effets bénéfiques puisqu'elle assure le maintien des niveaux énergétiques des neurones (*Annexe 3*). Une des hypothèses pouvant expliquer une telle dichotomie est que selon l'environnement dans lequel elle se trouve, l'AMPK pourrait activer des voies de signalisation différentes. Comme décrit en introduction, l'AMPK régule un vaste ensemble de voies de signalisation et peut alors impacter de nombreux processus cellulaires (Hardie *et al.*, 2004). Il est par conséquent possible que dans des conditions de stimulations dites physiologiques (activation synaptique par exemple), l'AMPK se trouve dans un **environnement**

**favorable** (mitochondries et flux autophagique fonctionnels, pas de stress cellulaire) à la production d'énergie et active par conséquent les voies cellulaires nécessaires et adaptées pour assurer cette homéostasie énergétique. Dans ces conditions, l'AMPK se trouve alors dans un contexte permettant de **préserver la fonctionnalité** du neurone. Cette hypothèse est renforcée par le fait que lorsqu'on inhibe l'AMPK lors d'une activation synaptique, cela altère le mécanisme de LTP et la mémoire des souris (*Annexe 3*) montrant ainsi l'importance d'une activation brève de l'AMPK dans ces conditions. A l'inverse, dans des conditions de **stimulations dites pathologiques** (mitochondries moins fonctionnelles, flux autophagique altéré, accumulation d'agrégats et de ROS) l'AMPK se trouve cette fois-ci dans un contexte ne permettant plus d'assurer une production d'énergie. Par conséquent, l'AMPK va éliminer les mécanismes qui en consomment afin de maintenir les niveaux énergétiques neuronaux pour ainsi **préserver la survie du neurone** et ce probablement, au détriment de la fonctionnalité de celui-ci.

## *Conclusion générale*



La réalisation de cette thèse a permis d'apporter une meilleure compréhension sur le rôle complexe que joue la dérégulation de l'AMPK dans le développement de la MA. L'ensemble de nos résultats montrent en effet, que la dérégulation de l'AMPK peut impacter de nombreux processus pouvant tous être impliqués dans le développement des troubles cognitifs observés chez les patients atteints de la MA. Ils montrent également que l'inhibition de l'AMPK tout comme sa suractivation peuvent avoir des conséquences délétères pour la fonctionnalité des neurones. Bien qu'il soit à l'heure actuelle difficile de déterminer si l'AMPK joue un rôle bénéfique ou néfaste dans la MA, l'ensemble de ce travail de thèse cumulé aux données de la littérature laissent suggérer que la dérégulation de l'AMPK pourrait être lors des premiers stades de la maladie, un moyen pour le neurone de restaurer les niveaux d'énergie et d'éliminer les agrégats protéiques. Puis, dans les stades plus avancés où certaines voies de signalisations deviennent défectueuses (clairance lysosomale, respiration mitochondriale) la dérégulation de l'AMPK deviendrait alors néfaste pour la fonctionnalité du neurone et participerait alors à la mise en place des processus pathologiques (accumulation des agrégats protéiques, altérations mitochondriales, perte synaptique) observés au cours de la MA.

Pour conclure, nos résultats montrent que l'AMPK pourrait jouer un rôle central dans le développement de la MA et que sa dérégulation pourrait être un fil conducteur de l'ensemble des altérations développées lors de cette pathologie.





## *Références bibliographiques*



## A

- 'A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group.' (1993) *Cell*, 72(6), pp. 971–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8458085>.
- Alonso, A. C. *et al.* (1994) 'Role of abnormally phosphorylated tau in the breakdown of microtubules in Alzheimer disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), pp. 5562–5566.
- Amato, S. *et al.* (2011) 'AMP-activated protein kinase regulates neuronal polarization by interfering with PI 3-kinase localization', *Science*, 332(6026), pp. 247–251. doi: 10.1126/science.1201678.
- Anandatheerthavarada, H. K. *et al.* (2003) 'Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells', *Journal of Cell Biology*, 161(1), pp. 41–54. doi: 10.1083/jcb.200207030.
- Andersson, U. *et al.* (2004) 'AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake.', *The Journal of biological chemistry*, 279(13), pp. 12005–8. doi: 10.1074/jbc.C300557200.
- Andreadis, A., Broderick, J. A. and Kosik, K. S. (1995) 'Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons.', *Nucleic acids research*, 23(17), pp. 3585–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7567473>.
- Andronesi, O. C. *et al.* (2008) 'Characterization of Alzheimer's-like paired helical filaments from the core domain of tau protein using solid-state NMR spectroscopy.', *Journal of the American Chemical Society*, 130(18), pp. 5922–8. doi: 10.1021/ja7100517.
- Anggono, V. and Huganir, R. L. (2012) 'Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity.', *Current opinion in neurobiology*, 22(3), pp. 461–9. doi: 10.1016/j.conb.2011.12.006.
- Aplin, A. *et al.* (1992) 'Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles.', *Journal of cellular physiology*, 152(3), pp. 458–66. doi: 10.1002/jcp.1041520304.
- Arendt, T., Stieler, J. and Holzer, M. (2015) 'Brain hypometabolism triggers PHF-like phosphorylation of tau, a major hallmark of Alzheimer's disease pathology', *Journal of Neural Transmission*, 122(4), pp. 531–539. doi: 10.1007/s00702-014-1342-8.
- Arias, C. *et al.* (2002) 'β-amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: Implications for Alzheimer's disease', *Experimental Neurology*, 176(1), pp. 163–174. doi: 10.1006/exnr.2002.7912.
- Arriagada, P. V. *et al.* (1992) 'Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease', *Neurology*, 42(3 Pt 1), pp. 631–639.
- Arvanitakis, Z. *et al.* (2004) 'Diabetes Mellitus and Risk of Alzheimer Disease and Decline in Cognitive Function', *Archives of Neurology*, 61(5), pp. 661–666. doi: 10.1001/archneur.61.5.661.
- Atamna, H. and Frey, W. H. (2007) 'Mechanisms of mitochondrial dysfunction and energy deficiency in Alzheimer's disease.', *Mitochondrion*, 7(5), pp. 297–310. doi: 10.1016/j.mito.2007.06.001.
- Attwell, D. and Laughlin, S. B. (2001) 'An energy budget for signaling in the grey matter of the brain', *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 21(10), pp. 1133–1145. doi: 10.1097/00004647-200110000-00001.

Augustinack, J. C. *et al.* (2002) 'Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease', *Acta Neuropathologica*, 103(1), pp. 26–35. doi: 10.1007/s004010100423.

## B

Bachurin, S. O., Bovina, E. V and Ustyugov, A. A. (2017) 'Drugs in Clinical Trials for Alzheimer's Disease: The Major Trends.', *Medicinal research reviews*, 37(5), pp. 1186–1225. doi: 10.1002/med.21434.

Baglietto-Vargas, D. *et al.* (2018) 'Impaired AMPA signaling and cytoskeletal alterations induce early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease', *Aging Cell*, 17(4), pp. 1–14. doi: 10.1111/acel.12791.

Baloyannis, S. J. (2006) 'Mitochondrial alterations in Alzheimer's disease', 9, pp. 119–126.

Barini, E. *et al.* (2016) 'Metformin promotes tau aggregation and exacerbates abnormal behavior in a mouse model of tauopathy.', *Molecular neurodegeneration*, 11, p. 16. doi: 10.1186/s13024-016-0082-7.

Beg, Z. H., Allmann, D. W. and Gibson, D. M. (1973) 'Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol.', *Biochemical and biophysical research communications*, 54(4), pp. 1362–9.

Beitz, J. M. (2014) 'Parkinson's disease: a review.', *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 6, pp. 65–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24389262>.

Belyaev, N. D. *et al.* (2010) 'The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a {beta}-secretase-dependent pathway.', *The Journal of biological chemistry*, 285(53), pp. 41443–54. doi: 10.1074/jbc.M110.141390.

Bennett, M. C. *et al.* (1992) 'Cytochrome Oxidase Inhibition: A Novel Animal Model of Alzheimer's Disease', *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 5(2), pp. 93–101. doi: 10.1177/002383099200500206.

Biernat, J. *et al.* (1993) 'Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding', *Neuron*, 11(1), pp. 153–163. doi: 10.1016/0896-6273(93)90279-Z.

Binder, L. I., Frankfurter, A. and Rebhun, L. I. (1985) 'The distribution of tau in the mammalian central nervous system.', *The Journal of cell biology*, 101(4), pp. 1371–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3930508>.

Binetti, G. *et al.* (1996) 'Disorders of visual and spatial perception in the early stage of Alzheimer's disease.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 777, pp. 221–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8624088>.

Blass, J. P., Sheu, R. K. and Gibson, G. E. (2000) 'Inherent abnormalities in energy metabolism in Alzheimer disease. Interaction with cerebrovascular compromise.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 903, pp. 204–21.

Blennow, K. *et al.* (2010) 'Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease.', *Nature reviews. Neurology*, 6(3), pp. 131–44. doi: 10.1038/nrneurol.2010.4.

Bliss, T. V and Lomo, T. (1973) 'Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.', *The Journal of physiology*, 232(2), pp. 331–56.

Bloom, G. S. (2014) 'Amyloid- $\beta$  and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis.', *JAMA neurology*, 71(4), pp. 505–8. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.5847.

Braak, H. and Braak, E. (1991) 'Neuropathological staging of Alzheimer-related changes', *Acta Neuropathologica*, 82(4), pp. 239–259.

Braak, H. and Braak, E. (1995) 'Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes.', *Neurobiology of aging*, 16(3), pp. 271-8; discussion 278-84.

Braskie, M. N. and Thompson, P. M. (2014) 'A focus on structural brain imaging in the Alzheimer's disease neuroimaging initiative.', *Biological psychiatry*, 75(7), pp. 527–33. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.11.020.

Brion, J. P. (1985) 'Mise en évidence immunologique de la protéine Tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. Arch Biol (Brux) 1985, 95 : 229-235', (January 1985). Available at: [https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/55538/1/Brion\\_tauF1985.pdf](https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/55538/1/Brion_tauF1985.pdf).

Brion, J. P. *et al.* (1985) 'Neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study', *Journal of Submicroscopic Cytology*, 17(1), pp. 89–96.

Bubber, P. *et al.* (2005) 'Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: Mechanistic implications', *Annals of Neurology*, 57(5), pp. 695–703. doi: 10.1002/ana.20474.

Buée, L. *et al.* (2000) 'Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders.', *Brain research. Brain research reviews*, 33(1), pp. 95–130. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967355>.

Burnouf, S. *et al.* (2013) 'NMDA receptor dysfunction contributes to impaired brain-derived neurotrophic factor-induced facilitation of hippocampal synaptic transmission in a Tau transgenic model', *Aging Cell*, 12(1), pp. 11–23. doi: 10.1111/ace1.12018.

Butner, K. A. and Kirschner, M. W. (1991) 'Tau protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites.', *The Journal of cell biology*, 115(3), pp. 717–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1918161>.

## C

Cabezas-Opazo, F. A. *et al.* (2015) 'Mitochondrial Dysfunction Contributes to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease.', *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015, p. 509654. doi: 10.1155/2015/509654.

Caillet-Boudin, M.-L. *et al.* (2015) 'Regulation of human MAPT gene expression.', *Molecular neurodegeneration*, 10, p. 28. doi: 10.1186/s13024-015-0025-8.

Camilli, D. (2001) 'Restless AMPA receptors : implications for synaptic transmission and plasticity Christian L ü scher and Matthew Frerking', 24(11), pp. 665–670.

Caminiti, S. P. *et al.* (2018) 'FDG-PET and CSF biomarker accuracy in prediction of conversion to different dementias in a large multicentre MCI cohort', *NeuroImage: Clinical*. Elsevier, 18(January), pp. 167–177. doi: 10.1016/j.nicl.2018.01.019.

- Carling, D. (2004a) 'The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control.', *Trends in biochemical sciences*, 29(1), pp. 18–24. doi: 10.1016/j.tibs.2003.11.005.
- Carling, D., Zammit, V. A. and Hardie, D. G. (1987) 'A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis', *FEBS Letters*, 223(2), pp. 217–222. doi: 10.1016/0014-5793(87)80292-2.
- Carlson, C. A. and Kim, K. H. (1973) 'Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation.', *The Journal of biological chemistry*, 248(1), pp. 378–80.
- Carroll, C. M. and Li, Y.-M. (2016) 'Physiological and pathological roles of the  $\gamma$ -secretase complex.', *Brain research bulletin*, 126(Pt 2), pp. 199–206. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.04.019.
- Celenza, J. L. and Carlson, M. (1986) 'A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase', *Science*, 233(4769), pp. 1175–1180. doi: 10.1126/science.3526554.
- Chen, H. *et al.* (2003) 'Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development', *Journal of Cell Biology*, 160(2), pp. 189–200. doi: 10.1083/jcb.200211046.
- Chen, J.-L. *et al.* (2018) 'Metformin attenuates diabetes-induced tau hyperphosphorylation in vitro and in vivo by enhancing autophagic clearance.', *Experimental neurology*, 311(April 2018), pp. 44–56. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.09.008.
- Chen, J. *et al.* (1992) 'Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons.', *Nature*, 360(6405), pp. 674–7. doi: 10.1038/360674a0.
- Chen, L. *et al.* (2012) 'AMP-activated protein kinase undergoes nucleotide-dependent conformational changes.', *Nature structural & molecular biology*, 19(7), pp. 716–8. doi: 10.1038/nsmb.2319.
- Chen, L. *et al.* (2013) 'Conserved regulatory elements in AMPK', *Nature*. Nature Publishing Group, 498(7453), pp. E8–E10. doi: 10.1038/nature12189.
- Chen, L. *et al.* (2016) 'AMPK activation by GSK621 inhibits human melanoma cells in vitro and in vivo.', *Biochemical and biophysical research communications*, 480(4), pp. 515–521. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.040.
- Chen, M.-K. *et al.* (2018) 'Assessing Synaptic Density in Alzheimer Disease With Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Positron Emission Tomographic Imaging.', *JAMA neurology*, 75(10), pp. 1215–1224. doi: 10.1001/jamaneurol.2018.1836.
- Chou, S.-Y. *et al.* (2005) 'CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model.', *Journal of neurochemistry*, 93(2), pp. 310–20. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03029.x.
- Cipolat, S. *et al.* (2004) 'OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(45), pp. 15927–15932. doi: 10.1073/pnas.0407043101.
- Cleveland, D. O. N. W., Hwo, S. and Kirschner, M. W. (1977) '137-Purification of Tau, a Microtubule-associated Protein that Induces Assembly of Microtubules from Purified Tubulin.pdf', pp. 207–225.
- Collingridge, G. L., Kehl, S. J. and McLennan, H. (1983) 'Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus.', *The Journal of physiology*, 334, pp. 33–46.
- Cook, M., Bolkan, B. J. and Kretschmar, D. (2014) 'Increased actin polymerization and stabilization

interferes with neuronal function and survival in the AMPK $\gamma$  mutant Loechrig.', *PloS one*, 9(2), p. e89847. doi: 10.1371/journal.pone.0089847.

Corder, E. H. *et al.* (1993) 'Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.', *Science (New York, N.Y.)*, 261(5123), pp. 921–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8346443>.

Corpas, R. *et al.* (2018) 'Resveratrol Induces Brain Resilience Against Alzheimer Neurodegeneration Through Proteostasis Enhancement.', *Molecular neurobiology*. doi: 10.1007/s12035-018-1157-y.

Corton, J. M. *et al.* (1995) '5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?', *European journal of biochemistry*, 229(2), pp. 558–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7744080>.

Coskun, P. E. *et al.* (2010) 'Systemic mitochondrial dysfunction and the etiology of Alzheimer's disease and down syndrome dementia', *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(SUPPL.2). doi: 10.3233/JAD-2010-100351.

Coyle, J. T., Price, D. L. and DeLong, M. R. (1983) 'Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation.', *Science (New York, N.Y.)*, 219(4589), pp. 1184–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6338589>.

Crane, P. K. *et al.* (2013) 'Glucose Levels and Risk of Dementia', *New England Journal of Medicine*, 369(6), pp. 540–548. doi: 10.1056/NEJMoa1215740.

Crute, B. E. *et al.* (1998) 'Functional domains of the  $\alpha$ 1 catalytic subunit of the AMP-activated protein kinase', *Journal of Biological Chemistry*, 273(52), pp. 35347–35354. doi: 10.1074/jbc.273.52.35347.

Cummings, J. *et al.* (2017) 'Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017.', *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)*, 3(3), pp. 367–384. doi: 10.1016/j.trci.2017.05.002.

## D

Dagon, Y. *et al.* (2005) 'Nutritional status, cognition, and survival: a new role for leptin and AMP kinase.', *The Journal of biological chemistry*, 280(51), pp. 42142–8. doi: 10.1074/jbc.M507607200.

Dahlgren, K. N. *et al.* (2002) 'Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability.', *The Journal of biological chemistry*, 277(35), pp. 32046–53. doi: 10.1074/jbc.M201750200.

Danysz, W. and Parsons, C. G. (2003) 'The NMDA receptor antagonist memantine as a symptomatological and neuroprotective treatment for Alzheimer's disease: preclinical evidence.', *International journal of geriatric psychiatry*, 18(Suppl 1), pp. S23-32. doi: 10.1002/gps.938.

Dasgupta, B. and Milbrandt, J. (2007) 'Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(17), pp. 7217–22. doi: 10.1073/pnas.0610068104.

Dasgupta, B. and Milbrandt, J. (2009) 'AMP-Activated Protein Kinase Phosphorylates Retinoblastoma Protein to Control Mammalian Brain Development', *Developmental Cell*. Elsevier Ltd, 16(2), pp. 256–270. doi: 10.1016/j.devcel.2009.01.005.

Dash, P. K., Orsi, S. A. and Moore, A. N. (2006) 'Spatial memory formation and memory-enhancing effect of glucose involves activation of the tuberous sclerosis complex-Mammalian target of rapamycin pathway.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(31), pp. 8048–56. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0671-06.2006.



- Davies, P. and Maloney, A. J. (1976) 'Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease.', *Lancet (London, England)*, 2(8000), p. 1403. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/63862>.
- Davies, S. N. *et al.* (1989) 'Temporally distinct pre- and post-synaptic mechanisms maintain long-term potentiation.', *Nature*, 338(6215), pp. 500–3. doi: 10.1038/338500a0.
- Davis, K. L. *et al.* (1999) 'Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease.', *JAMA*, 281(15), pp. 1401–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10217056>.
- Decker, H. *et al.* (2010) 'N-methyl-D-aspartate receptors are required for synaptic targeting of Alzheimer's toxic amyloid- $\beta$  peptide oligomers.', *Journal of neurochemistry*, 115(6), pp. 1520–9. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07058.x.
- DeKosky, S. T. and Scheff, S. W. (1990) 'Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity', *Annals of Neurology*, 27(5), pp. 457–464. doi: 10.1002/ana.410270502.
- Delacourte, A. *et al.* (1999) 'The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease.', *Neurology*, 52(6), pp. 1158–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10214737>.
- Delacourte, A. and Defossez, A. (1986) 'Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments', *Journal of the Neurological Sciences*, 76(2–3), pp. 173–186.
- Devi, L. *et al.* (2006) 'Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(35), pp. 9057–68. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1469-06.2006.
- Dixit, R. *et al.* (2008) 'Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau.', *Science (New York, N.Y.)*, 319(5866), pp. 1086–9. doi: 10.1126/science.1152993.
- Domise, M. and Vingtdeux, V. (2016) 'AMPK in Neurodegenerative Diseases.', *EXS*, 107, pp. 153–177. doi: 10.1007/978-3-319-43589-3\_7.
- Dong, X., Wang, Y. and Qin, Z. (2009) 'Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases.', *Acta pharmacologica Sinica*, 30(4), pp. 379–87. doi: 10.1038/aps.2009.24.
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A. and Banker, G. A. (1988) 'The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 8(4), pp. 1454–68. doi: 10.1016/0012-1606(89)90269-8.
- Drubin, D. and Kirschner, M. (1986) 'Purification of tau protein from brain.', *Methods in enzymology*, 134, pp. 156–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3102900>.
- DuBoff, B., Götz, J. and Feany, M. B. (2012) 'Tau Promotes Neurodegeneration via DRP1 Mislocalization In Vivo', *Neuron*, 75(4), pp. 618–632. doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.026.
- Duyckaerts, C. *et al.* (1997) 'Modeling the relation between neurofibrillary tangles and intellectual status', *Neurobiology of Aging*, 18(3), pp. 267–273.
- Duyckaerts, C. *et al.* (1999) 'Maladie d'Alzheimer : les lésions et leur progression', *Rev Neurol (Paris)*, 155(155), pp. 17–27.
- Dzamko, N. *et al.* (2010) 'AMPK  $\beta$ 1 deletion reduces appetite, preventing obesity and hepatic insulin

resistance', *Journal of Biological Chemistry*, 285(1), pp. 115–122. doi: 10.1074/jbc.M109.056762.

## E

Ebneth, A. *et al.* (1998) 'Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease.', *The Journal of cell biology*, 143(3), pp. 777–94.

Eckert, A. *et al.* (2014) 'March separate, strike together--role of phosphorylated TAU in mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease.', *Biochimica et biophysica acta*, 1842(8), pp. 1258–66. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.08.013.

Edbauer, D. *et al.* (2003) 'Reconstitution of gamma-secretase activity.', *Nature cell biology*, 5(5), pp. 486–8. doi: 10.1038/ncb960.

El Kadmiri, N. *et al.* (2013) '[Genetic aspects of Alzheimer's disease (Review)].', *Pathologie-biologie*, 61(6), pp. 228–38. doi: 10.1016/j.patbio.2013.04.001.

Errington, M. L., Lynch, M. A. and Bliss, T. V (1987) 'Long-term potentiation in the dentate gyrus: induction and increased glutamate release are blocked by D(-)aminophosphonovalerate.', *Neuroscience*, 20(1), pp. 279–84.

Evrard, C. *et al.* (2018) 'Now you make false memories; now you do not: the order of presentation of words in DRM lists influences the production of the critical lure in Alzheimer's disease.', *Psychological research*, 82(2), pp. 429–438. doi: 10.1007/s00426-016-0831-9.

Ewers, M. *et al.* (2007) 'Multicenter assessment of CSF-phosphorylated tau for the prediction of conversion of MCI', *Neurology*, 69(24), pp. 2205–2212. doi: 10.1212/01.wnl.0000286944.22262.ff.

## F

Fagan, A. M. *et al.* (2006) 'Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid Aβ<sub>42</sub> in humans', *Annals of Neurology*, 59(3), pp. 512–519. doi: 10.1002/ana.20730.

De Felice, F. G. *et al.* (2007) 'Aβ oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine.', *The Journal of biological chemistry*, 282(15), pp. 11590–601. doi: 10.1074/jbc.M607483200.

Ferretta, A. *et al.* (2014) 'Effect of resveratrol on mitochondrial function: implications in parkin-associated familial Parkinson's disease.', *Biochimica et biophysica acta*, 1842(7), pp. 902–15. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.02.010.

Ferris, S. H. *et al.* (1980) 'Positron emission tomography in the study of aging and senile dementia.', *Neurobiology of aging*, 1(2), pp. 127–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24279935>.

Filliatreau, G. (1988) 'Les moteurs moléculaires du transport axonal', pp. 373–377. Available at: [http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/3835/MS\\_1988\\_6\\_373.pdf](http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/3835/MS_1988_6_373.pdf).

Fischer, D. *et al.* (2009) 'Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules.', *Biochemistry*, 48(42), pp. 10047–55. doi: 10.1021/bi901090m.

Flammang, B. *et al.* (2012) 'Evidence that the amyloid-β protein precursor intracellular domain,

AICD, derives from  $\beta$ -secretase-generated C-terminal fragment.', *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 30(1), pp. 145–53. doi: 10.3233/JAD-2012-112186.

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.', *Journal of psychiatric research*, 12(3), pp. 189–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1202204>.

Frandemiche, M. L. *et al.* (2014) ‘Activity-Dependent Tau Protein Translocation to Excitatory Synapse Is Disrupted by Exposure to Amyloid-Beta Oligomers’, *Journal of Neuroscience*, 34(17), pp. 6084–6097. doi: 10.1021/ja0521122.

Frank, S. *et al.* (2001) ‘The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis’, *Developmental Cell*, 1(4), pp. 515–525. doi: 10.1016/S1534-5807(01)00055-7.

Fulga, T. A. *et al.* (2007) ‘Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo’, *Nature Cell Biology*, 9(2), pp. 139–148. doi: 10.1038/ncb1528.

## G

Gabuzda, D. *et al.* (1994) ‘Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative’, *Journal of Biological Chemistry*, 269(18), pp. 13623–13628.

Galasso, A. *et al.* (2017) ‘An AMPK-dependent regulatory pathway in tau-mediated toxicity.’, *Biology open*, 6(10), pp. 1434–1444. doi: 10.1242/bio.022863.

Gao, C.-L. *et al.* (2010) ‘Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes.’, *Molecular and cellular endocrinology*, 320(1–2), pp. 25–33. doi: 10.1016/j.mce.2010.01.039.

Gao, G. *et al.* (1996) ‘Protein Kinase \*’, 271(15), pp. 8675–8681.

Geeraert, C. *et al.* (2010) ‘Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation.’, *The Journal of biological chemistry*, 285(31), pp. 24184–94. doi: 10.1074/jbc.M109.091553.

Glenner, G. G. and Wong, C. W. (1984) ‘Alzheimer’s disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.’, *Biochemical and biophysical research communications*, 120(3), pp. 885–90. doi: 10.1016/S0006-291X(84)80190-4.

Goate, A. *et al.* (1991) ‘Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer’s disease.’, *Nature*, 349(6311), pp. 704–6. doi: 10.1038/349704a0.

Goedert, M. *et al.* (1989) ‘Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer’s disease’, *Neuron*, 3(4), pp. 519–526.

Goedert, M. *et al.* (1995) ‘Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase.’, *Journal of neurochemistry*, 65(6), pp. 2804–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7595582>.

Goedert, M. and Jakes, R. (1990) ‘Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization.’, *The EMBO journal*, 9(13), pp. 4225–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2124967>.

- Goetzl, E. J. *et al.* (2015) 'Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease.', *Neurology*, 85(1), pp. 40–7. doi: 10.1212/WNL.0000000000001702.
- Gomes, L. C., Di Benedetto, G. and Scorrano, L. (2011) 'During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability.', *Nature cell biology*, 13(5), pp. 589–98. doi: 10.1038/ncb2220.
- Gómez-Galeno, J. E. *et al.* (2010) 'A Potent and Selective AMPK Activator That Inhibits de Novo Lipogenesis.', *ACS medicinal chemistry letters*, 1(9), pp. 478–82. doi: 10.1021/ml100143q.
- Goodger, Z. V *et al.* (2009) 'Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway.', *Journal of cell science*, 122(Pt 20), pp. 3703–14. doi: 10.1242/jcs.048090.
- Götz, J. *et al.* (2001) 'Formation of neurofibrillary tangles in P3011 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils.', *Science (New York, N.Y.)*, 293(5534), pp. 1491–5. doi: 10.1126/science.1062097.
- Gowans, G. J. *et al.* (2013) 'AMP is a true physiological regulator of amp-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation', *Cell Metabolism*. The Authors, 18(4), pp. 556–566. doi: 10.1016/j.cmet.2013.08.019.
- Greco, S. J. *et al.* (2009) 'Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells.', *Biochemical and biophysical research communications*, 380(1), pp. 98–104. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.041.
- Greco, S. J. *et al.* (2011) 'Leptin boosts cellular metabolism by activating AMPK and the sirtuins to reduce tau phosphorylation and  $\beta$ -amyloid in neurons.', *Biochemical and biophysical research communications*, 414(1), pp. 170–4. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.050.
- Greene, J. D., Hodges, J. R. and Baddeley, A. D. (1995) 'Autobiographical memory and executive function in early dementia of Alzheimer type.', *Neuropsychologia*, 33(12), pp. 1647–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8745122>.
- Gross, G. W. *et al.* (1977) 'A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro.', *Neuroscience letters*, 6(2–3), pp. 101–5.
- Grundke-Iqbal, I. *et al.* (1986) 'Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13), pp. 4913–4917.
- Guerrieri, D. and van Praag, H. (2015) 'Exercise-mimetic AICAR transiently benefits brain function.', *Oncotarget*, 6(21), pp. 18293–313. doi: 10.18632/oncotarget.4715.
- Guo, T., Noble, W. and Hanger, D. P. (2017) 'Roles of tau protein in health and disease', *Acta Neuropathologica*, 133(5), pp. 665–704. doi: 10.1007/s00401-017-1707-9.
- Guzowski, J. F. *et al.* (2000) 'Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(11), pp. 3993–4001.

## H

- Hamill, O. P. *et al.* (1981) 'Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording

from cells and cell-free membrane patches.’, *Pflügers Archiv: European journal of physiology*, 391(2), pp. 85–100.

Hampel, H. *et al.* (2015) ‘Advances in the therapy of Alzheimer’s disease: targeting amyloid beta and tau and perspectives for the future.’, *Expert review of neurotherapeutics*, 15(1), pp. 83–105. doi: 10.1586/14737175.2015.995637.

Han, Y. *et al.* (2016) ‘AMPK Signaling in the Dorsal Hippocampus Negatively Regulates Contextual Fear Memory Formation’, *Neuropsychopharmacology*. Nature Publishing Group, 41(7), pp. 1849–1864. doi: 10.1038/npp.2015.355.

Hansson, O. *et al.* (2007) ‘Prediction of Alzheimer’s disease using the CSF A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 ratio in patients with mild cognitive impairment’, *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 23(5), pp. 316–320. doi: 10.1159/000100926.

Hardie, D. G. (2008) ‘Role of AMP-activated protein kinase in the metabolic syndrome and in heart disease’, *FEBS Letters*, 582(1), pp. 81–89. doi: 10.1016/j.surg.2014.03.014.

Hardie, D. G. (2018) ‘Keeping the home fires burning†: AMP-activated protein kinase’, *Journal of the Royal Society Interface*, 15(138). doi: 10.1098/rsif.2017.0774.

Harold, D. *et al.* (2009) ‘Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer’s disease.’, *Nature genetics*, 41(10), pp. 1088–93. doi: 10.1038/ng.440.

Harris, J. J., Jolivet, R. and Attwell, D. (2012) ‘Synaptic energy use and supply.’, *Neuron*, 75(5), pp. 762–77. doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.019.

Hasegawa, M. *et al.* (1992) ‘Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in the Alzheimer’s disease brain.’, *The Journal of biological chemistry*, 267(24), pp. 17047–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1512244>.

Hawley, S. A. *et al.* (2003) ‘Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade.’, *Journal of biology*, 2(4), p. 28. doi: 10.1186/1475-4924-2-28.

Hawley, S. A. *et al.* (2012) ‘The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase.’, *Science (New York, N.Y.)*, 336(6083), pp. 918–22. doi: 10.1126/science.1215327.

He, Z. *et al.* (2018) ‘Amyloid- $\beta$  plaques enhance Alzheimer’s brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation.’, *Nature medicine*, 24(1), pp. 29–38. doi: 10.1038/nm.4443.

Henriques, A. D. *et al.* (2018) ‘Fluid and imaging biomarkers for Alzheimer’s disease: Where we stand and where to head to.’, *Experimental gerontology*, 107, pp. 169–177. doi: 10.1016/j.exger.2018.01.002.

Hillman, C. H., Erickson, K. I. and Kramer, A. F. (2008) ‘Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition.’, *Nature reviews. Neuroscience*, 9(1), pp. 58–65. doi: 10.1038/nrn2298.

Himmler, A. *et al.* (1989) ‘Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains.’, *Molecular and cellular biology*, 9(4), pp. 1381–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2498649>.

Hirai, K. *et al.* (2001) ‘Mitochondrial abnormalities in Alzheimer’s disease.’, *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(9), pp. 3017–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11312286>.

Hoover, B. R. *et al.* (2010) ‘Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction

independently of neurodegeneration.’, *Neuron*, 68(6), pp. 1067–81. doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.030.

Hoover, B. R. *et al.* (2010) ‘Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration’, *Neuron*, 68(6), pp. 1067–1081. doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.030.

Hoppins, S., Lackner, L. and Nunnari, J. (2007) ‘The machines that divide and fuse mitochondria.’, *Annual review of biochemistry*, 76, pp. 751–80. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.071905.090048.

Horman, S. *et al.* (2006) ‘Insulin antagonizes ischemia-induced Thr 172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase  $\alpha$ -subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser 485/491’, *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), pp. 5335–5340. doi: 10.1074/jbc.M506850200.

Hoyer, A. *et al.* (2005) ‘Amyloid precursor protein (APP) and its derivatives change after cellular energy depletion. An in vitro-study’, *Journal of Neural Transmission*, 112(2), pp. 239–253. doi: 10.1007/s00702-004-0176-1.

Hsia, A. Y. *et al.* (1999) ‘Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer’s disease mouse models.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), pp. 3228–33. doi: 10.1073/pnas.96.6.3228.

Hsieh, H. *et al.* (2006) ‘AMPA Removal Underlies A $\beta$ -Induced Synaptic Depression and Dendritic Spine Loss’, *Neuron*, 52(5), pp. 831–843. doi: 10.1016/j.neuron.2006.10.035.

Hudson, E. R. *et al.* (2003) ‘A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias.’, *Current biology: CB*, 13(10), pp. 861–6.

Hung, S.-Y. and Fu, W.-M. (2017) ‘Drug candidates in clinical trials for Alzheimer’s disease.’, *Journal of biomedical science*, 24(1), p. 47. doi: 10.1186/s12929-017-0355-7.

Hurley, R. L. *et al.* (2005) ‘The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases.’, *The Journal of biological chemistry*, 280(32), pp. 29060–6. doi: 10.1074/jbc.M503824200.

## I

Imtiaz, B. *et al.* (2014) ‘Future directions in Alzheimer’s disease from risk factors to prevention’, *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 88(4), pp. 661–670. doi: 10.1016/j.bcp.2014.01.003.

Ittner, L. M. *et al.* (2010) ‘Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer’s disease mouse models’, *Cell*, 142(3), pp. 387–397. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.036.

Ittner, L. M. and Götz, J. (2011) ‘Amyloid- $\beta$  and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer’s disease.’, *Nature reviews. Neuroscience*, 12(2), pp. 65–72. doi: 10.1038/nrn2967.

Ittner, L. M., Ke, Y. D. and Götz, J. (2009) ‘Phosphorylated Tau interacts with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein 1 (JIP1) in Alzheimer disease.’, *The Journal of biological chemistry*, 284(31), pp. 20909–16. doi: 10.1074/jbc.M109.014472.

Iwatsubo, T. *et al.* (1995) ‘Amyloid beta protein (A beta) deposition: A beta 42(43) precedes A beta 40 in Down syndrome.’, *Annals of neurology*, 37(3), pp. 294–9. doi: 10.1002/ana.410370305.

## J

Jack, C. R. *et al.* (1992) 'MR-based hippocampal volumetry in the diagnosis of Alzheimer's disease.', *Neurology*, 42(1), pp. 183–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1734300>.

Jack, C. R. *et al.* (2004) 'Comparison of different MRI brain atrophy rate measures with clinical disease progression in AD.', *Neurology*, 62(4), pp. 591–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14981176>.

Jack, C. R. *et al.* (2013) 'Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers.', *The Lancet. Neurology*, 12(2), pp. 207–16. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70291-0.

Janning D, Igaev M, Sündermann F, *et al.* (2014) 'Single molecule tracking of tau reveals fast kiss-and-hop interaction with microtubules in living neurons Dennis Janning'.

Jarosz-Griffiths, H. H. *et al.* (2016) 'Amyloid- $\beta$  Receptors: The Good, the Bad, and the Prion Protein.', *The Journal of biological chemistry*, 291(7), pp. 3174–83. doi: 10.1074/jbc.R115.702704.

Jenne, D. E. *et al.* (1998) 'Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase.', *Nature genetics*, 18(1), pp. 38–43. doi: 10.1038/ng0198-38.

Van der Jeugd, A. *et al.* (2013) 'Progressive age-related cognitive decline in tau mice.', *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 37(4), pp. 777–88. doi: 10.3233/JAD-130110.

Jiang, P. *et al.* (2013) 'Adenosine monophosphate-activated protein kinase overactivation leads to accumulation of  $\alpha$ -synuclein oligomers and decrease of neurites.', *Neurobiology of aging*, 34(5), pp. 1504–15. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.001.

Jiang, T. *et al.* (2015) 'Ischemic preconditioning provides neuroprotection by induction of AMP-activated protein kinase-dependent autophagy in a rat model of ischemic stroke.', *Molecular neurobiology*, 51(1), pp. 220–9. doi: 10.1007/s12035-014-8725-6.

Jonsson, T. *et al.* (2012) 'A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline.', *Nature*, 488(7409), pp. 96–9. doi: 10.1038/nature11283.

Ju, T. C. *et al.* (2011) 'Nuclear translocation of AMPK- $\alpha$ 1 potentiates striatal neurodegeneration in Huntington's disease', *Journal of Cell Biology*, 194(2), pp. 209–227. doi: 10.1083/jcb.201105010.

Jucker, M. and Walker, L. C. (2013) 'Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases.', *Nature*. Nature Publishing Group, 501(7465), pp. 45–51. doi: 10.1038/nature12481.

## K

Kanaan, N. M. *et al.* (2011) 'Pathogenic forms of tau inhibit kinesin-dependent axonal transport through a mechanism involving activation of axonal phosphotransferases.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(27), pp. 9858–68. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0560-11.2011.

Kandimalla, R. *et al.* (2016) 'Reduced dynamin-related protein 1 protects against phosphorylated Tau-

- induced mitochondrial dysfunction and synaptic damage in Alzheimer's disease', *Human Molecular Genetics*, 25(22), pp. 4881–4897. doi: 10.1093/hmg/ddw312.
- Kang, J.-S. *et al.* (2008) 'Docking of axonal mitochondria by syntaphilin controls their mobility and affects short-term facilitation', *Cell*, 132(1), pp. 137–148. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.024.
- Kast, D. J. and Dominguez, R. (2015) 'WHAMM links actin assembly via the Arp2/3 complex to autophagy.', *Autophagy*, 11(9), pp. 1702–4. doi: 10.1080/15548627.2015.1073434.
- Kazee, A. M. *et al.* (1993) 'Clinicopathologic correlates in Alzheimer disease: assessment of clinical and pathologic diagnostic criteria.', *Alzheimer disease and associated disorders*, 7(3), pp. 152–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8217089>.
- Kazgan, N. *et al.* (2010) 'Identification of a nuclear export signal in the catalytic subunit of AMP-activated protein kinase.', *Molecular biology of the cell*, 21(19), pp. 3433–42. doi: 10.1091/mbc.E10-04-0347.
- Keil, U. *et al.* (2004) 'Elevated nitric oxide production mediates beta-amyloid-induced mitochondria failure', *Pol.J Pharmacol*, 56(1230–6002 (Print)), pp. 631–634.
- Kerr, J. S. *et al.* (2017) 'Mitophagy and Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Mechanisms.', *Trends in neurosciences*, 40(3), pp. 151–166. doi: 10.1016/j.tins.2017.01.002.
- Kessels, H. W. and Malinow, R. (2009) 'Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior.', *Neuron*, 61(3), pp. 340–50. doi: 10.1016/j.neuron.2009.01.015.
- Kickstein, E. *et al.* (2010) 'Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), pp. 21830–5. doi: 10.1073/pnas.0912793107.
- KIDD, M. (1963) 'Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease.', *Nature*, 197, pp. 192–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14032480>.
- Kienlen-Campard, P. and Octave, J.-N. (2002) 'Correlation between beta-amyloid peptide production and human APP-induced neuronal death.', *Peptides*, 23(7), pp. 1199–204. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12128077>.
- Kim, B. *et al.* (2015) 'Insulin Resistance Prevents AMPK-induced Tau Dephosphorylation through Akt-mediated Increase in AMPK Ser-485 Phosphorylation.', *The Journal of biological chemistry*, 290(31), pp. 19146–57. doi: 10.1074/jbc.M115.636852.
- Kim, D.-M. and Leem, Y.-H. (2016) 'Chronic stress-induced memory deficits are reversed by regular exercise via AMPK-mediated BDNF induction.', *Neuroscience*, 324, pp. 271–85. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.03.019.
- Kim, H.-S. *et al.* (2017) 'Chronological changes in the expression of phosphorylated tau and 5-AMP-activated protein kinase in the brain of senescence-accelerated P8 mice.', *Molecular medicine reports*, 15(5), pp. 3301–3309. doi: 10.3892/mmr.2017.6361.
- Kim, Y. D. *et al.* (2017) 'Pimozide reduces toxic forms of tau in TauC3 mice via 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase-mediated autophagy.', *Journal of neurochemistry*, 142(5), pp. 734–746. doi: 10.1111/jnc.14109.
- Kimberly, W. T. *et al.* (2003) 'Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), pp. 6382–7. doi: 10.1073/pnas.1037392100.
- Kimura, T. *et al.* (2014) 'Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in



the hippocampus', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1633). doi: 10.1098/rstb.2013.0144.

Kinase, P. *et al.* (1994) 'Yeast SNF ' 1 Is Functionally Related to Mammalian AMP-activated', *Biochemistry*, 269, pp. 19509–19515.

Kirichok, Y., Krapivinsky, G. and Clapham, D. E. (2004) 'The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel.', *Nature*, 427(6972), pp. 360–4. doi: 10.1038/nature02246.

Kobilo, T. *et al.* (2014) 'AMPK agonist AICAR improves cognition and motor coordination in young and aged mice.', *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 21(2), pp. 119–26. doi: 10.1101/lm.033332.113.

Kobilo, T., Yuan, C. and van Praag, H. (2011) 'Endurance factors improve hippocampal neurogenesis and spatial memory in mice.', *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 18(2), pp. 103–7. doi: 10.1101/lm.2001611.

Köchli, R. *et al.* (2006) 'Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes.', *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 7(2), pp. 129–45. doi: 10.1111/j.1600-0854.2005.00368.x.

Koffie, R. M. *et al.* (2009) 'Koffie RM, 2009.pdf', pp. 1–6. doi: ?10.1073?pnas.0811698106.

Kopeikina, K. J. *et al.* (2011) 'Tau accumulation causes mitochondrial distribution deficits in neurons in a mouse model of tauopathy and in human Alzheimer's disease brain.', *The American journal of pathology*. Elsevier Inc., 179(4), pp. 2071–82. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.07.004.

Kopeikina, K. J., Hyman, B. T. and Spires-Jones, T. L. (2012) 'Soluble forms of tau are toxic in Alzheimer's disease.', *Translational neuroscience*, 3(3), pp. 223–233. doi: 10.2478/s13380-012-0032-y.

Koppel, J. *et al.* (2016) 'Haloperidol inactivates AMPK and reduces tau phosphorylation in a tau mouse model of Alzheimer's disease.', *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)*, 2(2), pp. 121–130. doi: 10.1016/j.trci.2016.05.003.

## L

Lambert, J. C. *et al.* (2013) 'Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease.', *Nature genetics*, 45(12), pp. 1452–8. doi: 10.1038/ng.2802.

Landrieu, I. *et al.* (2006) 'NMR analysis of a Tau phosphorylation pattern.', *Journal of the American Chemical Society*, 128(11), pp. 3575–83. doi: 10.1021/ja054656+.

LaPointe, N. E. *et al.* (2009) 'The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: implications for filament toxicity.', *Journal of neuroscience research*, 87(2), pp. 440–51. doi: 10.1002/jnr.21850.

Lauretti, E. *et al.* (2017) 'Glucose deficit triggers tau pathology and synaptic dysfunction in a tauopathy mouse model', *Translational Psychiatry*, 7(1). doi: 10.1038/tp.2016.296.

Lauretti, E. and Praticò, D. (2015) 'Glucose deprivation increases tau phosphorylation via P38 mitogen-activated protein kinase', *Aging Cell*, 14(6), pp. 1067–1074. doi: 10.1111/acel.12381.

Lazarov, O. *et al.* (2005) 'Environmental enrichment reduces Abeta levels and amyloid deposition in transgenic mice.', *Cell*, 120(5), pp. 701–13. doi: 10.1016/j.cell.2005.01.015.

- Lee, J. H. *et al.* (2007) 'Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase', *Nature*, 447(7147), pp. 1017–1020. doi: 10.1038/nature05828.
- Lenaz, G. *et al.* (2002) 'Role of mitochondria in oxidative stress and aging.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 959, pp. 199–213.
- Leroy, K. *et al.* (2002) 'The active form of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is associated with granulovacuolar degeneration in neurons in Alzheimers's disease', *Acta Neuropathologica*, 103(2), pp. 91–99. doi: 10.1007/s004010100435.
- Levine, B. and Kroemer, G. (2008) 'Autophagy in the Pathogenesis of Disease', *Cell*, 132(1), pp. 27–42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
- Levy-Lahad, E. *et al.* (1995) 'Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus.', *Science (New York, N.Y.)*, 269(5226), pp. 973–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7638622>.
- Lewis, J. *et al.* (2001) 'Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP.', *Science (New York, N.Y.)*, 293(5534), pp. 1487–91. doi: 10.1126/science.1058189.
- Li, J. *et al.* (2007) 'Neuroprotective effects of adenosine monophosphate-activated protein kinase inhibition and gene deletion in stroke', *Stroke*, 38(11), pp. 2992–2999. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.490904.
- Li, S. *et al.* (2009) 'Soluble oligomers of amyloid Beta protein facilitate hippocampal long-term depression by disrupting neuronal glutamate uptake.', *Neuron*, 62(6), pp. 788–801. doi: 10.1016/j.neuron.2009.05.012.
- Li, S. *et al.* (2011) 'Soluble A $\beta$  oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors.', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(18), pp. 6627–38. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0203-11.2011.
- Lindwall, G. and Cole, R. D. (1984) 'Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly', *The Journal of Biological Chemistry*, 259(8), pp. 5301–5305.
- Liu, D. *et al.* (2017) 'Targeting the HDAC2/HNF-4A/miR-101b/AMPK Pathway Rescues Tauopathy and Dendritic Abnormalities in Alzheimer's Disease.', *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 25(3), pp. 752–764. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.01.018.
- Liu, F. *et al.* (2005) 'Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: Impairment in Alzheimer's disease', *Journal of Biological Chemistry*, 280(3), pp. 1790–1796. doi: 10.1074/jbc.M410775200.
- Liu, Y.-J. *et al.* (2015) 'Aberrant activation of AMP-activated protein kinase contributes to the abnormal distribution of HuR in amyotrophic lateral sclerosis.', *FEBS letters*, 589(4), pp. 432–9. doi: 10.1016/j.febslet.2014.12.029.
- Lizcano, J. M. *et al.* (2004) 'LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1.', *The EMBO journal*, 23(4), pp. 833–43. doi: 10.1038/sj.emboj.7600110.
- Lu, W. *et al.* (2001) 'Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons.', *Neuron*, 29(1), pp. 243–54.
- Luchsinger, J. A. *et al.* (2004) 'Hyperinsulinemia and risk of Alzheimer disease', *Neurology*, 63(7), pp. 1187–1192. doi: 10.1212/01.WNL.0000140292.04932.87.

## M

- Ma, L. *et al.* (2018) 'Caloric restriction can improve learning and memory in C57/BL mice probably via regulation of the AMPK signaling pathway.', *Experimental gerontology*, 102, pp. 28–35. doi: 10.1016/j.exger.2017.11.013.
- Ma, T. *et al.* (2014) 'Inhibition of AMP-activated protein kinase signaling alleviates impairments in hippocampal synaptic plasticity induced by amyloid  $\beta$ .', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(36), pp. 12230–8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1694-14.2014.
- Macdonald, R. *et al.* (2018) 'Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: can mitochondria be targeted therapeutically?', *Biochemical Society transactions*, (July), p. BST20170501. doi: 10.1042/BST20170501.
- Maday, S. and Holzbaur, E. L. F. (2012) 'Autophagosome assembly and cargo capture in the distal axon.', *Autophagy*, 8(5), pp. 858–60. doi: 10.4161/auto.20055.
- Maday, S., Wallace, K. E. and Holzbaur, E. L. F. (2012) 'Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons.', *The Journal of cell biology*, 196(4), pp. 407–17. doi: 10.1083/jcb.201106120.
- Mairet-Coello, G. *et al.* (2013) 'The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of A $\beta$  oligomers through Tau phosphorylation.', *Neuron*, 78(1), pp. 94–108. doi: 10.1016/j.neuron.2013.02.003.
- Majd, S. *et al.* (2017) 'The impact of tau hyperphosphorylation at Ser262 on memory and learning after global brain ischaemia in a rat model of reversible cardiac arrest.', *IBRO reports*, 2, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.ibror.2016.12.002.
- Malaplate-Armand, C. *et al.* (2009) 'Diagnostic biologique de la maladie d'Alzheimer : avancées, limites et perspectives', *Revue Neurologique*, 165(6–7), pp. 511–520. doi: 10.1016/j.neurol.2008.10.015.
- Maloney, J. A. *et al.* (2014) 'Molecular mechanisms of Alzheimer disease protection by the A673T allele of amyloid precursor protein.', *The Journal of biological chemistry*, 289(45), pp. 30990–1000. doi: 10.1074/jbc.M114.589069.
- Manczak, M., Calkins, M. J. and Reddy, P. H. (2011) 'Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage.', *Human molecular genetics*, 20(13), pp. 2495–509. doi: 10.1093/hmg/ddr139.
- Manczak, M. and Reddy, P. H. (2012) 'Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage.', *Human molecular genetics*, 21(11), pp. 2538–47. doi: 10.1093/hmg/dds072.
- Marangos, P. J. *et al.* (no date) 'Adenosinergic modulation of homocysteine-induced seizures in mice.', *Epilepsia*, 31(3), pp. 239–46.
- Martin, S. J., Grimwood, P. D. and Morris, R. G. (2000a) 'Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis.', *Annual review of neuroscience*, 23, pp. 649–711. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.649.
- Martin, S. J., Grimwood, P. D. and Morris, R. G. (2000b) 'Synaptic plasticity and memory: an

- evaluation of the hypothesis.’, *Annual review of neuroscience*, 23, pp. 649–711. doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.649.
- Masliah, E. *et al.* (1990) ‘Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer’s disease.’, *The American Journal of Pathology*, 137(6), pp. 1293–7.
- Matamoros, A. J. and Baas, P. W. (2016) ‘Microtubules in health and degenerative disease of the nervous system.’, *Brain research bulletin*, 126(Pt 3), pp. 217–225. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.06.016.
- Maurer, I., Zierz, S. and Möller, H. J. (no date) ‘A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients.’, *Neurobiology of aging*, 21(3), pp. 455–62.
- McCormack, J. G. and Denton, R. M. (1980) ‘Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Properties of the Ca<sup>2+</sup>-sensitive dehydrogenases within intact uncoupled mitochondria from the white and brown adipose tissue of the rat.’, *The Biochemical journal*, 190(1), pp. 95–105.
- McCullough, L. D. *et al.* (2005) ‘Pharmacological inhibition of AMP-activated protein kinase provides neuroprotection in stroke.’, *The Journal of biological chemistry*, 280(21), pp. 20493–502. doi: 10.1074/jbc.M409985200.
- McKhann, G. *et al.* (1984) ‘Clinical diagnosis of Alzheimer’s disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer’s Disease.’, *Neurology*, 34(7), pp. 939–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6610841>.
- McKhann, G. M. *et al.* (2011) ‘The diagnosis of dementia due to Alzheimer’s disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease.’, *Alzheimer’s & dementia: the journal of the Alzheimer’s Association*, 7(3), pp. 263–9. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.
- Mears, J. A. *et al.* (2011) ‘Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission.’, *Nature structural & molecular biology*, 18(1), pp. 20–6. doi: 10.1038/nsmb.1949.
- Melis, V. *et al.* (2015) ‘Effects of oxidized and reduced forms of methylthionium in two transgenic mouse tauopathy models.’, *Behavioural pharmacology*, 26(4), pp. 353–68. doi: 10.1097/FBP.0000000000000133.
- Minokoshi, Y. *et al.* (2004) ‘AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus’, *Nature*, 428(6982), pp. 569–574. doi: 10.1038/nature02440.
- Miranda, L. *et al.* (2010) ‘AMP-activated protein kinase induces actin cytoskeleton reorganization in epithelial cells.’, *Biochemical and biophysical research communications*, 396(3), pp. 656–61. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.04.151.
- Mitchell, K. I. *et al.* (1997) ‘Posttranslational modifications of the 5’-AMP-activated protein kinase beta1 subunit.’, *The Journal of biological chemistry*, 272(39), pp. 24475–9.
- Miyashita, T. *et al.* (2008) ‘Networks of neurons, networks of genes: an integrated view of memory consolidation.’, *Neurobiology of learning and memory*, 89(3), pp. 269–84. doi: 10.1016/j.nlm.2007.08.012.
- ‘Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity with camp and with protein fractions of rat liver cytosol Zafarul Department’ (1973), 54(4), pp. 1362–1369.
- Molin, P. and Rockwood, K. (2016) ‘Les nouveaux critères de la Maladie d’Alzheimer – Perspective

gériatrique', *Canadian geriatrics journal : CGJ*, 19(2), pp. 74–82. doi: 10.5770/cgj.19.242.

Momcilovic, M., Hong, S. P. and Carlson, M. (2006) 'Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro', *Journal of Biological Chemistry*, 281(35), pp. 25336–25343. doi: 10.1074/jbc.M604399200.

Morishima-Kawashima, M. *et al.* (1995) 'Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau.', *The Journal of biological chemistry*, 270(2), pp. 823–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7822317>.

Morris, R. G. (no date) 'D.O. Hebb: The Organization of Behavior, Wiley: New York; 1949.', *Brain research bulletin*, 50(5–6), p. 437. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10643472>.

Morris, R. G. *et al.* (no date) 'Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5.', *Nature*, 319(6056), pp. 774–6. doi: 10.1038/319774a0.

Mosconi, L., Pupi, A. and De Leon, M. J. (2008) 'Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147(4), pp. 180–95. doi: 10.1196/annals.1427.007.

Mucke, L. and Selkoe, D. J. (2012) 'Neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein: synaptic and network dysfunction.', *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(7), p. a006338. doi: 10.1101/cshperspect.a006338.

Mulkey, R. M. and Malenka, R. C. (1992) 'Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus.', *Neuron*, 9(5), pp. 967–75.

Musi, N. *et al.* (2018a) 'Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain.', *Aging cell*, p. e12840. doi: 10.1111/accel.12840.

## N

Nakano, A. *et al.* (2010) 'AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation.', *Nature cell biology*, 12(6), pp. 583–90. doi: 10.1038/ncb2060.

Neve, R. L. *et al.* (1986) 'Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2.', *Brain research*, 387(3), pp. 271–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3103857>.

Nguyen, P. V., Abel, T. and Kandel, E. R. (1994) 'Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP', *Science*, 265(5175), pp. 1104–1107. doi: 10.1126/science.8066450.

Nixon, R. A. and Yang, D.-S. (2011) 'Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect.', *Neurobiology of disease*, 43(1), pp. 38–45. doi: 10.1016/j.nbd.2011.01.021.

Nixon, R. A., Yang, D.-S. and Lee, J.-H. (2008) 'Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age.', *Autophagy*, 4(5), pp. 590–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497567>.

Noble, W. *et al.* (2013) 'The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases', *Frontiers in Neurology*, 4 JUL(July), pp. 1–11. doi: 10.3389/fneur.2013.00083.

Nordberg, A. (2010) 'Amyloid imaging in early detection of Alzheimer's disease.', *Neuro-*

*degenerative diseases*, 7(1–3), pp. 136–8. doi: 10.1159/000289223.

## O

Oakhill, J. S. *et al.* (2010) ‘ $\beta$ -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK).’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(45), pp. 19237–41. doi: 10.1073/pnas.1009705107.

Oddo, S. *et al.* (2004) ‘Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome.’, *Neuron*, 43(3), pp. 321–32. doi: 10.1016/j.neuron.2004.07.003.

Okamoto, K.-I. *et al.* (2004) ‘Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity.’, *Nature neuroscience*, 7(10), pp. 1104–12. doi: 10.1038/nn1311.

Okamoto, K. and Shaw, J. M. (2005) ‘Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes.’, *Annual review of genetics*, 39, pp. 503–36. doi: 10.1146/annurev.genet.38.072902.093019.

Ou, Z. *et al.* (2018) ‘Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice.’, *Brain, behavior, and immunity*, 69, pp. 351–363. doi: 10.1016/j.bbi.2017.12.009.

Owen, M. R., Doran, E. and Halestrap, A. P. (2000) ‘Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain.’, *The Biochemical journal*, 348 Pt 3, pp. 607–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10839993>.

## P

Palmer, C. S. *et al.* (2011) ‘The regulation of mitochondrial morphology: Intricate mechanisms and dynamic machinery’, *Cellular Signalling*. Elsevier Inc., 23(10), pp. 1534–1545. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.05.021.

Pan, D. A. and Hardie, D. G. (2002) ‘A homologue of AMP-activated protein kinase in *Drosophila melanogaster* is sensitive to AMP and is activated by ATP depletion.’, *The Biochemical journal*, 367(Pt 1), pp. 179–86. doi: 10.1042/BJ20020703.

Parker Jr., W. D. *et al.* (1994) ‘Electron transport chain defects in Alzheimer disease brain’, *Neurology*, 44(June), pp. 1090–1096.

Pascoal, T. A. *et al.* (2017) ‘Amyloid- $\beta$  and hyperphosphorylated tau synergy drives metabolic decline in preclinical Alzheimer’s disease.’, *Molecular psychiatry*, 22(2), pp. 306–311. doi: 10.1038/mp.2016.37.

Pei, J. J. *et al.* (1997) ‘Distribution, levels, and activity of glycogen synthase kinase-3 in the Alzheimer disease brain.’, *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 56(1), pp. 70–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8990130>.

Perera, N. D. *et al.* (2014) ‘Mutant TDP-43 deregulates AMPK activation by PP2A in ALS models.’, *PloS one*, 9(4), p. e95549. doi: 10.1371/journal.pone.0095549.

- Perez-Nievas, B. G. *et al.* (2013) ‘Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer’s pathology.’, *Brain: a journal of neurology*, 136(Pt 8), pp. 2510–26. doi: 10.1093/brain/awt171.
- Pérez, M. *et al.* (2005) ‘Characterization of a double (amyloid precursor protein-tau) transgenic: tau phosphorylation and aggregation.’, *Neuroscience*, 130(2), pp. 339–47. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.09.029.
- Peskind, E. R. *et al.* (no date) ‘Safety and acceptability of the research lumbar puncture.’, *Alzheimer disease and associated disorders*, 19(4), pp. 220–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16327349>.
- Pickford, F. *et al.* (2008) ‘The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice.’, *The Journal of clinical investigation*, 118(6), pp. 2190–9. doi: 10.1172/JCI33585.
- Pickhardt, M. *et al.* (2007) ‘Phenylthiazolyl-hydrazide and its derivatives are potent inhibitors of tau aggregation and toxicity in vitro and in cells.’, *Biochemistry*, 46(35), pp. 10016–23. doi: 10.1021/bi700878g.
- Pilling, A. D. *et al.* (2006) ‘Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in Drosophila motor axons’, *Molecular Biology of the Cell*, 17(4), pp. 2057–2068. doi: 10.1091/mbc.e05-06-0526.
- Planel, E. (2004) ‘Alterations in Glucose Metabolism Induce Hypothermia Leading to Tau Hyperphosphorylation through Differential Inhibition of Kinase and Phosphatase Activities: Implications for Alzheimer’s Disease’, *Journal of Neuroscience*, 24(10), pp. 2401–2411. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5561-03.2004.
- Polekhina, G. *et al.* (2003) ‘AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen.’, *Current biology : CB*, 13(10), pp. 867–71.
- Pooler, A. M. *et al.* (2015) ‘Amyloid accelerates tau propagation and toxicity in a model of early Alzheimer’s disease.’, *Acta neuropathologica communications*, 3, p. 14. doi: 10.1186/s40478-015-0199-x.
- Porteous, W. K. *et al.* (1998) ‘Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion’, *European Journal of Biochemistry*, 257(1), pp. 192–201. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2570192.x.
- Potter, W. B. *et al.* (2010) ‘Metabolic regulation of neuronal plasticity by the energy sensor AMPK.’, *PloS one*, 5(2), p. e8996. doi: 10.1371/journal.pone.0008996.
- Price, J. L. and Morris, J. C. (1999) ‘Tangles and plaques in nondemented aging and “preclinical” Alzheimer’s disease.’, *Annals of neurology*, 45(3), pp. 358–68.

## R

- Ramamurthy, S. *et al.* (2014) ‘AMPK activation regulates neuronal structure in developing hippocampal neurons.’, *Neuroscience*, 259, pp. 13–24. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.048.
- Ramamurthy, S. and Ronnett, G. V (2006) ‘Developing a head for energy sensing: AMP-activated protein kinase as a multifunctional metabolic sensor in the brain.’, *The Journal of physiology*, 574(Pt 1), pp. 85–93. doi: 10.1113/jphysiol.2006.110122.

Rapoport, M. *et al.* (2002) 'Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), pp. 6364–6369. doi: 10.1073/pnas.092136199.

Reddy, P. H. (2008) 'Mitochondrial medicine for aging and neurodegenerative diseases', *NeuroMolecular Medicine*, 10(4), pp. 291–315. doi: 10.1007/s12017-008-8044-z.

Reddy, P. H. and Beal, M. F. (2008) 'Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease', *Trends in Molecular Medicine*, 14(2), pp. 45–53. doi: 10.1016/j.molmed.2007.12.002.

Regan, P. *et al.* (2015) 'Tau phosphorylation at serine 396 residue is required for hippocampal LTD', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(12), pp. 4804–4812. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2842-14.2015.

Reisberg, B. (1984) 'Alzheimer's disease. Stages of cognitive decline.', *The American journal of nursing*, 84(2), pp. 225–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6559541>.

Renner, M. *et al.* (2010) 'Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5.', *Neuron*, 66(5), pp. 739–54. doi: 10.1016/j.neuron.2010.04.029.

Reynolds, I. J. and Hastings, T. G. (1995) 'Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(5 Pt 1), pp. 3318–3327. doi: 10.1016/j.clim.2007.08.003.

Rizzo, M. *et al.* (2000) 'Visual attention impairments in Alzheimer's disease.', *Neurology*, 54(10), pp. 1954–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10822436>.

Rotty, J. D., Wu, C. and Bear, J. E. (2013) 'New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(1), pp. 7–12. doi: 10.1038/nrm3492.

## S

Sadowski, M. *et al.* (2004) 'Amyloid- $\beta$  deposition is associated with decreased hippocampal glucose metabolism and spatial memory impairment in APP/PS1 mice', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63(5), pp. 418–428. doi: 10.1093/jnen/63.5.418.

Saint-Aubert, L. *et al.* (2017) 'Tau PET imaging: present and future directions.', *Molecular neurodegeneration*, 12(1), p. 19. doi: 10.1186/s13024-017-0162-3.

Samuel, M. A. *et al.* (2014) 'LKB1 and AMPK regulate synaptic remodeling in old age', *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 17(9), pp. 1190–1197. doi: 10.1038/nn.3772.

Sanders, M. J. *et al.* (2007) 'Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family.', *The Journal of biological chemistry*, 282(45), pp. 32539–48. doi: 10.1074/jbc.M706543200.

Sanders, M. J. *et al.* (2007) 'Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade', *Biochemical Journal*, 403(1), pp. 139–148. doi: 10.1042/BJ20061520.

Sanz, P., Rubio, T. and Garcia-Gimeno, M. A. (2013) 'AMPK $\beta$  subunits: more than just a scaffold in the formation of AMPK complex.', *The FEBS journal*, 280(16), pp. 3723–33. doi: 10.1111/febs.12364.



- Scheff, S. W. *et al.* (2006) 'Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment.', *Neurobiology of aging*, 27(10), pp. 1372–84. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.012.
- Schellenberg, G. D. *et al.* (1992) 'Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14.', *Science (New York, N.Y.)*, 258(5082), pp. 668–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1411576>.
- Schindowski, K. *et al.* (2006) 'Alzheimer's disease-like tau neuropathology leads to memory deficits and loss of functional synapses in a novel mutated tau transgenic mouse without any motor deficits.', *The American journal of pathology*, 169(2), pp. 599–616. doi: 10.2353/ajpath.2006.060002.
- Schneider, A. *et al.* (1999) 'Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments', *Biochemistry*, 38(12), pp. 3549–3558. doi: 10.1021/bi981874p.
- Seab, J. P. *et al.* (1988) 'Quantitative NMR measurements of hippocampal atrophy in Alzheimer's disease.', *Magnetic resonance in medicine*, 8(2), pp. 200–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3210957>.
- Selkoe, D. J. (2002) 'Alzheimer's disease is a synaptic failure.', *Science (New York, N.Y.)*, 298(5594), pp. 789–91. doi: 10.1126/science.1074069.
- Sergeant, N. *et al.* (2008) 'Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders', *Expert Review of Proteomics*, 5(2), pp. 207–224. doi: 10.1586/14789450.5.2.207.
- Sergeant, N., Delacourte, A. and Buée, L. (2005) 'Tau protein as a differential biomarker of tauopathies', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1739(2), pp. 179–197. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.06.020.
- Seshadri, S. *et al.* (2010) 'Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease.', *JAMA*, 303(18), pp. 1832–40. doi: 10.1001/jama.2010.574.
- Shankar, G. M. *et al.* (2007) 'Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway', *Journal of Neuroscience*, 27(11), pp. 2866–2875. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4970-06.2007.
- Shankar, G. M. *et al.* (2008) 'Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory.', *Nature medicine*, 14(8), pp. 837–42. doi: 10.1038/nm1782.
- Sherrington, R. *et al.* (1995) 'Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease.', *Nature*, 375(6534), pp. 754–60. doi: 10.1038/375754a0.
- Shi, S. H. *et al.* (1999) 'Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation.', *Science (New York, N.Y.)*, 284(5421), pp. 1811–6.
- Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. and Ames, B. N. (1994) 'Oxidative damage and mitochondrial decay in aging.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23), pp. 10771–8.
- Snyder, E. M. *et al.* (2005) 'Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-β', *Nature Neuroscience*, 8(8), pp. 1051–1058. doi: 10.1038/nm1503.
- Spasic, M. R., Callaerts, P. and Norga, K. K. (2008) 'Drosophila alicorn Is a Neuronal Maintenance Factor Protecting against Activity-Induced Retinal Degeneration', *Journal of Neuroscience*, 28(25), pp. 6419–6429. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1646-08.2008.
- Starkov, A. A., Polster, B. M. and Fiskum, G. (2002) 'Regulation of hydrogen peroxide production by

brain mitochondria by calcium and Bax', *Journal of Neurochemistry*, 83(1), pp. 220–228. doi: 10.1046/j.1471-4159.2002.01153.x.

Stern, Y. (2012) 'Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease.', *The Lancet. Neurology*, 11(11), pp. 1006–12. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70191-6.

Stoothoff, W. H. and Johnson, G. V. W. (2005) 'Tau phosphorylation: Physiological and pathological consequences', *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1739(2), pp. 280–297. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.06.017.

Strittmatter, W. J. *et al.* (1993) 'Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), pp. 1977–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8446617>.

De Strooper, B. and Annaert, W. (2010) 'Novel research horizons for presenilins and  $\gamma$ -secretases in cell biology and disease.', *Annual review of cell and developmental biology*, 26, pp. 235–60. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104117.

Sun, T. *et al.* (2013) 'Motile axonal mitochondria contribute to the variability of presynaptic strength', *Cell Reports*. The Authors, 4(3), pp. 413–419. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.040.

Swerdlow, R. H. and Khan, S. M. (2004) 'A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease.', *Medical hypotheses*, 63(1), pp. 8–20. doi: 10.1016/j.mehy.2003.12.045.

## T

Takasugi, N. *et al.* (2003) 'The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex.', *Nature*, 422(6930), pp. 438–41. doi: 10.1038/nature01506.

Tanaka, Y. *et al.* (1998) 'Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria.', *Cell*, 93(7), pp. 1147–58.

Tashiro, K. *et al.* (1997) 'Somatodendritic localization of phosphorylated tau in neonatal and adult rat cerebral cortex', *Neuroreport*, 8(12), pp. 2797–2801.

Terry, R. D. *et al.* (1991) 'Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment.', *Annals of neurology*, 30(4), pp. 572–80. doi: 10.1002/ana.410300410.

Teune, L. K. *et al.* (2010) 'Typical cerebral metabolic patterns in neurodegenerative brain diseases.', *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 25(14), pp. 2395–404. doi: 10.1002/mds.23291.

Teune, L. K. *et al.* (2010) 'Typical cerebral metabolic patterns in neurodegenerative brain diseases', *Movement Disorders*, 25(14), pp. 2395–2404. doi: 10.1002/mds.23291.

Thal, D. R. *et al.* (2002) 'Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD.', *Neurology*, 58(12), pp. 1791–800. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12084879>.

Thal, D. R. *et al.* (2015) 'Neuropathology and biochemistry of A $\beta$  and its aggregates in Alzheimer's disease.', *Acta neuropathologica*, 129(2), pp. 167–82. doi: 10.1007/s00401-014-1375-y.

Thomson, D. M. *et al.* (2011) 'Phosphorylation of VASP by AMPK alters actin binding and occurs at

a novel site.’, *Biochemical and biophysical research communications*. Elsevier Inc., 414(1), pp. 215–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.059.

Thornton, C. *et al.* (2011) ‘AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid  $\beta$ -peptide exposure’, *Biochemical Journal*, 434(3), pp. 503–512. doi: 10.1042/BJ20101485.

Tschäpe, J. A. *et al.* (2002) ‘The neurodegeneration mutant löchrig interferes with cholesterol homeostasis and Appl processing’, *EMBO Journal*, 21(23), pp. 6367–6376. doi: 10.1093/emboj/cdf636.

Tsien, J. Z., Huerta, P. T. and Tonegawa, S. (1996) ‘The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory.’, *Cell*, 87(7), pp. 1327–38.

Turnley, A. M. *et al.* (1999) ‘Cellular distribution and developmental expression of AMP-activated protein kinase isoforms in mouse central nervous system.’, *Journal of neurochemistry*, 72(4), pp. 1707–16.

Twig, G. *et al.* (2008) ‘Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy’, *EMBO Journal*, 27(2), pp. 433–446. doi: 10.1038/sj.emboj.7601963.

## V

Vasconcelos, B. *et al.* (2016) ‘Heterotypic seeding of Tau fibrillization by pre-aggregated A $\beta$  provides potent seeds for prion-like seeding and propagation of Tau-pathology in vivo.’, *Acta neuropathologica*, 131(4), pp. 549–69. doi: 10.1007/s00401-015-1525-x.

Velliquette, R. A. (2005) ‘Energy Inhibition Elevates  $\beta$ -Secretase Levels and Activity and Is Potentially Amyloidogenic in APP Transgenic Mice: Possible Early Events in Alzheimer’s Disease Pathogenesis’, *Journal of Neuroscience*, 25(47), pp. 10874–10883. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2350-05.2005.

Vickers, C. A., Dickson, K. S. and Wyllie, D. J. A. (2005) ‘Induction and maintenance of late-phase long-term potentiation in isolated dendrites of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones’, *Journal of Physiology*, 568(3), pp. 803–813. doi: 10.1113/jphysiol.2005.092924.

Villena, J. A. *et al.* (2004) ‘Induced adiposity and adipocyte hypertrophy in mice lacking the AMP-activated protein kinase- $\alpha$ 2 subunit.’, *Diabetes*, 53(9), pp. 2242–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331533>.

Vingtdeux, V. *et al.* (2010) ‘AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism.’, *The Journal of biological chemistry*, 285(12), pp. 9100–13. doi: 10.1074/jbc.M109.060061.

Vingtdeux, V., Davies, P., *et al.* (2011) ‘AMPK is abnormally activated in tangle-and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer’s disease and other tauopathies’, *Acta Neuropathologica*, 121(3), pp. 337–349. doi: 10.1007/s00401-010-0759-x.

Vingtdeux, V., Chandakkar, P., *et al.* (2011) ‘Novel synthetic small-molecule activators of AMPK as enhancers of autophagy and amyloid- $\beta$  peptide degradation.’, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(1), pp. 219–31. doi: 10.1096/fj.10-167361.

Viollet, B. *et al.* (2003) ‘Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models.’, *Biochemical Society transactions*, 31(Pt 1), pp. 216–9. doi: 10.1042/

Viollet, B. *et al.* (2003) ‘The AMP-activated protein kinase alpha2 catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity.’, *The Journal of clinical investigation*, 111(1), pp. 91–8. doi: 10.1172/JCI16567.

Viollet, B. *et al.* (2010) ‘AMPK inhibition in health and disease.’, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 45(4), pp. 276–95. doi: 10.3109/10409238.2010.488215.

## W

Walker, F. O. (2007) ‘Huntington’s disease.’, *Lancet (London, England)*, 369(9557), pp. 218–28. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60111-1.

Walsh, D. M. *et al.* (2002) ‘Naturally secreted oligomers of amyloid  $\beta$  protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo’, *Nature*, 416(6880), pp. 535–539. doi: 10.1038/416535a.

Wang, Q. *et al.* (2004) ‘Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as a’, *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(13), pp. 3370–8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1633-03.2004.

Wang, W. *et al.* (2003) ‘Increased AMP:ATP ratio and AMP-activated protein kinase activity during cellular senescence linked to reduced HuR function.’, *The Journal of biological chemistry*, 278(29), pp. 27016–23. doi: 10.1074/jbc.M300318200.

Wang, X. *et al.* (2009a) ‘Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer’s disease.’, *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(28), pp. 9090–103. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1357-09.2009.

Wang, X. *et al.* (2009b) ‘Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer’s disease.’, *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(28), pp. 9090–103. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1357-09.2009.

Wang, Y. *et al.* (2010) ‘Synergy and antagonism of macroautophagy and chaperone-mediated autophagy in a cell model of pathological tau aggregation.’, *Autophagy*, 6(1), pp. 182–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20023429>.

Wang, Y. and Mandelkow, E. (2016) ‘Tau in physiology and pathology’, *Nature Reviews Neuroscience*, 17(1), pp. 5–21. doi: 10.1038/nrn.2015.1.

Warden, S. M. *et al.* (2001) ‘Post-translational modifications of the beta-1 subunit of AMP-activated protein kinase affect enzyme activity and cellular localization.’, *The Biochemical journal*, 354(Pt 2), pp. 275–83.

Weingarten, M. D. *et al.* (1975) ‘A protein factor essential for microtubule assembly’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), pp. 1858–1862.

Whitlock, J. R. *et al.* (2006) ‘Learning induces long-term potentiation in the hippocampus.’, *Science (New York, N.Y.)*, 313(5790), pp. 1093–7. doi: 10.1126/science.1128134.

Williams, T. *et al.* (2011) ‘AMP-activated protein kinase (AMPK) activity is not required for neuronal development but regulates axogenesis during metabolic stress’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14), pp. 5849–5854. doi: 10.1073/pnas.1013660108.

Winkler, E. A. *et al.* (2015) ‘GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer’s disease vasculo-neuronal

dysfunction and degeneration.’, *Nature neuroscience*, 18(4), pp. 521–530. doi: 10.1038/nn.3966.

Witman, G. B. *et al.* (1976) ‘Tubulin requires tau for growth onto microtubule initiating sites’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(11), pp. 4070–4074.

Won, J.-S. *et al.* (2010) ‘Involvement of AMP-activated-protein-kinase (AMPK) in neuronal amyloidogenesis.’, *Biochemical and biophysical research communications*, 399(4), pp. 487–91. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.081.

Woods, A. *et al.* (2003) ‘LKB1 Is the Upstream Kinase in the AMP-Activated Protein Kinase Cascade’, *Current Biology*, 13(22), pp. 2004–2008. doi: 10.1016/j.cub.2003.10.031.

## X

Xiao, B. *et al.* (2007) ‘Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase.’, *Nature*, 449(7161), pp. 496–500. doi: 10.1038/nature06161.

Xiao, B. *et al.* (2013) ‘Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators.’, *Nature communications*, 4, p. 3017. doi: 10.1038/ncomms4017.

Xin, F.-J. *et al.* (2013) ‘Coordinated regulation of AMPK activity by multiple elements in the  $\alpha$ -subunit.’, *Cell research*, 23(10), pp. 1237–40. doi: 10.1038/cr.2013.121.

Xu, Y. *et al.* (2014) ‘Activation of AMPK and inactivation of Akt result in suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways leading to neuronal cell death in in vitro models of Parkinson’s disease.’, *Cellular signalling*, 26(8), pp. 1680–1689. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.04.009.

## Y

Yamaguchi, H. *et al.* (1992) ‘Neuropathologica A {[ a Ultrastructural localization of Alzheimer amyloid’, pp. 15–22.

Yavari, A. *et al.* (2016) ‘Chronic Activation of  $\gamma$ 2 AMPK Induces Obesity and Reduces  $\beta$  Cell Function.’, *Cell metabolism*, 23(5), pp. 821–36. doi: 10.1016/j.cmet.2016.04.003.

Yoon, S. O. *et al.* (2012) ‘JNK3 perpetuates metabolic stress induced by A $\beta$  peptides.’, *Neuron*, 75(5), pp. 824–37. doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.024.

Youle, R. J. and van der Bliek, A. M. (2012a) ‘Mitochondrial fission, fusion, and stress.’, *Science (New York, N.Y.)*, 337(6098), pp. 1062–5. doi: 10.1126/science.1219855.

Youle, R. J. and Narendra, D. P. (2011) ‘Mechanisms of mitophagy’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), pp. 9–14. doi: 10.1038/nrm3028.

## Z

Zarei, S. *et al.* (2015) ‘A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis.’, *Surgical neurology international*, 6, p. 171. doi: 10.4103/2152-7806.169561.

- Zhang, B. *et al.* (2013) 'Identification and functional analysis of a novel PRKAG2 mutation responsible for Chinese PRKAG2 cardiac syndrome reveal an important role of non-CBS domains in regulating the AMPK pathway.', *Journal of cardiology*, 62(4), pp. 241–8. doi: 10.1016/j.jjcc.2013.04.010.
- Zhang, C.-S. *et al.* (2014) 'The lysosomal v-ATPase-Ragulator complex is a common activator for AMPK and mTORC1, acting as a switch between catabolism and anabolism.', *Cell metabolism*, 20(3), pp. 526–40. doi: 10.1016/j.cmet.2014.06.014.
- Zhang, C.-S. *et al.* (2016) 'Metformin Activates AMPK through the Lysosomal Pathway.', *Cell metabolism*, 24(4), pp. 521–522. doi: 10.1016/j.cmet.2016.09.003.
- Zhang, H. *et al.* (2017) 'Berberine modulates amyloid- $\beta$  peptide generation by activating AMP-activated protein kinase.', *Neuropharmacology*, 125, pp. 408–417. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.08.013.
- Zhao, D., Watson, J. B. and Xie, C.-W. (2004) 'Amyloid beta prevents activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and AMPA receptor phosphorylation during hippocampal long-term potentiation.', *Journal of neurophysiology*, 92(5), pp. 2853–8. doi: 10.1152/jn.00485.2004.
- Zhou, G. *et al.* (2001) 'Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action.', *The Journal of clinical investigation*, 108(8), pp. 1167–74. doi: 10.1172/JCI13505.
- Zu, Y. *et al.* (2010) 'SIRT1 promotes proliferation and prevents senescence through targeting LKB1 in primary porcine aortic endothelial cells.', *Circulation research*, 106(8), pp. 1384–93. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.215483.
- Zwerschke, W. *et al.* (2003) 'Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence.', *The Biochemical journal*, 376(Pt 2), pp. 403–11. doi: 10.1042/BJ20030816.



## *Annexes*





## **Annexe 1 : Revue "Tau as a therapeutic target"**

Revue en cours de préparation en co-auteurs avec les doctorants et post-doctorants de l'équipe "Alzheimer et Tauopathies" dirigée par Luc Buée.

### **Tau as a therapeutic target**

Marie Albert\*, Kevin Carvalho\*, Clément Danis\*, Manon Domise\*, Caroline Evrard\*, Melissa Gilles\*, Victoria Gomez-Murcia\*, Mégane Homa\*, Coline Leghay\*, Claudia Marinangeli\*, Claire Schirmer\*, Khalid Iqbal<sup>1</sup>, Luc Buee

University of Lille, Inserm, CHU-Lille, UMR-S 1172, Alzheimer & Tauopathies, LabEx DISTALZ, F-59000 Lille, France

\*equal contribution

<sup>1</sup>Current address: Department of Neurochemistry, Inge Grundke-Iqbal Research Floor, New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Staten Island, New York 10314, USA; email: [khalid.iqbal.ibr@gmail.com](mailto:khalid.iqbal.ibr@gmail.com)

## **Abstract**

Tau pathology is a hallmark of Alzheimer's disease (AD) and a family of related conditions called Tauopathies. The density of Tau lesions, which are made up of abnormally hyperphosphorylated proteins, directly correlates with the degree of cognitive impairment in AD and preclinical studies have shown the therapeutic potential of targeting Tau pathology in experimental animal models. Currently, there is an increasing interest, both in academia and in industry, to understand Tau-based mechanisms and therapeutic strategies. Tau is the major microtubule associated protein of a normal neuron where it promotes the assembly of tubulin into microtubules and maintains their structure. In addition to cytoplasm, Tau is also known to exist in various cellular compartments where it is involved in different functions. This review will summarize various functions of Tau beyond microtubule assembly, its role in Alzheimer's disease and related conditions, the seeding and the spread of Tau pathology and its potential as a therapeutic target, with an ending focus on current Tau immunotherapy approaches and human clinical trials.

## **Introduction**

### **Alzheimer's Disease**

#### *Epidemiology*

Cerebral aging is a major public health problem in modern society. With improvement in modern medicine, especially increasing use of preventive care, lifespan will continue to increase. However, aging is the main risk factor for dementia and since life expectancy increases, the number of people with dementia will follow. Alzheimer's disease (AD) is the most important cause of dementia in the elderly. At age 65, around 3% of people suffers from AD and this prevalence doubles every five years thereafter, reaching almost 50% at 85 years old. Alzheimer's Disease International estimates that 46.8 million people worldwide were living with dementia in 2015 and this number is expected to reach 131.5 million in 2050, unless a treatment to prevent, inhibit or cure this disease is found (Prince et al. 2016). The magnitude of this problem has also created an enormous economic burden to the society. The total estimated worldwide cost of dementia is US\$818 billion and it will become a trillion dollars disease by 2018.

#### *Histopathology*

AD is neuropathologically characterized by extracellular deposits of  $\beta$ -amyloid in the brain parenchyma and the cerebral blood vessels and also by intraneuronal accumulation of paired helical filaments in neuronal cell body as neurofibrillary tangles, in neurites as neuropil threads and in dystrophic neurites that surround the amyloid plaque core. The density of the neurofibrillary pathology but not the amyloid one correlates with the clinical phenotype of the dementia (Alafuzoff et al. 1987; Grundke-Iqbal et al. 1986; Arriagada et al. 1992). This has been recently confirmed with PET Tau tracers (Maass et al. 2017). In fact, about 30% of normal aged people have as many amyloid plaques in their brains as in typical cases of AD. Plaques in normal aged cases lack the dystrophic neurites with neurofibrillary pathology surrounding the  $\beta$ -amyloid plaque core.

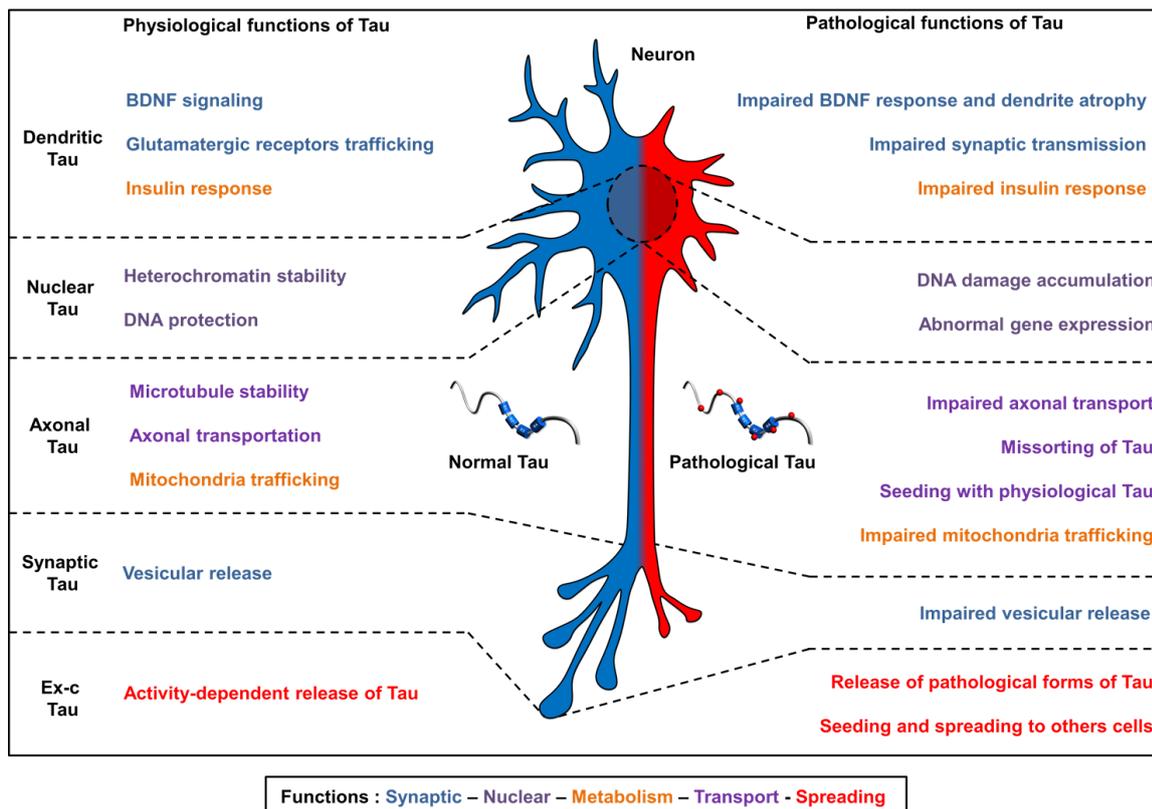
AD paired helical filaments are made up of microtubule associated protein Tau (Brion et al. 1985; Delacourte and Defossez 1986) in an abnormally hyperphosphorylated state (Grundke-Iqbal et al. 1986). Tau protein is encoded by a single gene *MAPT* which is located on chromosome 17. Tau protein is expressed in mature human brain in six isoforms generated by alternative splicing of its pre-mRNA (M. Goedert et al. 1989). These six isoforms are generated by splicing of exon 10 that codes for microtubule binding repeat (R) 2 and exons 2 and 3 which code for amino-terminal inserts 1 and 2, respectively. In normal human brain the 3R and 4R Tau occur in 1:1 ratio.

### **Tau Pathology**

Tau pathology, which in addition to AD, is a hallmark of a family of neurodegenerative diseases, called Tauopathies, is, without any exception, made up of the hyperphosphorylated protein (Grundke-Iqbal et al. 1986). Unlike AD and Down's syndrome, which are characterized by the presence of both amyloid plaques and neurofibrillary tangles, Tauopathies [which include fronto-temporal lobar degeneration (Maria Grazia Spillantini et al. 1998), primary age-related Tauopathy, PART (Crary et al. 2014; Charles Duyckaerts et al. 2015), progressive supranuclear palsy (Boxer et al. 2017), corticobasal degeneration, Pick's disease (Buée Scherrer et al. 1996), argyrophilic grain disease, postencephalitic parkinsonism (Hof et al. 1992; Buée-Scherrer et al. 1997) and Guam Parkinsonism dementia complex] (Hof et al. 1994; Buée-Scherrer et al. 1995) show Tau pathology in the absence of amyloid pathology. In fact, in some Tauopathies, this ratio is altered, e.g. while progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration are mostly 4R Tauopathies (N. Sergeant, Watzel, and Delacourte 1999), Pick's bodies are made of only 3R Tau in Pick's disease (Buée Scherrer et al. 1996). Mutations in Tau gene that alter the 1:1 ratio of 3R and 4R cause tauopathies. Several missense mutations in *MAPT* cause frontotemporal lobar degeneration (M. G. Spillantini, Bird, and Ghetti 1998; Maria Grazia Spillantini et al. 1998). Independently of etiology, whether disease is caused by a Tau mutation as in familial cases of Tauopathies or no Tau mutation as in AD, Tau pathology is made up of the hyperphosphorylated protein. Thus, Tau pathology can be both primary as in familial cases of frontotemporal lobar degeneration and secondary as in AD. However, in both cases Tau pathology is strongly linked to cognitive impairment and hence a potential therapeutic target. Mechanisms of Tau pathology, especially involving hyperphosphorylation and truncation of Tau have been the subject of several recent review articles (Maria Grazia Spillantini and Goedert 2013; Khalid Iqbal, Liu, and Gong 2016; Y. Wang and Mandelkow 2016; Holtzman et al. 2016). In this article, we will review various functions of Tau that could be compromised in AD and related Tauopathies, possible therapeutic strategies and their pros and cons, especially Tau immunotherapy which is at present a major focus of the field.

### **Various functions of Tau**

Tau is now well known as a microtubule-associated protein in neurons (Weingarten et al. 1975; Cleveland, Hwo, and Kirschner 1977; Drechsel et al. 1992; Trinczek et al. 1995). However, Tau presents various functions, depending on its localization inside and outside neurons, and these functions are altered under pathophysiological states (Figure 1). Tau is widely subject to post-translational modifications such as phosphorylation, acetylation, methylation, isomerization, glycation, nitration, ubiquitination, sumoylation, O-N- acetyl-glucosaminylation (O-Glc-Nac) and truncation.



**Figure 1:** Various functions of Tau. Besides stabilization of microtubules, Tau is implicated in following functions: synaptic activity (signalling pathways, synaptic transmission, vesicular release), nuclear stability (DNA protection and heterochromatin stability), metabolism (insulin response and mitochondria trafficking) and extracellular functions still to be uncovered. In pathological conditions, there is an alteration of these functions that could explain many of the deficits observed in human Tauopathies and their animal models.

Some of them, for instance truncation, glycation and polyamination exist under pathological states only while others, such as phosphorylation, glycosylation and nitration, which are fundamental for physiological functions of Tau, are deregulated in Tauopathies. In fact, in Tauopathies, Tau proteins are hyper and abnormally phosphorylated, and could have role in their aggregation (A. Alonso et al. 2001; F. Liu et al. 2007). These modifications induce changes of Tau functions. Indeed, it leads to somatodendritic relocalization of Tau (Tashiro et al. 1997; X. Li et al. 2011), destabilization of microtubule network (A. C. Alonso et al. 1994; B. Li et al. 2007), axonal transport deficits (Cuchillo-Ibanez et al. 2008) and breakdown of neuronal polarity (X. Li et al. 2011). Synaptic dysfunctions are also identified as axonal transport deficits, perturbations of recruitments of mitochondria to synapses, synapse depotentiation and spine collapse (Spires-Jones and Hyman 2014). Tau deficiency alters synaptic plasticity, suggesting its potential role in memory mechanism (Ahmed et al. 2014).

## **Tau as cytosolic MAP**

Microtubule Associated Protein (MAP) Tau was first identified from porcine brain extracts as an essential factor for assembling microtubules in 1975 (Weingarten et al. 1975; Witman et al. 1976). It is interesting to note that Tau was isolated from Alzheimer neurofibrillary tangles as a PHF protein in 1974 (K. Iqbal et al. 1974). It was not until 1986 that the PHF protein and the microtubule associated protein Tau were associated as one and the same (Grundke-Iqbal et al. 1986).

Microtubules are present in all cell types but are described as being particularly stable in neurons (Seitz-Tutter, Langford, and Weiss 1988). In fact, neurons are highly differentiated cells and microtubules are critical to the axon as they are required for axo-plasmic transport; microtubules enable axons to retract and expand to create neural circuits (K. M. Yamada, Spooner, and Wessells 1970). Tau can bind to the outside (Santarella et al. 2004), and inside of microtubules (Kar et al. 2003). This ability to bind microtubules depends on the C-terminal region of Tau named Microtubule Binding Domain (MBD) (Gustke et al. 1994). This region contains three (3R isoforms) or four (4R isoforms) repeating units named R1, R2, R3 and R4 corresponding to highly conserved sequences of the MAP (M. Goedert et al. 1989). These motifs are directly involved in the Tau binding to microtubules (Goode et al. 1997; Kolarova et al. 2012) and separated by inter-repeats, iR1, iR2 and iR3, which also play a role in microtubule binding affinity (Goode and Feinstein, J. Cell. Biol., 1994). In fact, it has been shown that the absence of iR1 decreases the affinity of Tau for microtubules. Probably because of an extra iR, the 4R isoforms show a greater affinity for microtubules than the 3R isoforms (Panda et al. 2003). This binding mechanism remains unclear but the studies show ionic binding, the repeating units are positively charged whereas the microtubules are negatively charged (Jho et al. 2010; Kadavath et al. 2015). Because, the N-terminal part of Tau is charged negatively, the protein is not able to bind microtubules but is involved in the spacing between microtubules (Frappier et al. 1994) and consequently regulates the axonal diameter (Boyne et al. 1995).

Numerous *in vitro* and *in cellulo* mechanistic studies have shown that Tau increases the rate of microtubule polymerization (Witman et al. 1976). Indeed, the length of polymerization of an isolated microtubule is nine times higher when Tau is present (Drechsel et al. 1992). Thus, Tau protein is directly involved in the microtubular dynamic and a deregulation leads to various cellular consequences. Cleveland's work in 1977 showed that Tau may be phosphorylated (Cleveland, Hwo, and Kirschner 1977) and the phosphorylation can play a role in Tau functions notably in the microtubule dynamic. Early studies have shown that in its non-hyperphosphorylated form, Tau promotes polymerization of tubulin into microtubules better than when it is hyperphosphorylated (Lindwall and Cole 1984; A. C. Alonso et al. 1994). Subsequently, Tau phosphorylation sites involved in microtubule binding were identified. Indeed, the phosphorylation of Ser262, Ser293, Ser324 and Ser356 residues located in the repeat units results in inhibition of the Tau binding to microtubules

(Biernat et al. 1993; Drewes et al. 1995, 1997; Fischer et al. 2009). Thr231 and Ser235 residues located in the proline rich domain, which when phosphorylated result in a decrease in Tau affinity for microtubules (Sengupta et al. 1998; Hamdane et al. 2003; Cho and Johnson 2004). Indeed, phosphorylation neutralizes the positive charge of C-terminal part of Tau, alters the conformation and leads to the detachment of Tau from microtubules. In pathological conditions, as in Tauopathies, the association of Tau with microtubules is disrupted because Tau is abnormally hyperphosphorylated (Grundke-Iqbal et al. 1986; K. Iqbal et al. 1986; Jho et al. 2010).

### **Tau as a nuclear protein**

Since almost thirty years, Tau protein is also known to localise in nucleus where it plays many unclear roles (Metuzals et al. 1988; Loomis et al. 1990). Nuclear Tau protein has been reported in a large variety of cells including neuronal and non neuronal cells in rodent or primate cell lines and also in mouse and human brains (Maina, Al-Hilaly, and Serpell 2016). The major Tau isoform which localises in the nucleus is 1N4R although, other Tau isoforms are also present (C. Liu and Götz 2013). Nuclear Tau is essentially non-phosphorylated but the existence of both phosphorylated and non-phosphorylated Tau has been reported in the nucleus (Guo, Noble, and Hanger 2017). After hyperthermic stress, cytoplasmic dephosphorylated Tau translocates to the nucleus suggesting that Tau phosphorylation state could mediate its shuttling between these two compartments (A. D. Alonso et al. 2010; Sultan et al. 2011). Tau is also located in the nucleolus where it is involved in the processing of ribosomal RNA. Indeed, a loss of Tau induces a decrease of ribosomal RNA synthesis and also affects ribosomal DNA stability (Bou Samra et al. 2017).

*In vitro* studies have shown that purified Tau can bind nuclear DNA (Hua and He 2003; Y. Wei et al. 2008). The protein domains involved in the interaction between Tau and DNA have been characterized in several studies and shown that Tau binds to the AT-rich minor groove of DNA through its proline-rich and microtubule binding domains (Qi et al. 2015; Rossi et al. 2013). Other studies demonstrate that Tau specifically binds to, AT-rich pericentromeric satellite DNA sequences (Sjoberg 2006). Tau displays many phosphorylated sites in this location and reports indicate that Tau-DNA interaction is strongly reduced when Tau is phosphorylated (Qi et al. 2015). Studies performed in Tau-deficient mice (KO-Tau) have revealed that Tau plays a major role in DNA and RNA protection under physiological and hyperthermic conditions (Sultan et al. 2011; Violet et al. 2014). Interestingly, hyperphosphorylation of Tau prevents its protecting effect of DNA from damages in N2A cell lines (Lu et al. 2013) and in the brain of a mouse model of Tauopathies (Thy-Tau22). In this Thy-Tau22 mouse model, hyperthermia-induced Tau oligomers correlate with accumulation of nucleic acid damage. It seems that Tau oligomerization process prevents DNA protective function of soluble Tau monomers (Violet et al. 2015). A recent study in HEK293 cells has demonstrated that



hyperphosphorylation of nuclear Tau at Thr205 activates the Ca<sup>2+</sup>/CaMKIV pathway which aggravates, in turn, Tau phosphorylation and thus leads to neurodegeneration (Y. P. Wei et al. 2018).

The involvement of nuclear Tau in the regulation of gene expression is still unclear. Few micro array studies have shown differences in transcripts between wild type and KO-Tau mice (Oyama et al. 2004). A study reported the involvement of Tau in BAF-57 expression which is a protein of the chromatin remodelling SWI/SNF complex (Gómez de Barreda et al. 2010). Tau can bind to the histone deacetylase HDAC6, a cytosolic enzyme which is involved in tubulin-deacetylase. Tau-HDAC6 interaction leads to the inhibition of the latter and thus to the acetylation of its targets (Perez et al. 2009). Likewise, due to its ability to bind HDAC6 in cytosol, nuclear Tau could also regulate histone acetylase/deacetylase activity and thus modify the expression of genes. Furthermore, the effect of nuclear Tau on gene expression could be direct through DNA interaction or indirect through the interaction of Tau with proteins involved in gene expression regulation.

In nucleus, Tau binds to and colocalizes with pericentromeric heterochromatin (PCH), a highly repeated major satellite DNA sequence rich in histone 3 trimethylated on lysine 9 (H3K9me3) and heterochromatin protein 1 alpha (HP1alpha), in primary neuronal cultures from wild-type mice (Mansuroglu et al. 2016). Interestingly, in neurons of Tau deficient mice the distribution of H3K9me3 and HP1alpha is disrupted, demonstrating a new physiological function of Tau regulating neuronal PCH integrity which is impaired in AD (Mansuroglu et al. 2016). Importantly, several studies demonstrated alteration of epigenetic markers in AD such as, cytoplasmic accumulation of histone 3 trimethylation on lysine 4 (H3K4me3) in human brain AD (Mastroeni et al. 2015). Alterations of these epigenetic markers are associated with heterochromatin loss in Tau transgenic drosophila and human AD establishing this phenomenon as a toxic effector of Tau-induced neurodegeneration. Heterochromatin relaxation allows the aberrant expression of genes that are heterochromatically silenced and could lead to neurodegeneration (Frost et al. 2014). Dysregulated genes related to Tau induced neurodegeneration are potential targets for Tau-based therapies.

### **Tau as membrane/synaptic protein**

Biochemical analysis showed that there is at least as much Tau in the human cerebral grey matter as in the underlying white matter (Khatoon, Grundke-Iqbal, and Iqbal 1994). However, Tau immunohistochemically is mainly distributed in the axonal compartment of adult neurons, but during pathological events, as in AD, is relocalized in the somato-dendritic compartment which can lead to synaptic impairment (Hoover et al. 2010). Even if there is less Tau in dendrites, 70% of postsynaptic membranes are positively stained for Tau (Tai et al. 2012), which suggest a role in the synaptic transmission. Tau pathology correlates with cognitive deficit/synaptic impairment, thus emphasizing

the importance of Tau for synaptic function and cognition (Braak and Braak 1991; C. Duyckaerts et al. 1997; Grober et al. 1999). Additionally, Tau mRNA is found in the dendritic spines (Malmqvist, Anthony, and Gallo 2014). There are several isoforms of Tau in neurons. Post-translational changes are also potent modifiers of Tau localization, as for example hyperphosphorylated Tau tends to relocate in the somatodendritic compartment (Hoover et al. 2010; Tashiro et al. 1997). One hypothesis to explain this relocation would be the existence of a diffusion barrier that prevents Tau from entering somatodendritic compartment of mature and healthy neurons (X. Li et al. 2011). In pathological condition, where Tau is found hyperphosphorylated, Tau is detached from microtubules and can diffuse to the somatodendritic compartment (Zempel et al. 2010, 2011). Furthermore, there is evidence that suggests an activity-dependant transfer of Tau from presynaptic to postsynaptic compartment (Pooler et al. 2013; Sokolow et al. 2015; K. Yamada et al. 2014).

Tau function is closely related to its phosphorylation state. Phosphorylation of Tau is dependant of kinase activity, and it is interesting to note that two of the main kinases of Tau, namely GSK3- $\beta$  and p38 MAPK, are found located in the post-synaptic compartment (E. M. Mandelkow et al. 1992). For example, the phosphorylation of Tau at Ser396 is critical for the induction of long term potentiation (LTP), a critical process for memory (Regan et al. 2015) and both GSK3- $\beta$  and p38 MAPK can phosphorylate Tau at this site (Nicolas Sergeant et al. 2008). The required function of Tau for LTP was confirmed using Tau deficient mouse model that showed a selective impairment of LTP in hippocampus (Kimura et al. 2014). One possible mechanism resides in the interaction between Tau and the AMPA receptor subunit GluA2 that is necessary for LTP induction (Yagishita et al. 2015) and the ability for Tau to regulate AMPAR trafficking in the post-synaptic membrane (Suzuki and Kimura 2017). Additionally, Tau interaction with the Src Kinase Fyn modulate the membrane stability of the NR2B subunit of NMDAR, another critical component for synaptic plasticity and memory (Ittner et al. 2010; Mondragón-Rodríguez et al. 2012). Tau has also been linked to the main neurotrophic factor in the brain, the BDNF, as Tau is necessary for the increase of spine density induced by BDNF (Q. Chen et al. 2012) and Tau deletion result in a loss of synaptic mass possibly due to an impairment of BDNF signalling (Burnouf et al. 2013; Jiao et al. 2016). Several studies show that there is a synaptic hyperphosphorylation of Tau (Muntané et al. 2008; Takahashi et al. 2010) and that Tau is required for synaptic impairment induced by  $\beta$ -amyloid peptide, as Tau deletion prevents amyloid toxicity (Rapoport et al. 2002; Roberson et al. 2007; Shipton et al. 2011).

Spatiotemporal evolution of Tau pathology, as hyperphosphorylation and aggregation is well correlated with the cognitive deficits, known as Braak Stages in AD (Braak and Braak 1991). As Tau function is critically linked to its phosphorylation state, one can assume that the abnormal hyperphosphorylation of Tau during disease can have 2 effects: a loss-of-function or a toxic gain-of-function. This mechanism could explain the possible link between Tau pathology and cognitive

deficit. For instance, the well described interaction between Tau and Fyn, regulating NMDAR stability, is found decreased when Tau is hyperphosphorylated (Lau et al. 2016). Phosphorylation of Tau at Ser396 and Ser404 is correlated with a loss of synaptic markers and a reduction of dendritic spines (Pineiro et al. 2016; Muntané et al. 2008). Other post translational modifications should not be discarded, as for example abnormal acetylation of Tau on Lys274 and Lys281, as found in AD, can impair AMPAR trafficking and LTP (Tracy et al. 2016).

Altogether, several studies show a critical role for Tau in synaptic function, and provide new evidence that those pathological changes of Tau results in synaptic impairment which translates into cognitive deficits.

### **Tau as mediator of metabolism**

#### *Brain hypometabolism and Tau phosphorylation*

The maintenance of energy metabolism is a crucial process for all living cells. Metabolic alterations are an early event in neurodegenerative disorders including Tauopathies. Indeed, defects in energy metabolism, mitochondrial dysfunctions and oxidative stress are commonly described in these disorders. Increasing number of studies show interrelation between alteration in metabolic control, mitochondrial dysfunction and hyperphosphorylation of Tau protein.

Glucose is the main source of energy in the brain, in particular for neurons that need a continuous supply of energy for the maintenance of their functions (Auer and Siesjö 1993). Therefore, any changes in glucose availability could have harmful effects for brain functions. Defects in energy metabolism are observed in several Tauopathies including AD, frontotemporal dementia (FTD), progressive supranuclear palsy (PSP) and corticobasal dementia (CBD) (Mosconi, Pupi, and De Leon 2008). Indeed, positron emission tomography (PET) imaging performed in patients affected by these diseases reveals that in restricted brain areas, including parietotemporal and frontotemporal regions and prefrontal cortex, there is a strong reduction of glucose utilization compared to that in aged-matched healthy persons (Mosconi, Pupi, and De Leon 2008; Teune et al. 2010). Recent studies showed that glucose deprivation induces in neuronal cells an increase of Tau phosphorylation, mediated by the activation of P38MAPK pathway (Elisabetta Lauretti and Praticò 2015), and in a h-Tau mouse model it produces learning and memory impairments (E. Lauretti et al. 2017). Additionally, it has been also demonstrated that the decrease of metabolic rate observed in a model of hibernating animal triggers PHF-like hyperphosphorylation of Tau (Planel 2004; Arendt, Stieler, and Holzer 2015). However, in this model, Tau phosphorylation is fully reversible after arousal, suggesting that phosphorylation of Tau protein during hypometabolic state could represent a

physiological adaptation with protective functions which is lost if the hypometabolism persists (Arendt, Stieler, and Holzer 2015).

### **Tau and insulin**

At present, several studies showed a correlation between type 2 diabetes and the development of neurodegenerative diseases, such AD (Ott et al. 1999; Ho et al. 2004; Jimenez-Palomares et al. 2012). Additional studies show the interrelation between brain insulin signalling and neuronal plasticity in neuronal cells as well as *in vivo* (Wan et al. 1997; Chiu, Chen, and Cline 2008). However, the link between Tau functionality and the insulin signalling is still to be deciphered.

A recent study uncovered that Tau is necessary for normal insulin response in the brain (Marciniak et al. 2017). The abrogation of Tau expression, in a Tau knockout mouse model, impairs the long-term depression (LTD) induced by insulin in hippocampus, as well as the anorexigenic effect of insulin in hypothalamus. The hypothesis is that PTEN (phosphatase and tensin homologue on chromosome 10), an inhibitor of the PI3K-Akt pathway of the insulin receptor, physiologically binds Tau protein, abrogating its function. Therefore, loss of Tau functions, as in Tauopathies, prevents the binding between Tau and PTEN, thus inducing a brain insulin resistance.

### **Tau and adenosine metabolism**

In the past decades, several studies showed a possible protective effect of caffeine consumption towards Alzheimer's disease and others dementia (Flaten et al. 2014, Cellai et al. *in press*). Caffeine acts in the brain as a non-specific antagonist of adenosine receptor, and it has been shown in Tau mouse model (THY-Tau22) that caffeine consumption prevents hyperphosphorylation of tau and related memory deficits, linking adenosine metabolism and tau pathology (Laurent et al. 2014). Following this results, our team showed that this beneficial effect of caffeine towards tau was linked to the blockade of the adenosine A2A receptor (Laurent et al. 2016). This is particularly interesting as A2AR is found overexpressed during AD (Albasanz et al. 2008; Temido-Ferreira et al. 2018) and correlated with tau pathology progression in the brain (Braak stages) (Orr et al. 2015). In light of these results, due to beneficial effect of the blockade of a2a receptors for the pathophysiological development of tau, adenosinergic pathway should be consider for the clinical point of view as a potential therapeutic target (Cellai et al. *in press*).

### **Mitochondrial dysfunctions and Tau alterations: who come first?**

Mitochondria are the power plants of neuronal cells, providing most of the ATP required for both the survival and functionality of neurons, as well in regulating the production of reactive oxygen species (ROS) and the signalling of cell apoptosis. During synaptic activation, mitochondria are of central importance for buffering  $Ca^{2+}$  influx (Werth and Thayer 1994), and supplying the ATP required for

neuronal transmission, vesicle release, neurotransmitter recycling and re-establishment of ion gradient across the post-synaptic membrane (Attwell and Laughlin 2001). In neural cells mitochondria can be stationary, docked in regions requiring a constant provision of metabolic ATP such as synaptic terminals and dendritic spines (Kang et al. 2008; Sun et al. 2013). Alternatively, mitochondria are transported within the axon and dendrites along the microtubule binaries of the cells, to provide metabolic energy and accomplish  $\text{Ca}^{2+}$  buffering functions. Mitochondrial anterograde transport is mediated by the kinesin-1 motors (KIF5), while anterograde trafficking is dependent on the cytoplasmic dynein motors (Pilling et al. 2006; Saxton and Hollenbeck 2012; Ruthel and Hollenbeck 2003). To maintain their functionality, distribution, size and morphology, mitochondria undergo fusion, fission and mitophagy. In mammalian cells. Mitochondrial fusion is mediated by three proteins: mitofusin1 and 2 (Mfn1, Mfn2), which are located in the outer mitochondrial membrane, and OPA1, in the internal mitochondria membrane (IMM) (H. Chen et al. 2003; Cipolat et al. 2004). Fission, instead, is induced by the cytoplasmic dynamin-related protein 1 (Drp1) (Frank et al. 2001). Mitophagy is a quality control system by which dysfunctional mitochondria are degraded and eliminated (Youle and Narendra 2011). This process is principally mediated by the activity of PINK1 and the E3 ubiquitin-protein ligase, that binds and ubiquitinates abnormal mitochondria, respectively and recruit them for autophagosome-dependent degradation (D. Narendra et al. 2008; D. P. Narendra et al. 2010; Ziviani, Tao, and Whitworth 2010).

Dysfunctional and mislocalized mitochondria are considered as a common hallmark of several neurodegenerative diseases, including AD and Tauopathies (David et al. 2005; De Vos et al. 2008). Several studies show a correlation between Tau and the functionality, localization and dynamics of mitochondria. A recent study showed that in neuronal cells, decrease in ATP availability, induced by reduction of mitochondrial oxidative respiration, associates with alteration in the level, distribution, phosphorylation and aggregation of Tau protein. Treatment of primary rat striatal neurons with annonacin, MPP<sup>+</sup> or NP-3, three inhibitors targeting specific mitochondrial respiratory complexes, causes a redistribution of Tau protein from the axon to the cell body and an increase in phosphorylation and level of Tau. Similarly, injection of annonacin and rotenone, an inhibitor of the respiratory complex I, induces redistribution, phosphorylation, accumulation and aggregation of Tau protein in neuronal cells in rodent brain (Escobar-Khondiker et al. 2007; E. S. Yamada et al. 2014; Höllerhage et al. 2009; Höglinger et al. 2005), suggesting that aberrant mitochondrial function associates with alteration of Tau protein functionality.

Correlation between mitochondria and Tau is not unidirectional: Tau indeed has been described to affect mitochondrial trafficking, dynamics and degradation.

Mitochondria are trafficked within neuronal cells along microtubules, the stability of which is dependent on Tau phosphorylation (Eva Maria Mandelkow et al. 2004; Tatebayashi et al. 2004). In

neurons from mouse models of Tauopathies and AD, mislocalization of Tau disrupts mitochondrial trafficking, thus eventually affecting the distribution and supply of energy in neuronal cells (Zempel and Mandelkow 2015; Kopeikina et al. 2011). Additionally, neurons from Tau P301L knock-in mice, where a hypophosphorylation of Tau is reported, present a reduction in the number of axonal mitochondria (Rodríguez-Martín et al. 2016).

Recent studies show that phosphorylated Tau protein promotes mitochondrial fragmentation by interacting with Drp1, therefore causing mitochondrial deficiency and death of neurons (Manczak and Reddy 2012; Kandimalla et al. 2016). Overexpression of wild-type Tau protein has been shown to upregulate mitochondrial fusion, causing the accumulation of longer mitochondria and deficits in mitophagy by impairing the binding of PINK1/Parkin to mitochondria (Y. Hu et al. 2016; X.-C. Li et al. 2016).

In neuronal metabolism, metabolic energy regulation and Tau phosphorylation are strictly and reciprocally connected. However, the dilemma of “who comes first” in the pathogenesis of Tauopathies and AD is still unknown and further investigations are required to find answers.

### **AMPK not only a metabolic regulator**

Besides these early events, Tauopathies are also characterized by a deregulation of the metabolic sensor, AMP-activated protein kinase (AMPK). AMPK is a serine/threonine kinase which is abundantly expressed in brain neurons. AMPK is a heterotrimer which contains a catalytic subunit ( $\alpha$ ) and two regulatory subunits ( $\beta$  and  $\gamma$ ). Once activated, AMPK restores intracellular energy balance by stimulating ATP-producing pathways, by acting on glycolysis, mitochondria biogenesis, and inhibits anabolic ATP-consuming pathways, such as protein synthesis (Carling 2004). It has been shown that AMPK is deregulated in AD and in other Tauopathies where it co-localizes with hyperphosphorylated Tau in pre-tangle and tangle-bearing neurons (Vingtdeux et al. 2011). *In vitro* studies using recombinant protein and *in vivo* studies showed that AMPK could phosphorylate Tau protein at several epitopes including Ser<sup>262</sup>, Thr<sup>231</sup>, Ser<sup>356</sup> and Ser<sup>396/404</sup> (Domise et al. 2016; Thornton et al. 2011; J. Z. Wang, Grundke-Iqbal, and Iqbal 2007). Moreover, recent studies revealed that a deficiency of AMPK reduces Tau pathology in the PS19 mouse model suggesting that AMPK could regulate Tau pathology (Domise et al. 2016).

Overall, these studies suggest that alteration of metabolic alteration, as well as AMPK activity could represent a potential target for therapeutic approach in the very early pathological phase of AD and Tauopathies.

Dysfunctions in the mitochondrial organelles, in particular reduction in oxidative respiration, has been described to alter Tau aggregation and localization in neuronal cells. However, alteration in Tau

functionality has been associated to abnormality in mitochondrial trafficking, dynamics, such as mitochondrial fission and fusion, and with altered mitophagy. Alteration in neuronal metabolism is associated with several neurodegenerative diseases. AMP activated protein kinase (AMPK) is not only an intracellular energy sensor and regulator, but it also found overactivated in degenerating neurons.

### **Tau as a prion-like protein**

In prion disorders, prion protein aggregates spread across the brain through an intercellular propagation. Once entered in healthy cells, these pathological aggregates induce conformational changes and aggregation of physiological prion proteins (Fraser 2014).

The prion-like transmission was implicated in 1978 when treatment of foetal human primary neuronal cultures with extract from an AD brain was found to induce Alzheimer's like PHF (De Boni and Crapper 1978). Later, hyperphosphorylated, mutated and truncated Tau proteins were shown to template normal Tau in a prion-like fashion (A. C. Alonso, Grundke-Iqbal, and Iqbal 1996; Clavaguera et al. 2009; Holmes and Diamond 2014; Sanders et al. 2014; W. Hu et al. 2016). Injection of brain extracts from P301L transgenic mice or AD cases in the brains of mice over-expressing wild-Type Tau results in the appearance of Tau aggregation at the injection site and in distant and neuro-connected brain regions which suggest an intercellular and trans-synaptic spread of Tau pathology (Clavaguera et al. 2009, 2013; W. Hu et al. 2016; C. Dai et al. 2018). In Tau transgenic mice expressing the P301L Tau protein in the entorhinal cortex, Tau aggregation and synaptic degeneration was found in proximal brain regions: the CA1 region of hippocampus and granule cells of the dentate gyrus where the Tau transgene wasn't expressed. These observations reflect the ability of P301L misfolded Tau to induce aggregation of both Tau transgene and endogenous wild-type Tau which suggest the existence of “*trans*-cellular” propagation pathways (de Calignon et al. 2012; L. Liu et al. 2012; Dujardin et al. 2014).

*In vitro* studies brings further evidence in support on this potential Tau trans-synaptic propagation by demonstrating that the physical presence of synaptic contacts between neurons facilitate Tau pathology propagation (Calafate et al. 2015). Once injected in the hippocampus of transgenic mice overexpressing human Tau, hyperphosphorylated Tau is taken up by proximal neurons, induces seeding of human Tau and is axonally transported in connected regions in a prion-like manner. This finding suggests a random spread of Tau pathology by proximity (W. Hu et al. 2016). Indeed, Tau seeds could be released from dying and damaged neurons and then taken up by unaffected cells in proximity. Such a mechanism might be one of the sources of the spread of Tau pathology and amenable to immunotherapy. Most of the Tau is secreted from neuronal plasma membrane by unconventional protein secretion (UPS) mechanism upon its detachment from microtubules due to

hyperphosphorylation and is taken up by the recipient neurons from the extracellular space at random (Katsinelos et al. 2018).

In physiological conditions and under the influence of neuronal activity, Tau protein is released by neurons in a non-vesicular and unconventional way (Pooler et al. 2013; Wu et al. 2016; K. Yamada et al. 2014; Katsinelos et al. 2018). Tau release can also be mediated by exosomes (Saman et al. 2012; K. Yamada et al. 2014). Although this vesicular release of Tau represents only a small percentage of the extracellular Tau (Dujardin et al. 2014; Saman et al. 2012), a recent study showed that this exosomal Tau could play an important role in Tau propagation. Indeed, thanks to an adeno-associated virus-based model of Tau propagation, it was shown that depleting microglia or inhibit exosome synthesis dramatically suppress the propagation of Tau *in vivo* (Asai et al. 2015). Tunnelling nanotubes have also been identified as another mechanism for Tau aggregates transmission and interestingly exposure to exogenous Tau seems to increase the number of these tunnelling structures (Tardivel et al. 2016). Tau release from neurons can also be due to CSP $\alpha$ -dependent exocytosis, a co-chaperone dysregulated in AD (Tiwari et al. 2015).

Regarding the uptake of aggregated Tau by adjacent and connected neurons, it has been shown that low molecular weight aggregates and short fibrils of recombinant Tau can be internalised by endocytosis. Indeed, the blocking of this Tau internalisation way by inhibiting dynamin reduces the propagation of Tau pathology (Wu et al. 2013).

In cultured cells and primary neurons, extracellular Tau has been shown to bind heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) and thereby enter into cells by micropinocytosis (Holmes et al. 2013). Interestingly, HSPGs have been previously linked to prion protein (Snow et al. 1990). Thus, preventing prion seeds from binding HSPGs present at the cell surface may be a good way to slow down the progression of neurodegenerative diseases. This approach has been tried for prion disease with pentosan polysulfate which proved to be highly effective at inhibiting PrP<sup>Sc</sup> formation both *in vitro* and in rodent models (Tsuboi, Doh-Ura, and Yamada 2009). This compound has also been tested in humans with Creutzfeldt-Jakob Disease and even it didn't halt progressive deterioration of the brain, it seems to prolong the survival of these patients (Holmes and Diamond 2014; Tsuboi, Doh-Ura, and Yamada 2009).

Certain Tau modifications, such as truncation appears to enhance Tau ability to aggregate and propagate between cells. Indeed some truncated Tau, such as Tau<sub>243-441</sub> (Tau-CTF24) showed higher propensity for aggregation, higher efficiency for propagation as well as faster and greater cell binding than aggregated full-length Tau (Matsumoto et al. 2015). These observations suggest that Tau truncation enhances its prion-like propagation and likely contributes to neurodegeneration.



Because of their exclusive ability to be picked up by cells, Tau oligomers and short fibrils have been described as essential species for Tau propagation (Wu et al. 2013). In vitro the best Tau particle size that can be taken up by cells is a decamer but if we look at the seeding potency, bigger particle size have better properties (Mirbaha et al. 2015) which suggest that a balance between transmissibility and propensity to aggregate is required for effective inter-neuronal propagation of pathogenic Tau species.

Prion diseases are also characterized by different strains of prions which induce distinct neurodegenerative phenotypes with reproducible patterns of neuropathology (Kaufman et al. 2016). Tau protein seems to exhibit a similar behaviour when brain homogenates prepared from different types of Tauopathies (AD, PSP and CBD), are injected into the brains of Tau transgenic mice (Boluda et al. 2015; Kaufman et al. 2016). The Tau inclusions formed in the brains of injected mice closely look like those originally injected (Clavaguera et al. 2009). Therefore, the nature of Tau seeds seems to be determinant for the structural characteristics of resultant Tau aggregates (Frost, Jacks, and Diamond 2009). The nature of Tau seeds could depend on its degree and/or pattern of hyperphosphorylation; dephosphorylation of hyperphosphorylated Tau from AD brain with protein phosphatase-2A was found to alter its ability to seed and propagate AD-like neurofibrillary tangles into argyrophilic grains when injected in the brains of human Tau transgenic mice (W. Hu et al. 2016).

Increasing number of studies on the spread of Tau pathology are in favour of the prion-like hypothesis. Pathological Tau oligomers and/or aggregates potentially propagate through *trans*-synaptic transmission which explain how the occurrence of a nidus of aggregated pathological Tau may seed physiological Tau and induce its aggregation and spread to distant brain regions during the onset of Tauopathies (Michel Goedert, Masuda-Suzukake, and Falcon 2017).

However, crucial distinctions remain between Tauopathies and prionopathies. Prion diseases are transmissible and despite decades of studies there is still no evidence that Tauopathies are transmitted from affected to unaffected individuals. Moreover, a species barrier is present in prion diseases but absent in Tauopathies where human mutated Tau can recruit mouse or rat endogenous Tau. Finally, most prion disorders exhibit a rapid progression within the CNS whereas most neurodegenerative diseases progress over many years. Nonetheless all these findings strongly support the fact that Tau protein and especially extracellular Tau is a viable target for treatment of AD and Tauopathies (C.-L. Dai et al. 2017; C. Dai et al. 2018).

### **What biophysical state of Tau to target and why**

As the main component of neuronal lesions of AD and Tauopathies, Tau represents a target of interest in therapeutics and clinical research against neurological disorders.

Tau occurs to be a highly flexible protein with no secondary structure (Jeganathan et al. 2008) or few secondary structures, notably short sequences corresponding to the PHF6\* and PHF6, which have a beta-strand tendency in soluble state (Mukrasch et al. 2009). In addition, short secondary structure elements were shown to be stabilized by specific phosphorylations, interestingly corresponding to the AT8 or AT180 epitopes (Gandhi et al. 2015; Sibille et al. 2012; Schwalbe et al. 2015).

When it becomes pathologic, Tau accumulates into oligomers and forms toxic intraneuronal aggregates that are notably highly phosphorylated (Köpke et al. 1993). Moreover, it has been demonstrated that Tau phosphorylation and progression in AD correlate with the severity of dementia (Augustinack et al. 2002). Thus, targeting Tau involves preventing and/or reducing its abnormal phosphorylation, oligomerization or disaggregating Tau inclusions. Phosphorylation is the main post-translational modification of Tau and its deregulation is proposed to be at the origin of Tau pathology (Grundke-Iqbal et al. 1986). Although, the molecular role of Tau hyperphosphorylation in the process of PHF formation is still elusive and only few studies directly point out the intrinsic capacity of hyperphosphorylation to trigger aggregation (A. del C. Alonso et al. 2001). Concerning the mechanism of phospho-dependent regulation of Tau functions, there is no precise evidence whether the pathological role of phosphorylation depends on specific phosphorylation sites or on an overall, not site-specific, increase of phosphorylation level. Moreover, the specific role of phospho-epitopes in the process of fiber formation is still under study to decipher the functional role of phosphorylation in Tau aggregation and to be able to give a better definition of what is a pathological “AD-Tau”. The identification of the phosphorylation patterns responsible for converting Tau into an AD-Tau is a first step to find new therapeutic kinase targets (J. Z. Wang, Grundke-Iqbal, and Iqbal 2007; Despres et al. 2017).

Thus, several studies have been focused on targeting kinases or phosphatases regulating Tau phosphorylation to treat AD and related dementia. Among them, inhibition of the serine-threonine kinase glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) has been by far the most studied as it is also involved in the production of A $\beta$  peptides (Eldar-Finkelman and Martinez 2011; Phiel et al. 2003). Only a small number of molecules have been tested *in vivo* but they have demonstrated interesting effects in transgenic mouse models of Tauopathies. Indeed, in these models, a reduction of both Tau phosphorylation and levels of aggregated insoluble Tau associated with cognitive improvements have been observed (Noble et al. 2005; Caccamo et al. 2007; Licht-Murava et al. 2016). However, most GSK-3 inhibitors have not succeeded in clinic trials in human subjects yet because of lack of clinical improvements or therapeutic effects. Others are still undergoing clinical development (Lovestone et al. 2015; Hampel et al. 2015; Pandey and DeGrado 2016). Given this and the non-specificity of kinases, other therapeutic approaches must be considered.

Prevention of Tau aggregation by inhibition of the formation of oligomers and fibrils represents a rational therapeutic approach as it seems to be specific to Tau protein and its toxic species. In this context, Tau aggregation/PHF inhibitors have been developed and have demonstrated efficiency in cellular and transgenic mice models such as methylthionium (methylene blue) or anthraquinone derivatives (C. M. Wischik et al. 1996; Pickhardt et al. 2005, 2007; Melis et al. 2015). These kinds of molecules are able to disrupt Tau aggregates, to prevent Tau-Tau binding interactions without impairing its normal tubulin interactions as well as producing benefits in behaviour and Tau pathology. Only methylene blue, a Tau anti-aggregant, has been tested in humans and reached phase II clinical trials during which it suggested a positive therapeutic effect (Claude M. Wischik et al. 2015). However, a recent feedback on a phase III trial of the methylene blue derivate, Leuco-methylthionium bis(hydromethanesulfonate) reports negative results on disease progression in patients with mild to moderate AD (Gauthier et al. 2016).

As the most toxic form of Tau is still in debate, proteins involved in both Tau phosphorylation and structural changes can be interesting for therapeutics. Notably, peptidyl-prolyl isomerases (PPIases) such as FKBP52 or Pin1 are able to regulate Tau structure and function before its Pro-residues (Blair et al. 2015). In this sense, FKBP52 has been recently shown to play a role in Tau pathogenicity by inducing the aggregation of truncated forms of Tau *in vitro* (Giustiniani et al. 2015) suggesting that FKBP52 could be a potential target in Tauopathies.

Another aspect for therapies targeting Tau involves degradation pathways. Cells are capable of handling misfolded proteins or aggregates through degradation pathways involving either the Ubiquitin-Proteasome System (UPS) or the Autophagy-Lysosome Pathway (Ciechanover and Kwon 2017). These mechanisms are even more important for neurons to clear or recycle cell components. Indeed, as they are post-mitotic cells, they are not able to clear toxic substances via mitosis and they are more sensitive to protein aggregation.

Tau is known to be degraded through the proteasome system associated with chaperones (Petrucci et al. 2004; Tseng et al. 2008) and recently also via autophagy (Kim et al. 2017). Moreover, Tau interferes with the normal functions of UPS (Abisambra et al. 2013; Myeku et al. 2015) and impairment of protein homeostasis is associated with neurodegenerative diseases such as AD (Opattova et al. 2015).

In this sense, approaches targeting chaperones of the UPS involved in Tau metabolism have been tested in mouse models. For example, EC102, an HSP90 inhibitor has shown significant results concerning the reduction of p-Tau species in a mouse model of Tauopathy (Dickey et al. 2007). Furthermore, recent results confirm that induction of autophagy clearance system is also an interesting pathway to follow. Indeed, it has been demonstrated that activation of autophagy by the AMPK-ULK1 axis or by the AMPK-mTOR pathway can both rescue memory impairment and reduce Tau aggregates

in AD mouse models (Zhang et al. 2017; Kim et al. 2017). Together, these findings indicate the importance of degradation pathways in Tauopathies and suggest that they could offer a promising therapeutic target.

Recently, new alternatives to target Tau have seen the light of day such as immunization, using Tau polypeptides or antibodies, which may also target extracellular Tau.

## **Tau immunization**

### *Why targeting Tau by immunotherapy?*

A lot of different therapeutic strategies have been studied to evaluate their potential effectiveness in treatment of Tauopathies. Unfortunately, most of these approaches did not succeed to significantly rescue the cognitive deficits in patients. In view of the potential prion-like character of Tau protein, one of the best approaches to target the pathological Tau could be immunotherapy whereas these potential immunotherapeutic treatments still face several challenges. First, only a small percentage of antibodies (~0.1%) cross the blood brain barrier, thus it may be helpful to find ways to improve antibody penetration into the brain. This problem is partially solved by the fact that AD patients present a BBB disruption allowing a greater access to the CNS for peripheral IgG (Bowman et al. 2007; Chalbot et al. 2011). The use of chaperone proteins, transient opening of the BBB and direct infusion of antibodies into the brain with a time-released pump are also considered. Second, it is known that the pathology of AD and other neurodegenerative diseases settle and evolve for several years or even decades before the appearance of the first symptoms suggesting that a development of early and sensitive biomarkers in order to be able to treat these patients as early as possible and test immunotherapies for longer periods of time. Finally, further studies are needed concerning the location and the mode of clearance of the antibody-antigen complexes to avoid clogging of the clearance pathway during long-term treatment.

Up to now, many research teams focused on immunotherapy targeting the amyloid beta peptide and showed a significant reduction in A $\beta$  deposits (Bard et al. 2000; Schenk et al. 1999) as well as a significant decrease in cognitive decline in AD mouse models (Janus et al. 2000; Morgan et al. 2000). In view of its positive outcomes in mouse models, passive and active immunotherapy clinical trials began targeting A $\beta$  peptide but some of them had to be halted because of inefficiency (Salloway et al. 2014; Doody et al. 2014) or toxicity (Orgogozo et al. 2003).

It seems that in human AD patients, targeting only the A $\beta$  peptide is not enough to reduce Tau pathology and enhance cognitive functions. In AD, the severity of cognitive decline correlates better with the evolution of neurofibrillary tangles (NFTs) than amyloid deposits (Wilcock and Esiri 1982; Nelson et al. 2012; Schwarz et al. 2016). Moreover, a previous study conducted on a mouse model of

AD that develop both aspect of the disease showed that anti- A $\beta$  immunotherapy had no effect on Tau pathology and did not improve cognitive functions (Oddo et al. 2006). Taken together, these studies strongly support that a reduction of Tau pathology is needed to enhance cognitive functions.

Results from anti-Tau immunotherapeutic studies in AD mouse models are promising. By targeting different pathological epitopes of Tau, immunotherapeutic studies showed a reduction of Tau pathology and cognitive deficit in different mouse models of Tauopathies or AD (Asuni et al. 2007; Boutajangout, Quartermain, and Sigurdsson 2010; Troquier et al. 2012; C. Dai et al. 2018). Finally, it has been recently demonstrated that a passive anti-Tau immunotherapy in 3 $\times$ Tg-AD mice could successfully reduce not only the Tau pathology but also inhibit the A $\beta$  pathology (C.-L. Dai et al. 2017).

Recently, the use of a novel class of antibody called VHH (Variable Heavy chain of the Heavy chain only antibody) are also investigated as a new immunotherapeutic strategy. VHH are also called single domain antibodies or nanobodies. They are constituted of a unique chain which corresponds to the variable heavy chain from the Immunoglobulin G from *Camelidae* (Hamers-Casterman et al. 1993). Due to their small size and high stability, they have been described to cross the blood brain barrier more easily than classic antibodies. They can easily be modified to penetrate into the cytoplasm of cells and bind specifically to their target protein (T. Li, Bourgeois, et al. 2016). Clinical trials are actually ongoing with bivalent and trivalent VHH to treat different diseases such as Acquired Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (Caplacizumab, Ablynx, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02553317) and Respiratory Syncytial Virus infection in infants (ALX-0171, Ablynx, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02979431). Different studies have been conducted to evaluate the potential of VHH to target the pathological amyloid form of different proteins such as lysozyme (Dumoulin et al. 2003; Rutgers et al. 2011; De Genst et al. 2010). And recently, VHH showed their potential as diagnostic tool to target A $\beta$  plaques and hyperphosphorylated Tau, with an affinity and specificity very close to antibodies already used for detecting these pathologic features (T. Li, Vandesquille, et al. 2016). VHHs have a great potential in future diagnostic and therapeutic strategies for the treatment of Tau pathology.

Altogether, these results show the great potential of Tau protein as a target in immunotherapeutic trials for AD treatment.

#### *Tau active versus Tau passive immunization*

There are two types of immunotherapies. And even they both aim to slow down and prevent the cognitive decline associated with AD, active and passive immunotherapies have respective advantages and disadvantages.

**Active immunization**, known to stimulate the cellular and humoral immune system and promote the production of anti-antigen antibodies, consists in the injection of an antigen combined with an immune boosting adjuvant. The main advantage of this type of immunotherapy is the induction of a long-term antibody production in a large population. If effective, active immunotherapy can be considered as a minimally invasive and cost-effective treatment (Lemere 2013; Lemere and Masliah 2010). But it should also be borne in mind that active vaccination induces a T cell response that can increase the risk of a deleterious immune response through a release of pro-inflammatory cytokines (too strong and pro-inflammatory adjuvant) or even more problematic, a recognition of the antigen as a self-protein.

Active immunotherapy leads to a polyclonal antibody response, which generates loads of antibodies recognizing multiple and sometimes overlapping epitopes on the target protein. This broad coverage can be seen as a significant advantage but can also become a disadvantage when the targeted antigen is a specific pathological form of an intrinsic protein with major physiological functions.

Regarding anti-Tau immunotherapy, active immunization of C57BL/6 wild-type mice with full length recombinant human Tau led to an encephalomyelitis, which confirms potential autoimmune toxicity of active vaccinations targeting the physiological Tau. However, Asuni and Sigurdsson's Team showed that this autoimmune problem isn't systematic thanks to an active immunization with a Tau phosphopeptide which allowed a reduction of Tau pathology and improved cognitive phenotypes in Tau transgenic mice (JNPL3) (Panza et al. 2016; Asuni et al. 2007).

Among active vaccines in clinical trials, AADvac1 (Axon Neuroscience, Bratislava, Slovak Republic) was the first anti-Tau vaccine. It's a synthetic peptide targeting misfolded Tau derived from amino acids 294 to 305 (KDNIKHVPGGGS), coupled to keyhole limpet hemocyanin, and administered with an Alhydrogel alum adjuvant. Three single doses of AAD-vac1 were assessed every month to test its safety, tolerability and efficacy in mild-to-moderate AD patients (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01850238). The most common adverse events were injection site reactions but there were no cases of meningoencephalitis or vasogenic oedema. In this first-in-man study, AADvac1 showed a favourable safety profile as well as an excellent immunogenicity. It was pursued with an open-label phase, in which all patients received another three doses of AADvac1 at monthly intervals but, at present, no information is available about this part of the study. Patients completing this 24-week study had the opportunity to enter a further 18-month open-label extension (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02031198, FUNDAMANT). A separate 24-month Phase II study is currently on going using AADvac1 vaccine (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02579252, ADA-MANT) (Kontsekova et al. 2014; Congdon and Sigurdsson 2018).

Another active vaccine, ACI-35 (AC Immune AG and Janssen Pharmaceuticals) entered a Phase Ib clinical study. It is a liposomal-based phospho-Tau peptide including phosphorylated S396 and S404 residues. This trial compares the effect of two doses of ACI-35 in people with mild-to-moderate AD to

investigate its safety, tolerability and immunogenicity (Theunis et al. 2013; Congdon and Sigurdsson 2018).

**Passive immunization** doesn't require a stimulation of the patient's immune system because it consists in regular injections of specific monoclonal antibodies. The main benefit of this treatment is that it directly targets the pathological epitope of the protein of interest without any risk to damage its physiological form (Lemere 2013; Lemere and Masliah 2010). On the downside, this treatment is invasive and less profitable due to the need of a large production of expensive humanized monoclonal antibodies. Thereby, at first glance, passive immunotherapy appears to be less feasible for long-term treatment of a large population. Repeated injection of antibodies over time may lead to the formation of anti-antibodies, which could potentially have a neutralizing effect or lead to side effects such as glomerulonephritis and vasculitis. However, since at the slightest sign of toxicity, passive immunotherapy can be stopped very easily, these clinical studies are amply justified and may help to target very promising pathological epitopes for AD treatment that can afterward be used in generating active vaccines.

One of the first Tau antibodies tested in clinical development for AD treatment was RG7345 (RO6926496, MAb86, F. Hoffmann-La Roche Ltd.). It's a human monoclonal antibody targeting the specific Tau-phosphorylated epitope "pS422". Unfortunately, after Phase 1, this antibody project was discontinued (Collin et al. 2014; Panza et al. 2016).

The antibody BMS-986168 (IPN007, Bristol-Myers Squibb Company) is a humanized monoclonal antibody recognising N-terminally fragmented forms of Tau (eTau). Although IPN007 isn't currently being tested for AD but for PSP, eTau was originally isolated from familial AD patient-derived pluripotent stem cells. After having controlled the safety and tolerability of this antibody in healthy subject, a Phase I trial began to evaluate BMS-986168 injections effects in 48 patients with PSP (Study CN002–003, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02460094). An extension study in PSP patients who participated to the previous study started to evaluate the long-term tolerability of multiple intravenous infusions of IPN007 (ClinicalTrials.gov identifier: NCT03068468).

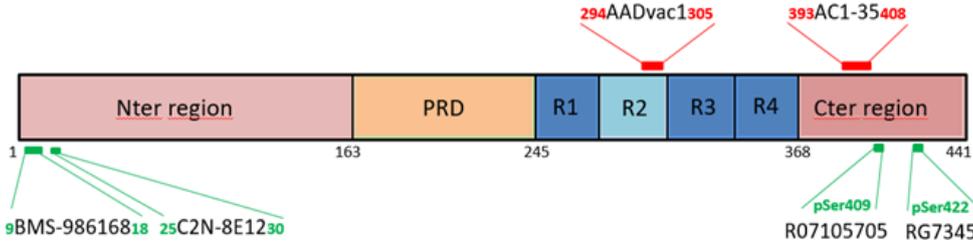
A Phase I clinical study in PSP patients was carried out with the recombinant humanized anti-Tau C2N-8E12 antibody (C2N Diagnostics, LLC, MO, USA and AbbVie, IL, USA) which recognizes an aggregated and extracellular form of pathological Tau implicated in trans neuronal propagation of Tau pathology, according to the results obtained in cellular and mouse models (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02494024) (Yanamandra et al. 2013, 2015; Congdon and Sigurdsson 2018). This trial is now recruiting for a phase II study (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02985879 and NCT02880956).

A Phase I trial with an antibody RO7105705 (AC Immune SA, Genentech, and Hoffmann-La Roche) targeting the phosphorylated serine 409 epitope is at present ongoing with patients with mild-to-moderate AD (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02820896).

Finally, two new antibodies are now entering for Phase I study: LY3303560 (Eli Lilly, ClinicalTrials.gov identifier: NCT02754830 and NCT03019536) and JNJ-63733657 (Janssen Pharmaceuticals, ClinicalTrials.gov identifier: NCT03375697). There is still not precise data concerning the targeted epitope but LY3303560 seems to recognize a conformational epitope whereas JNJ-63733657 bind to the middle region of Tau.

Due to its minimally invasive and cost-effective properties, active immunotherapy seems to be the best potential immunological treatment. While less feasible for long-term treatment, passive immunotherapy may be very helpful to target promising pathological epitopes for AD treatment.

	Clinical Trials	Target epitopes	Status	Target Disease
<b>Active tau-based immunotherapy</b>	AADvac1 (Axon Neuroscience SE) NCT02579252	<sup>294</sup> KDNIKHVPGGS <sub>305</sub>	Phase II	AD
	ACI-35 (AC Immune AG)	<sup>393</sup> VYKpSPVVS <sup>408</sup> GDTpSPRHL	Phase Ib	AD
	C2N-8E12 (C2N Diagnostics) NCT02880956 NCT02985879	<sup>25</sup> DQGGYT <sub>30</sub>	Phase II	AD, PSP
<b>Passive tau-based Immunotherapy</b>	BMS-986168 (Bristol-Myers Squibb Company) NCT02658916	<sup>9</sup> EVMEDHAGTY <sub>18</sub>	Phase I	PSP
	RO7105705 (AC Immune SA, Genentech, and Hoffmann-La Roche) NCT02820896	<sup>409</sup> pS	Phase I	AD



**Table 1:** Current active and passive Tau-based immunotherapies for Alzheimer’s disease (AD) and progressive supranuclear palsy (PSP).



## Conclusions

Tau appears to be a pleiotropic protein. Besides, its established function to stabilize the microtubule network, there are several pools of Tau within neurons, which are differentially regulated and have multiple functions. New tools need to be developed to clearly understand the respective contributions of Tau in different cellular compartments. Functions and dysfunctions of Tau proteins are linked to their localization and state within neurons. As AD and other Tauopathies are characterized by Tau pathology, it appears well-founded to consider Tau proteins as ideal targets for therapeutic strategies. In spite of an unfortunate lack of information regarding the results of clinical studies that have been carried out so far, Tau immunotherapy seems to be a very promising way to treat patients with AD and other Tauopathies. Nevertheless, a better understanding of the mechanisms underlying Tau aggregation and propagation as well as the development of biomarkers for early diagnosis are still missing to propose effective treatment.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the “Alzheimer & Tauopathies” Inserm group in the Jean-Pierre Aubert Research Center.

This article was conceived and written during Visiting Professorship of KI at the University of Lille with the support of the LabEx DISTALZ.

MA is supported by INSERM; KC, CE, MD, MH and CS are supported by Université de Lille; MG and CL are supported by CHRU de Lille et Région Hauts-de-France; CD is supported by Labex Distalz. VG is supported by Fondation pour la Recherche Médicale (SPF20160936000); LB is a CNRS research scientist.

## Bibliography

- Abisambra, J. F., U. K. Jinwal, L. J. Blair, J. C. O’Leary, Q. Li, S. Brady, L. Wang, et al. 2013. “Tau Accumulation Activates the Unfolded Protein Response by Impairing Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation.” *Journal of Neuroscience* 33 (22): 9498–9507. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5397-12.2013>.
- Ahmed, Tariq, Ann Van der Jeugd, David Blum, Marie-Christine Galas, Rudi D’Hooge, Luc Buee, and Detlef Balschun. 2014. “Cognition and Hippocampal Synaptic Plasticity in Mice with a Homozygous Tau Deletion.” *Neurobiology of Aging* 35 (11): 2474–78. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.005>.
- Alafuzoff, I., K. Iqbal, H. Friden, R. Adolfsson, and B. Winblad. 1987. “Histopathological Criteria for Progressive Dementia Disorders: Clinical-Pathological Correlation and Classification by Multivariate Data Analysis.” *Acta Neuropathologica* 74 (3): 209–25. <https://doi.org/10.1007/BF00688184>.
- Albasanz, José L., Sandra Perez, Marta Barrachina, Isidro Ferrer, and Mairena Martín. 2008. “Up-Regulation of Adenosine Receptors in the Frontal Cortex in Alzheimer’s Disease.” *Brain*

- Pathology (Zurich, Switzerland)* 18 (2): 211–19. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00112.x>.
- Alonso, A. C., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1996. “Alzheimer’s Disease Hyperphosphorylated Tau Sequesters Normal Tau into Tangles of Filaments and Disassembles Microtubules.” *Nature Medicine* 2 (7): 783–87.
- Alonso, A. C., T. Zaidi, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1994. “Role of Abnormally Phosphorylated Tau in the Breakdown of Microtubules in Alzheimer Disease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (12): 5562–66.
- Alonso, A., T. Zaidi, M. Novak, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 2001. “Hyperphosphorylation Induces Self-Assembly of Tau into Tangles of Paired Helical Filaments/Straight Filaments.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12): 6923–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.121119298>.
- Alonso, Alejandra D., John Di Clerico, Bin Li, Christopher P. Corbo, Maria E. Alaniz, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2010. “Phosphorylation of Tau at Thr212, Thr231, and Ser262 Combined Causes Neurodegeneration.” *Journal of Biological Chemistry* 285 (40): 30851–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.110957>.
- Alonso, Alejandra del C., Tanweer Zaidi, Michal Novak, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2001. “Hyperphosphorylation Induces Self-Assembly of Tau into Tangles of Paired Helical Filaments/Straight Filaments.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (12): 6923–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.121119298>.
- Arendt, Thomas, Jens Stieler, and Max Holzer. 2015. “Brain Hypometabolism Triggers PHF-like Phosphorylation of Tau, a Major Hallmark of Alzheimer’s Disease Pathology.” *Journal of Neural Transmission* 122 (4): 531–39. <https://doi.org/10.1007/s00702-014-1342-8>.
- Arriagada, P. V., J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte, and B. T. Hyman. 1992. “Neurofibrillary Tangles but Not Senile Plaques Parallel Duration and Severity of Alzheimer’s Disease.” *Neurology* 42 (3 Pt 1): 631–39.
- Asai, Hirohide, Seiko Ikezu, Satoshi Tsunoda, Maria Medalla, Jennifer Luebke, Tarik Haydar, Benjamin Wolozin, Oleg Butovsky, Sebastian Kügler, and Tsuneya Ikezu. 2015. “Depletion of Microglia and Inhibition of Exosome Synthesis Halt Tau Propagation.” *Nature Neuroscience* 18 (11): 1584–93. <https://doi.org/10.1038/nn.4132>.
- Asuni, Ayodeji A., Allal Boutajangout, David Quartermain, and Einar M. Sigurdsson. 2007. “Immunotherapy Targeting Pathological Tau Conformers in a Tangle Mouse Model Reduces Brain Pathology with Associated Functional Improvements.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (34): 9115–29. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2361-07.2007>.
- Attwell, David, and Simon B. Laughlin. 2001. “An Energy Budget for Signaling in the Grey Matter of the Brain.” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21 (10): 1133–45. <https://doi.org/10.1097/00004647-200110000-00001>.
- Auer, Roland N., and Bo K. Siesjö. 1993. “Hypoglycaemia: Brain Neurochemistry and Neuropathology.” *Bailliere’s Clinical Endocrinology and Metabolism* 7 (3): 611–25. [https://doi.org/10.1016/S0950-351X\(05\)80210-1](https://doi.org/10.1016/S0950-351X(05)80210-1).
- Augustinack, Jean C., Anja Schneider, Eva Maria Mandelkow, and Bradley T. Hyman. 2002. “Specific Tau Phosphorylation Sites Correlate with Severity of Neuronal Cytopathology in Alzheimer’s Disease.” *Acta Neuropathologica* 103 (1): 26–35. <https://doi.org/10.1007/s004010100423>.
- Bard, F., C. Cannon, R. Barbour, R. L. Burke, D. Games, H. Grajeda, T. Guido, et al. 2000. “Peripherally Administered Antibodies against Amyloid Beta-Peptide Enter the Central Nervous System and Reduce Pathology in a Mouse Model of Alzheimer Disease.” *Nature Medicine* 6 (8): 916–19. <https://doi.org/10.1038/78682>.
- Biernat, J., N. Gustke, G. Drewes, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1993. “Phosphorylation of Ser262 Strongly Reduces Binding of Tau to Microtubules: Distinction between PHF-like Immunoreactivity and Microtubule Binding.” *Neuron* 11 (1): 153–63.
- Blair, Laura J., Jeremy D. Baker, Jonathan J. Sabbagh, and Chad A. Dickey. 2015. “The Emerging Role of Peptidyl-Prolyl Isomerase Chaperones in Tau Oligomerization, Amyloid Processing,

- and Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 133 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1111/jnc.13033>.
- Boluda, Susana, Michiyo Iba, Bin Zhang, Kevin M. Raible, Virginia M-Y. Lee, and John Q. Trojanowski. 2015. "Differential Induction and Spread of Tau Pathology in Young PS19 Tau Transgenic Mice Following Intracerebral Injections of Pathological Tau from Alzheimer's Disease or Corticobasal Degeneration Brains." *Acta Neuropathologica* 129 (2): 221–37. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1373-0>.
- Bou Samra, Elias, Géraldine Buhagiar-Labarchède, Christelle Machon, Jérôme Guitton, Rosine Onclercq-Delic, Michael R. Green, Olivier Alibert, Claude Gazin, Xavier Veaute, and Mounira Amor-Guélet. 2017. "A Role for Tau Protein in Maintaining Ribosomal DNA Stability and Cytidine Deaminase-Deficient Cell Survival." *Nature Communications* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00633-1>.
- Boutajangout, Allal, David Quartermain, and Einar M. Sigurdsson. 2010. "Immunotherapy Targeting Pathological Tau Prevents Cognitive Decline in a New Tangle Mouse Model." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (49): 16559–66. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-10.2010>.
- Bowman, G. L., J. A. Kaye, M. Moore, D. Waichunas, N. E. Carlson, and J. F. Quinn. 2007. "Blood-Brain Barrier Impairment in Alzheimer Disease: Stability and Functional Significance." *Neurology* 68 (21): 1809–14. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000262031.18018.1a>.
- Boxer, Adam L., Jin-Tai Yu, Lawrence I. Golbe, Irene Litvan, Anthony E. Lang, and Günter U. Höglinger. 2017. "Advances in Progressive Supranuclear Palsy: New Diagnostic Criteria, Biomarkers, and Therapeutic Approaches." *The Lancet. Neurology* 16 (7): 552–63. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30157-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30157-6).
- Boyne, L. J., A. Tessler, M. Murray, and I. Fischer. 1995. "Distribution of Big Tau in the Central Nervous System of the Adult and Developing Rat." *The Journal of Comparative Neurology* 358 (2): 279–93. <https://doi.org/10.1002/cne.903580209>.
- Braak, H., and E. Braak. 1991. "Neuropathological Staging of Alzheimer-Related Changes." *Acta Neuropathologica* 82 (4): 239–59.
- Brion, J. P., A. M. Couck, E. Passareiro, and J. Flament-Durand. 1985. "Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease: An Immunohistochemical Study." *Journal of Submicroscopic Cytology* 17 (1): 89–96.
- Buée Scherrer, V., P. R. Hof, L. Buée, B. Leveugle, P. Vermersch, D. P. Perl, C. W. Olanow, and A. Delacourte. 1996. "Hyperphosphorylated Tau Proteins Differentiate Corticobasal Degeneration and Pick's Disease." *Acta Neuropathologica* 91 (4): 351–59.
- Buée-Scherrer, V., L. Buée, P. R. Hof, B. Leveugle, C. Gilles, A. J. Loerzel, D. P. Perl, and A. Delacourte. 1995. "Neurofibrillary Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism-Dementia Complex of Guam. Immunochemical Characterization of Tau Proteins." *The American Journal of Pathology* 146 (4): 924–32.
- Buée-Scherrer, V., L. Buée, B. Leveugle, D. P. Perl, P. Vermersch, P. R. Hof, and A. Delacourte. 1997. "Pathological Tau Proteins in Postencephalitic Parkinsonism: Comparison with Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders." *Annals of Neurology* 42 (3): 356–59. <https://doi.org/10.1002/ana.410420312>.
- Burnouf, Sylvie, Alberto Martire, Maxime Derisbourg, Cyril Laurent, Karim Belarbi, Antoine Leboucher, Francisco J. Fernandez-Gomez, et al. 2013. "NMDA Receptor Dysfunction Contributes to Impaired Brain-Derived Neurotrophic Factor-Induced Facilitation of Hippocampal Synaptic Transmission in a Tau Transgenic Model." *Aging Cell* 12 (1): 11–23. <https://doi.org/10.1111/accel.12018>.
- Caccamo, Antonella, Salvatore Oddo, Lana X. Tran, and Frank M. LaFerla. 2007. "Lithium Reduces Tau Phosphorylation but Not A $\beta$  or Working Memory Deficits in a Transgenic Model with Both Plaques and Tangles." *The American Journal of Pathology* 170 (5): 1669–75. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.061178>.
- Calafate, Sara, Arjan Buist, Katarzyna Miskiewicz, Vinoy Vijayan, Guy Daneels, Bart de Strooper, Joris de Wit, Patrik Verstreken, and Diederik Moechars. 2015. "Synaptic Contacts Enhance Cell-to-Cell Tau Pathology Propagation." *Cell Reports* 11 (8): 1176–83. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.043>.

- Calignon, Alix de, Manuela Polydoro, Marc Suárez-Calvet, Christopher William, David H. Adamowicz, Kathy J. Kopeikina, Rose Pitstick, et al. 2012. "Propagation of Tau Pathology in a Model of Early Alzheimer's Disease." *Neuron* 73 (4): 685–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.033>.
- Carling, David. 2004. "The AMP-Activated Protein Kinase Cascade - A Unifying System for Energy Control." *Trends in Biochemical Sciences* 29 (1): 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.11.005>.
- Cellai et al. in press. The adenosinergic signaling: a complex but promising therapeutic target for Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*.
- Chalbot, Sonia, Henrik Zetterberg, Kaj Blennow, Tormod Fladby, Niels Andreasen, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2011. "Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Permeability in Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 25 (3): 505–15. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101959>.
- Chen, Hsiuchen, Scott A. Detmer, Andrew J. Ewald, Erik E. Griffin, Scott E. Fraser, and David C. Chan. 2003. "Mitofusins Mfn1 and Mfn2 Coordinately Regulate Mitochondrial Fusion and Are Essential for Embryonic Development." *Journal of Cell Biology* 160 (2): 189–200. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211046>.
- Chen, Qian, Zhou Zhou, Lei Zhang, Yuan Wang, Yan-wen Zhang, Min Zhong, Shang-cheng Xu, Chun-hai Chen, Li Li, and Zheng-ping Yu. 2012. "Tau Protein Is Involved in Morphological Plasticity in Hippocampal Neurons in Response to BDNF." *Neurochemistry International* 60 (3): 233–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.12.013>.
- Chiu, Shu Ling, Chih Ming Chen, and Hollis T. Cline. 2008. "Insulin Receptor Signaling Regulates Synapse Number, Dendritic Plasticity, and Circuit Function In Vivo." *Neuron* 58 (5): 708–19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.014>.
- Cho, Jae-Hyeon, and Gail V. W. Johnson. 2004. "Primed Phosphorylation of Tau at Thr231 by Glycogen Synthase Kinase 3beta (GSK3beta) Plays a Critical Role in Regulating Tau's Ability to Bind and Stabilize Microtubules." *Journal of Neurochemistry* 88 (2): 349–58.
- Ciechanover, Aaron, and Yong Tae Kwon. 2017. "Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration."
- Cipolat, S., O. M. de Brito, B. Dal Zilio, and L. Scorrano. 2004. "OPA1 Requires Mitofusin 1 to Promote Mitochondrial Fusion." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (45): 15927–32. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407043101>.
- Clavaguera, Florence, Hiroyasu Akatsu, Graham Fraser, R. Anthony Crowther, Stephan Frank, Jürgen Hench, Alphonse Probst, et al. 2013. "Brain Homogenates from Human Tauopathies Induce Tau Inclusions in Mouse Brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (23): 9535. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301175110>.
- Clavaguera, Florence, Tristan Bolmont, R. Anthony Crowther, Dorothee Abramowski, Stephan Frank, Alphonse Probst, Graham Fraser, et al. 2009. "Transmission and Spreading of Tauopathy in Transgenic Mouse Brain." *Nature Cell Biology* 11 (7): 909–13. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>.
- Cleveland, D. W., S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner. 1977. "Physical and Chemical Properties of Purified Tau Factor and the Role of Tau in Microtubule Assembly." *Journal of Molecular Biology* 116 (2): 227–47.
- Collin, Ludovic, Bernd Bohrmann, Ulrich Göpfert, Krisztina Oroszlan-Szovik, Laurence Ozmen, and Fiona Grüninger. 2014. "Neuronal Uptake of Tau/pS422 Antibody and Reduced Progression of Tau Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Brain: A Journal of Neurology* 137 (Pt 10): 2834–46. <https://doi.org/10.1093/brain/awu213>.
- Congdon, Erin E., and Einar M. Sigurdsson. 2018. "Tau-Targeting Therapies for Alzheimer Disease." *Nature Reviews. Neurology*, June. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0013-z>.
- Crary, John F., John Q. Trojanowski, Julie A. Schneider, Jose F. Abisambra, Erin L. Abner, Irina Alafuzoff, Steven E. Arnold, et al. 2014. "Primary Age-Related Tauopathy (PART): A Common Pathology Associated with Human Aging." *Acta Neuropathologica* 128 (6): 755–66. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1349-0>.
- Cuchillo-Ibanez, Inmaculada, Anjan Seereeram, Helen L. Byers, Kit-Yi Leung, Malcolm A. Ward, Brian H. Anderton, and Diane P. Hanger. 2008. "Phosphorylation of Tau Regulates Its Axonal

- Transport by Controlling Its Binding to Kinesin.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 22 (9): 3186–95. <https://doi.org/10.1096/fj.08-109181>.
- Dai, Chun-ling, Wen Hu, Yunn Chyn Tung, Fei Liu, Cheng-Xin Gong, and Khalid Iqbal. 2018. “Tau Passive Immunization Blocks Seeding and Spread of Alzheimer Hyperphosphorylated Tau-Induced Pathology in 3 × Tg-AD Mice.” *Alzheimer’s Research & Therapy* 10 (January). <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0341-7>.
- Dai, Chun-Ling, Yunn Chyn Tung, Fei Liu, Cheng-Xin Gong, and Khalid Iqbal. 2017. “Tau Passive Immunization Inhibits Not Only Tau but Also A $\beta$  Pathology.” *Alzheimer’s Research & Therapy* 9 (1): 1. <https://doi.org/10.1186/s13195-016-0227-5>.
- David, Della C., Susanne Hauptmann, Isabel Scherping, Katrin Schuessel, Uta Keil, Patrizia Rizzu, Rivka Ravid, et al. 2005. “Proteomic and Functional Analyses Reveal a Mitochondrial Dysfunction in P301L Tau Transgenic Mice.” *Journal of Biological Chemistry* 280 (25): 23802–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500356200>.
- De Boni, U., and D. R. Crapper. 1978. “Paired Helical Filaments of the Alzheimer Type in Cultured Neurones.” *Nature* 271 (5645): 566–68.
- De Genst, Erwin J., Tim Guilliams, Joke Wellens, Elizabeth M. O’Day, Christopher A. Waudby, Sarah Meehan, Mireille Dumoulin, et al. 2010. “Structure and Properties of a Complex of  $\alpha$ -Synuclein and a Single-Domain Camelid Antibody.” *Journal of Molecular Biology* 402 (2): 326–43. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.07.001>.
- De Vos, Kurt J., Andrew J. Grierson, Steven Ackerley, and Christopher C. J. Miller. 2008. “Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases.” *Annual Review of Neuroscience* 31 (1): 151–73. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090711>.
- Delacourte, A., and A. Defossez. 1986. “Alzheimer’s Disease: Tau Proteins, the Promoting Factors of Microtubule Assembly, Are Major Components of Paired Helical Filaments.” *Journal of the Neurological Sciences* 76 (2–3): 173–86.
- Despres, Clément, Cillian Byrne, Haoling Qi, François-Xavier Cantrelle, Isabelle Huvent, Béatrice Chambraud, Etienne-Emile Baulieu, et al. 2017. “Identification of the Tau Phosphorylation Pattern That Drives Its Aggregation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (34): 201708448. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708448114>.
- Dickey, Chad A., Adeela Kamal, Karen Lundgren, Natalia Klosak, Rachel M. Bailey, Judith Dunmore, Peter Ash, et al. 2007. “The High-Affinity HSP90-CHIP Complex Recognizes and Selectively Degrades Phosphorylated Tau Client Proteins.” *Journal of Clinical Investigation* 117 (3): 648–58. <https://doi.org/10.1172/JCI29715>.
- Domise, Manon, Sébastien Didier, Claudia Marinangeli, Haitian Zhao, Pallavi Chandakkar, Luc Buée, Benoit Viollet, Peter Davies, Philippe Marambaud, and Valérie Vingtdeux. 2016. “AMP-Activated Protein Kinase Modulates Tau Phosphorylation and Tau Pathology in Vivo.” *Scientific Reports* 6 (February): 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep26758>.
- Doody, Rachele S., Ronald G. Thomas, Martin Farlow, Takeshi Iwatsubo, Bruno Vellas, Steven Joffe, Karl Kieburtz, et al. 2014. “Phase 3 Trials of Solanezumab for Mild-to-Moderate Alzheimer’s Disease.” *The New England Journal of Medicine* 370 (4): 311–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312889>.
- Drechsel, D N, A A Hyman, M H Cobb, and M W Kirschner. 1992. “Modulation of the Dynamic Instability of Tubulin Assembly by the Microtubule-Associated Protein Tau.” *Molecular Biology of the Cell* 3 (10): 1141–54.
- Drewes, G., A. Ebneith, U. Preuss, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1997. “MARK, a Novel Family of Protein Kinases That Phosphorylate Microtubule-Associated Proteins and Trigger Microtubule Disruption.” *Cell* 89 (2): 297–308.
- Drewes, G., B. Trinczek, S. Illenberger, J. Biernat, G. Schmitt-Ulms, H. E. Meyer, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1995. “Microtubule-Associated Protein/Microtubule Affinity-Regulating Kinase (p110mark). A Novel Protein Kinase That Regulates Tau-Microtubule Interactions and Dynamic Instability by Phosphorylation at the Alzheimer-Specific Site Serine 262.” *The Journal of Biological Chemistry* 270 (13): 7679–88.
- Dujardin, Simon, Katia Lécolle, Raphaëlle Caillierez, Séverine Bégard, Nadège Zommer, Cédric Lachaud, Sébastien Carrier, et al. 2014. “Neuron-to-Neuron Wild-Type Tau Protein Transfer

- through a Trans-Synaptic Mechanism: Relevance to Sporadic Tauopathies.” *Acta Neuropathologica Communications* 2 (January): 14. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-14>.
- Dumoulin, Mireille, Alexander M. Last, Aline Desmyter, Klaas Decanniere, Denis Canet, Göran Larsson, Andrew Spencer, et al. 2003. “A Camelid Antibody Fragment Inhibits the Formation of Amyloid Fibrils by Human Lysozyme.” *Nature* 424 (6950): 783–88. <https://doi.org/10.1038/nature01870>.
- Duyckaerts, C., M. Benneceb, Y. Grignon, T. Uchihara, Y. He, F. Piette, and J. J. Hauw. 1997. “Modeling the Relation between Neurofibrillary Tangles and Intellectual Status.” *Neurobiology of Aging* 18 (3): 267–73.
- Duyckaerts, Charles, Heiko Braak, Jean-Pierre Brion, Luc Buée, Kelly Del Tredici, Michel Goedert, Glenda Halliday, et al. 2015. “PART Is Part of Alzheimer Disease.” *Acta Neuropathologica* 129 (5): 749–56. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1390-7>.
- Eldar-Finkelman, Hagit, and Ana Martinez. 2011. “GSK-3 Inhibitors: Preclinical and Clinical Focus on CNS.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 4 (October): 32. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00032>.
- Escobar-Khondiker, M., M. Hollerhage, M.-P. Muriel, P. Champy, A. Bach, C. Depienne, G. Respondek, et al. 2007. “Annonacin, a Natural Mitochondrial Complex I Inhibitor, Causes Tau Pathology in Cultured Neurons.” *Journal of Neuroscience* 27 (29): 7827–37. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1644-07.2007>.
- Fischer, Daniela, Marco D. Mukrasch, Jacek Biernat, Stefan Bibow, Martin Blackledge, Christian Griesinger, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2009. “Conformational Changes Specific for Pseudophosphorylation at Serine 262 Selectively Impair Binding of Tau to Microtubules.” *Biochemistry* 48 (42): 10047–55. <https://doi.org/10.1021/bi901090m>.
- Flaten, Vanessa, Cyril Laurent, Joana E. Coelho, Ursula Sandau, Vânia L. Batalha, Sylvie Burnouf, Malika Hamdane, et al. 2014. “From Epidemiology to Pathophysiology: What about Caffeine in Alzheimer’s Disease?” *Biochemical Society Transactions* 42 (2): 587–92. <https://doi.org/10.1042/BST20130229>.
- Frank, Stephan, Brigitte Gaume, Elke S. Bergmann-Leitner, Wolfgang W. Leitner, Everett G. Robert, Frédéric Catez, Carolyn L. Smith, and Richard J. Youle. 2001. “The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis.” *Developmental Cell* 1 (4): 515–25. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00055-7).
- Frappier, T. F., I. S. Georgieff, K. Brown, and M. L. Shelanski. 1994. “Tau Regulation of Microtubule-Microtubule Spacing and Bundling.” *Journal of Neurochemistry* 63 (6): 2288–94.
- Fraser, Paul E. 2014. “Prions and Prion-like Proteins.” *The Journal of Biological Chemistry* 289 (29): 19839–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.583492>.
- Frost, Bess, Martin Hemberg, Jada Lewis, and Mel B. Feany. 2014. “Tau Promotes Neurodegeneration through Global Chromatin Relaxation.” *Nature Neuroscience* 17 (3): 357–66. <https://doi.org/10.1038/nn.3639>.
- Frost, Bess, Rachel L. Jacks, and Marc I. Diamond. 2009. “Propagation of Tau Misfolding from the Outside to the Inside of a Cell.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (19): 12845–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>.
- Gandhi, Neha S., Isabelle Landrieu, Cillian Byrne, Predrag Kukic, Laziza Amniai, François Xavier Cantrelle, Jean Michel Wieruszkeski, Ricardo L. Mancera, Yves Jacquot, and Guy Lippens. 2015. “A Phosphorylation-Induced Turn Defines the Alzheimer’s Disease AT8 Antibody Epitope on the Tau Protein.” *Angewandte Chemie - International Edition* 54 (23): 6819–23. <https://doi.org/10.1002/anie.201501898>.
- Gauthier, Serge, Howard H. Feldman, Lon S. Schneider, Gordon K. Wilcock, Giovanni B. Frisoni, Jiri H. Hardlund, Hans J. Moebius, et al. 2016. “Efficacy and Safety of Tau-Aggregation Inhibitor Therapy in Patients with Mild or Moderate Alzheimer’s Disease: A Randomised, Controlled, Double-Blind, Parallel-Arm, Phase 3 Trial.” *The Lancet* 388 (10062): 2873–84. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31275-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31275-2).
- Giustiniani, Julien, Kevin Guillemeau, Omar Dounane, Elodie Sardin, Isabelle Huvent, Alain Schmitt, Malika Hamdane, et al. 2015. “The FK506-Binding Protein FKBP52 in Vitro Induces

- Aggregation of Truncated Tau Forms with Prion-like Behavior.” *FASEB Journal* 29 (8): 3171–81. <https://doi.org/10.1096/fj.14-268243>.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, R. Jakes, D. Rutherford, and R. A. Crowther. 1989. “Multiple Isoforms of Human Microtubule-Associated Protein Tau: Sequences and Localization in Neurofibrillary Tangles of Alzheimer’s Disease.” *Neuron* 3 (4): 519–26.
- Goedert, Michel, Masami Masuda-Suzukake, and Benjamin Falcon. 2017. “Like Prions: The Propagation of Aggregated Tau and  $\alpha$ -Synuclein in Neurodegeneration.” *Brain: A Journal of Neurology* 140 (2): 266–78. <https://doi.org/10.1093/brain/aww230>.
- Gómez de Barreda, Elena, Hana N. Dawson, Michel P. Vitek, and Jesús Avila. 2010. “Tau Deficiency Leads to the Upregulation of BAF-57, a Protein Involved in Neuron-Specific Gene Repression.” *FEBS Letters* 584 (11): 2265–70. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.032>.
- Goode, B. L., P. E. Denis, D. Panda, M. J. Radeke, H. P. Miller, L. Wilson, and S. C. Feinstein. 1997. “Functional Interactions between the Proline-Rich and Repeat Regions of Tau Enhance Microtubule Binding and Assembly.” *Molecular Biology of the Cell* 8 (2): 353–65.
- Grober, E., D. Dickson, M. J. Sliwinski, H. Buschke, M. Katz, H. Crystal, and R. B. Lipton. 1999. “Memory and Mental Status Correlates of Modified Braak Staging.” *Neurobiology of Aging* 20 (6): 573–79.
- Grundke-Iqbal, I, K Iqbal, Y C Tung, M Quinlan, H M Wisniewski, and L I Binder. 1986. “Abnormal Phosphorylation of the Microtubule-Associated Protein Tau (Tau) in Alzheimer Cytoskeletal Pathology.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (13): 4913–17.
- Guo, Tong, Wendy Noble, and Diane P. Hanger. 2017. “Roles of Tau Protein in Health and Disease.” *Acta Neuropathologica* 133 (5): 665–704. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9>.
- Gustke, N., B. Trinczek, J. Biernat, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1994. “Domains of Tau Protein and Interactions with Microtubules.” *Biochemistry* 33 (32): 9511–22.
- Hamdane, Malika, Anne-Véronique Sambo, Patrice Delobel, Séverine Bégard, Anne Violleau, André Delacourte, Philippe Bertrand, Jesus Benavides, and Luc Buée. 2003. “Mitotic-like Tau Phosphorylation by p25-Cdk5 Kinase Complex.” *The Journal of Biological Chemistry* 278 (36): 34026–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302872200>.
- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. B. Songa, N. Bendahman, and R. Hamers. 1993. “Naturally Occurring Antibodies Devoid of Light Chains.” *Nature* 363 (6428): 446–48. <https://doi.org/10.1038/363446a0>.
- Hampel, Harald, Lon S. Schneider, Ezio Giacobini, Miia Kivipelto, Shireen Sindi, Bruno Dubois, Karl Broich, Robert Nisticò, Paul S. Aisen, and Simone Lista. 2015. “Advances in the Therapy of Alzheimer’s Disease: Targeting Amyloid Beta and Tau and Perspectives for the Future.” *Expert Review of Neurotherapeutics* 15 (1): 83–105. <https://doi.org/10.1586/14737175.2015.995637>.
- Ho, Lap, Weiping Qin, Patrick N. Pompl, Zhongmin Xiang, Jun Wang, Zhong Zhao, Yuanzhen Peng, et al. 2004. “Diet-Induced Insulin Resistance Promotes Amyloidosis in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer’s Disease.” *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (7): 902–4. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0978fje>.
- Hof, P. R., A. Charpiot, A. Delacourte, L. Buée, D. Purohit, D. P. Perl, and C. Bouras. 1992. “Distribution of Neurofibrillary Tangles and Senile Plaques in the Cerebral Cortex in Postencephalitic Parkinsonism.” *Neuroscience Letters* 139 (1): 10–14.
- Hof, P. R., E. A. Nimchinsky, V. Buée-Scherrer, L. Buée, J. Nasrallah, A. F. Hottinger, D. P. Purohit, A. J. Loerzel, J. C. Steele, and A. Delacourte. 1994. “Amyotrophic Lateral Sclerosis/Parkinsonism-Dementia Complex of Guam: Quantitative Neuropathology, Immunohistochemical Analysis of Neuronal Vulnerability, and Comparison with Related Neurodegenerative Disorders.” *Acta Neuropathologica* 88 (5): 397–404.
- Höglinger, Günter U., Annie Lannuzel, Myriam Escobar Khondiker, Patrick P. Michel, Charles Duyckaerts, Jean Féger, Pierre Champy, et al. 2005. “The Mitochondrial Complex I Inhibitor Rotenone Triggers a Cerebral Tauopathy.” *Journal of Neurochemistry* 95 (4): 930–39. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03493.x>.

- Höllerhage, Matthias, Andreas Matusch, Pierre Champy, Anne Lombès, Merle Ruberg, Wolfgang H. Oertel, and Günter U. Höglinger. 2009. "Natural Lipophilic Inhibitors of Mitochondrial Complex I Are Candidate Toxins for Sporadic Neurodegenerative Tau Pathologies." *Experimental Neurology* 220 (1): 133–42. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.08.004>.
- Holmes, Brandon B., Sarah L. DeVos, Najla Kfoury, Mei Li, Rachel Jacks, Kiran Yanamandra, Mohand O. Ouidja, et al. 2013. "Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate Internalization and Propagation of Specific Proteopathic Seeds." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (33): E3138–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301440110>.
- Holmes, Brandon B., and Marc I. Diamond. 2014. "Prion-like Properties of Tau Protein: The Importance of Extracellular Tau as a Therapeutic Target." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (29): 19855–61. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.549295>.
- Holtzman, David M., Maria C. Carrillo, James A. Hendrix, Lisa J. Bain, Ana M. Catafau, Laura M. Gault, Michel Goedert, et al. 2016. "Tau: From Research to Clinical Development." *Alzheimer's & Dementia* 12 (10): 1033–39. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.03.018>.
- Hoover, Brian R., Miranda N. Reed, Jianjun Su, Rachel D. Penrod, Linda A. Kotilinek, Marianne K. Grant, Rose Pitstick, et al. 2010. "Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration." *Neuron* 68 (6): 1067–81. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.030>.
- Hu, Wen, Xinhua Zhang, Yunn Chyn Tung, Shutao Xie, Fei Liu, and Khalid Iqbal. 2016. "Hyperphosphorylation Determines Both the Spread and the Morphology of Tau Pathology." *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 12 (10): 1066–77. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.014>.
- Hu, Yu, Xia-Chun Li, Zhi-hao Wang, Yu Luo, Xiangnan Zhang, Xiu-Ping Liu, Qiong Feng, et al. 2016. "Tau Accumulation Impairs Mitophagy via Increasing Mitochondrial Membrane Potential and Reducing Mitochondrial Parkin." *Oncotarget* 7 (14): 17356–68. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7861>.
- Hua, Qian, and Rong Qiao He. 2003. "Tau Could Protect DNA Double Helix Structure." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1645 (2): 205–11. [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(02\)00538-1](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(02)00538-1).
- Iqbal, K., I. Grundke-Iqbal, T. Zaidi, P. A. Merz, G. Y. Wen, S. S. Shaikh, H. M. Wisniewski, I. Alafuzoff, and B. Winblad. 1986. "Defective Brain Microtubule Assembly in Alzheimer's Disease." *Lancet (London, England)* 2 (8504): 421–26.
- Iqbal, K., H. M. Wisniewski, M. L. Shelanski, S. Brostoff, B. H. Liwnicz, and R. D. Terry. 1974. "Protein Changes in Senile Dementia." *Brain Research* 77 (2): 337–43.
- Iqbal, Khalid, Fei Liu, and Cheng-Xin Gong. 2016. "Tau and Neurodegenerative Disease: The Story so Far." *Nature Reviews. Neurology* 12 (1): 15–27. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2015.225>.
- Ittner, Lars M., Yazid D. Ke, Fabien Delerue, Mian Bi, Amadeus Gladbach, Janet van Eersel, Heidrun Wölfing, et al. 2010. "Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid-Beta Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models." *Cell* 142 (3): 387–97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.036>.
- Janus, C., J. Pearson, J. McLaurin, P. M. Mathews, Y. Jiang, S. D. Schmidt, M. A. Chishti, et al. 2000. "A Beta Peptide Immunization Reduces Behavioural Impairment and Plaques in a Model of Alzheimer's Disease." *Nature* 408 (6815): 979–82. <https://doi.org/10.1038/35050110>.
- Jeganathan, Sadasivam, Martin Von Bergen, Eva Maria Mandelkow, and Eckhard Mandelkow. 2008. "The Natively Unfolded Character of Tau and Its Aggregation to Alzheimer-like Paired Helical Filaments." *Biochemistry* 47 (40): 10526–39. <https://doi.org/10.1021/bi800783d>.
- Jho, Y. S., E. B. Zhulina, M. W. Kim, and P. A. Pincus. 2010. "Monte Carlo Simulations of Tau Proteins: Effect of Phosphorylation." *Biophysical Journal* 99 (8): 2387–97. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.06.056>.
- Jiao, S.-S., L.-L. Shen, C. Zhu, X.-L. Bu, Y.-H. Liu, C.-H. Liu, X.-Q. Yao, et al. 2016. "Brain-Derived Neurotrophic Factor Protects against Tau-Related Neurodegeneration of Alzheimer's Disease." *Translational Psychiatry* 6 (10): e907. <https://doi.org/10.1038/tp.2016.186>.
- Jimenez-Palomares, M., J. J. Ramos-Rodriguez, J. F. Lopez-Acosta, M. Pacheco-Herrero, A. M. Lechuga-Sancho, G. Perdomo, M. Garcia-Alloza, and I. Cozar-Castellano. 2012. "Increased A



- Production Prompts the Onset of Glucose Intolerance and Insulin Resistance.” *AJP: Endocrinology and Metabolism* 302 (11): E1373–80. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00500.2011>.
- Kadavath, Harindranath, Mariusz Jaremko, Łukasz Jaremko, Jacek Biernat, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2015. “Folding of the Tau Protein on Microtubules.” *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 54 (35): 10347–51. <https://doi.org/10.1002/anie.201501714>.
- Kandimalla, Ramesh, Maria Manczak, David Fry, Yeguvapalli Suneetha, Hiromi Sesaki, and P. Hemachandra Reddy. 2016. “Reduced Dynamin-Related Protein 1 Protects against Phosphorylated Tau-Induced Mitochondrial Dysfunction and Synaptic Damage in Alzheimer’s Disease.” *Human Molecular Genetics* 25 (22): 4881–97. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw312>.
- Kang, Jian-Sheng, Jin-Hua Tian, Ping-Yue Pan, Philip Zald, Cuiling Li, Chuxia Deng, and Zu-Hang Sheng. 2008. “Docking of Axonal Mitochondria by Syntaphilin Controls Their Mobility and Affects Short-Term Facilitation.” *Cell* 132 (1): 137–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.024>.
- Kar, Santwana, Juan Fan, Michael J. Smith, Michel Goedert, and Linda A. Amos. 2003. “Repeat Motifs of Tau Bind to the Insides of Microtubules in the Absence of Taxol.” *The EMBO Journal* 22 (1): 70–77. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg001>.
- Katsinelos, Taxiarchis, Marcel Zeitler, Eleni Dimou, Andromachi Karakatsani, Hans-Michael Müller, Eliana Nachman, Julia P. Steringer, Carmen Ruiz de Almodovar, Walter Nickel, and Thomas R. Jahn. 2018. “Unconventional Secretion Mediates the Trans-Cellular Spreading of Tau.” *Cell Reports* 23 (7): 2039–55. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.056>.
- Kaufman, Sarah K., David W. Sanders, Talitha L. Thomas, Allison Ruchinskas, Jaime Vaquer-Alicea, Apurwa M. Sharma, Timothy M. Miller, and Marc I. Diamond. 2016. “Tau Prion Strains Dictate Patterns of Cell Pathology, Progression Rate, and Regional Vulnerability in Vivo.” *Neuron* 92 (4): 796–812. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.09.055>.
- Khatoun, S., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1994. “Levels of Normal and Abnormally Phosphorylated Tau in Different Cellular and Regional Compartments of Alzheimer Disease and Control Brains.” *FEBS Letters* 351 (1): 80–84.
- Kim, YoungDoo, Eun Il Jeong, Jihoon Nah, Seung-Min Yoo, WonJae Lee, Youbin Kim, Seowon Moon, Se-Hoon Hong, and Yong-keun Jung. 2017. “Pimozide Reduces Toxic Forms of Tau in TauC3 Mice via AMPK-Mediated Autophagy.” *Journal of Neurochemistry* 38 (1): 42–49. <https://doi.org/10.1111/jnc.14109>.
- Kimura, Tetsuya, Daniel J. Whitcomb, Jihoon Jo, Philip Regan, Thomas Piers, Seonghoo Heo, Christopher Brown, et al. 2014. “Microtubule-Associated Protein Tau Is Essential for Long-Term Depression in the Hippocampus.” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 369 (1633): 20130144. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0144>.
- Kolarova, Michala, Francisco García-Sierra, Ales Bartos, Jan Rícný, and Daniela Ripova. 2012. “Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease.” *International Journal of Alzheimer’s Disease* 2012: 731526. <https://doi.org/10.1155/2012/731526>.
- Kontsekova, Eva, Norbert Zilka, Branislav Kovacech, Petr Novak, and Michal Novak. 2014. “First-in-Man Tau Vaccine Targeting Structural Determinants Essential for Pathological Tau–tau Interaction Reduces Tau Oligomerisation and Neurofibrillary Degeneration in an Alzheimer’s Disease Model.” *Alzheimer’s Research & Therapy* 6 (4): 44. <https://doi.org/10.1186/alzrt278>.
- Kopeikina, Katherine J., George A. Carlson, Rose Pitstick, Adam E. Ludvigson, Alan Peters, Jennifer I. Luebke, Robert M. Koffie, Matthew P. Frosch, Bradley T. Hyman, and Tara L. Spires-Jones. 2011. “Tau Accumulation Causes Mitochondrial Distribution Deficits in Neurons in a Mouse Model of Tauopathy and in Human Alzheimer’s Disease Brain.” *The American Journal of Pathology* 179 (4): 2071–82. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.004>.
- Köpke, E., Y. C. Tung, S. Shaikh, A. C. Alonso, K. Iqbal, and I. Grundke-Iqbal. 1993. “Microtubule-Associated Protein Tau. Abnormal Phosphorylation of a Non-Paired Helical Filament Pool in Alzheimer Disease.” *The Journal of Biological Chemistry* 268 (32): 24374–84.

- Lau, Dawn H. W., Marte Hogseth, Emma C. Phillips, Michael J. O'Neill, Amy M. Pooler, Wendy Noble, and Diane P. Hanger. 2016. "Critical Residues Involved in Tau Binding to Fyn: Implications for Tau Phosphorylation in Alzheimer's Disease." *Acta Neuropathologica Communications* 4 (May). <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0317-4>.
- Laurent, C., S. Burnouf, B. Ferry, V. L. Batalha, J. E. Coelho, Y. Baqi, E. Malik, et al. 2016. "A2A Adenosine Receptor Deletion Is Protective in a Mouse Model of Tauopathy." *Molecular Psychiatry* 21 (1): 97–107. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.151>.
- Laurent, Cyril, Sabiha Eddarkaoui, Maxime Derisbourg, Antoine Leboucher, Dominique Demeyer, Sébastien Carrier, Marion Schneider, et al. 2014. "Beneficial Effects of Caffeine in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease-like Tau Pathology." *Neurobiology of Aging* 35 (9): 2079–90. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.027>.
- Lauretti, E., J. G. Li, A. Di Meco, and D. Praticò. 2017. "Glucose Deficit Triggers Tau Pathology and Synaptic Dysfunction in a Tauopathy Mouse Model." *Translational Psychiatry* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/tp.2016.296>.
- Lauretti, Elisabetta, and Domenico Praticò. 2015. "Glucose Deprivation Increases Tau Phosphorylation via P38 Mitogen-Activated Protein Kinase." *Aging Cell* 14 (6): 1067–74. <https://doi.org/10.1111/accel.12381>.
- Lemere, Cynthia A. 2013. "Immunotherapy for Alzheimer's Disease: Hoops and Hurdles." *Molecular Neurodegeneration* 8 (October): 36. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-36>.
- Lemere, Cynthia A., and Eliezer Masliah. 2010. "Can Alzheimer Disease Be Prevented by Amyloid- $\beta$  Immunotherapy?" *Nature Reviews. Neurology* 6 (2): 108–19. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.219>.
- Li, Bin, Muhammad Omar Chohan, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2007. "Disruption of Microtubule Network by Alzheimer Abnormally Hyperphosphorylated Tau." *Acta Neuropathologica* 113 (5): 501–11. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0207-8>.
- Li, Tengfei, Jean-Pierre Bourgeois, Susanna Celli, Fabienne Glacial, Anne-Marie Le Sourd, Salah Mecheri, Babette Weksler, et al. 2016. "Cell-Penetrating Anti-GFAP VHH and Corresponding Fluorescent Fusion Protein VHH-GFP Spontaneously Cross the Blood-Brain Barrier and Specifically Recognize Astrocytes: Application to Brain Imaging." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 26 (10): 3969–79. <https://doi.org/10.1096/fj.11-201384>.
- Li, Tengfei, Matthias Vandesquille, Fani Koukoulis, Clémence Duffeffant, Ihsen Youssef, Pascal Lenormand, Christelle Ganneau, et al. 2016. "Camelid Single-Domain Antibodies: A Versatile Tool for in Vivo Imaging of Extracellular and Intracellular Brain Targets." *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 243 (December): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.019>.
- Li, Xia-Chun, Yu Hu, Zhi-hao Wang, Yu Luo, Yao Zhang, Xiu-Ping Liu, Qiong Feng, et al. 2016. "Human Wild-Type Full-Length Tau Accumulation Disrupts Mitochondrial Dynamics and the Functions via Increasing Mitofusins." *Scientific Reports* 6 (April): 24756. <https://doi.org/10.1038/srep24756>.
- Li, Xiaoyu, Yatender Kumar, Hans Zempel, Eva-Maria Mandelkow, Jacek Biernat, and Eckhard Mandelkow. 2011. "Novel Diffusion Barrier for Axonal Retention of Tau in Neurons and Its Failure in Neurodegeneration." *The EMBO Journal* 30 (23): 4825–37. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.376>.
- Licht-Murava, Avital, Rom Paz, Lilach Vaks, Limor Avrahami, Batya Plotkin, Miriam Eisenstein, and Hagit Eldar-Finkelman. 2016. "A Unique Type of GSK-3 Inhibitor Brings New Opportunities to the Clinic." *Science Signaling* 9 (454): ra110 LP-ra110. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aah7102>.
- Lindwall, G., and R. D. Cole. 1984. "Phosphorylation Affects the Ability of Tau Protein to Promote Microtubule Assembly." *The Journal of Biological Chemistry* 259 (8): 5301–5.
- Liu, Chang, and Jürgen Götz. 2013. "Profiling Murine Tau with 0N, 1N and 2N Isoform-Specific Antibodies in Brain and Peripheral Organs Reveals Distinct Subcellular Localization, with the 1N Isoform Being Enriched in the Nucleus." *PLoS ONE* 8 (12): 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084849>.

- Liu, Fei, Bin Li, E.-Jan Tung, Inge Grundke-Iqbal, Khalid Iqbal, and Cheng-Xin Gong. 2007. "Site-Specific Effects of Tau Phosphorylation on Its Microtubule Assembly Activity and Self-Aggregation." *The European Journal of Neuroscience* 26 (12): 3429–36. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05955.x>.
- Liu, Li, Valerie Drouet, Jessica W. Wu, Menno P. Witter, Scott A. Small, Catherine Clelland, and Karen Duff. 2012. "Trans-Synaptic Spread of Tau Pathology In Vivo." *PLoS ONE* 7 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031302>.
- Loomis, P A, T H Howard, R P Castleberry, and L I Binder. 1990. "Identification of Nuclear Tau Isoforms in Human Neuroblastoma Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (21): 8422–26.
- Lovestone, Simon, Mercè Boada, Bruno Dubois, Michael Hüll, Juha O. Rinne, Hans-Jürgen Huppertz, Miguel Calero, et al. 2015. "A Phase II Trial of Tideglusib in Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease : JAD* 45 (1): 75–88. <https://doi.org/10.3233/JAD-141959>.
- Lu, Yang, Hai Jin He, Jun Zhou, Jun Ye Miao, Jing Lu, Ying Ge He, Rong Pan, Yan Wei, Ying Liu, and Rong Qiao He. 2013. "Hyperphosphorylation Results in Tau Dysfunction in DNA Folding and Protection." *Journal of Alzheimer's Disease* 37 (3): 551–63. <https://doi.org/10.3233/JAD-130602>.
- Maass, Anne, Susan Landau, Suzanne L. Baker, Andy Horng, Samuel N. Lockhart, Renaud La Joie, Gil D. Rabinovici, William J. Jagust, and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. 2017. "Comparison of Multiple Tau-PET Measures as Biomarkers in Aging and Alzheimer's Disease." *NeuroImage* 157 (August): 448–63. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.05.058>.
- Maina, Mahmoud Bukar, Youssra K. Al-Hilaly, and Louise C. Serpell. 2016. "Nuclear Tau and Its Potential Role in Alzheimer's Disease." *Biomolecules* 6 (1): 2–20. <https://doi.org/10.3390/biom6010009>.
- Malmqvist, Tony, Karen Anthony, and Jean-Marc Gallo. 2014. "Tau mRNA Is Present in Axonal RNA Granules and Is Associated with Elongation Factor 1A." *Brain Research* 1584 (October): 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.033>.
- Manczak, Maria, and P. Hemachandra Reddy. 2012. "Abnormal Interaction of VDAC1 with Amyloid Beta and Phosphorylated Tau Causes Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease." *Human Molecular Genetics* 21 (23): 5131–46. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd360>.
- Mandelkow, E. M., G. Drewes, J. Biernat, N. Gustke, J. Van Lint, J. R. Vandenheede, and E. Mandelkow. 1992. "Glycogen Synthase Kinase-3 and the Alzheimer-like State of Microtubule-Associated Protein Tau." *FEBS Letters* 314 (3): 315–21.
- Mandelkow, Eva Maria, Edda Thies, Bernhard Trinczek, Jacek Biernat, and Eckard Mandelkow. 2004. "MARK/PAR1 Kinase Is a Regulator of Microtubule-Dependent Transport in Axons." *Journal of Cell Biology* 167 (1): 99–110. <https://doi.org/10.1083/jcb.200401085>.
- Mansuroglu, Zeyni, Houda Benhelli-Mokrani, Vasco Marcato, Audrey Sultan, Marie Violet, Alban Chauderlier, Lucie Delattre, et al. 2016. "Loss of Tau Protein Affects the Structure, Transcription and Repair of Neuronal Pericentromeric Heterochromatin." *Scientific Reports* 6: 1–16. <https://doi.org/10.1038/srep33047>.
- Marciniak, Elodie, Antoine Leboucher, Emilie Caron, Tariq Ahmed, Anne Tailleux, Julie Dumont, Tarik Issad, et al. 2017. "Tau Deletion Promotes Brain Insulin Resistance." *The Journal of Experimental Medicine* 214 (8): 2257–69. <https://doi.org/10.1084/jem.20161731>.
- Mastroeni, Diego, Elaine Delvaux, Jennifer Nolz, Yuyan Tan, Andrew Grover, Salvatore Oddo, and Paul D. Coleman. 2015. "Aberrant Intracellular Localization of H3k4me3 Demonstrates an Early Epigenetic Phenomenon in Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 36 (12): 3121–29. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.017>.
- Matsumoto, Shin-Ei, Yumiko Motoi, Koichi Ishiguro, Takeshi Tabira, Fuyuki Kametani, Masato Hasegawa, and Nobutaka Hattori. 2015. "The Twenty-Four KDa C-Terminal Tau Fragment Increases with Aging in Tauopathy Mice: Implications of Prion-like Properties." *Human Molecular Genetics* 24 (22): 6403–16. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv351>.
- Melis, Valeria, Mandy Magbagbeolu, Janet E. Rickard, David Horsley, Kathleen Davidson, Kathleen A. Harrington, Keith Goatman, et al. 2015. "Effects of Oxidized and Reduced Forms of

- Methylthioninium in Two Transgenic Mouse Tauopathy Models.” *Behavioural Pharmacology* 26 (4): 353–68. <https://doi.org/10.1097/FBP.000000000000133>.
- Metuzals, Jams, Yves Robitaille, Susan Houghton, Serge Gauthier, and Richard Leblanc. 1988. “Paired Helical Filaments and the Cytoplasmic-Nuclear Interface in Alzheimer’s Disease.” *Journal of Neurocytology* 17 (6): 827–33. <https://doi.org/10.1007/BF01216709>.
- Mirbaha, Hilda, Brandon B. Holmes, David W. Sanders, Jan Bieschke, and Marc I. Diamond. 2015. “Tau Trimers Are the Minimal Propagation Unit Spontaneously Internalized to Seed Intracellular Aggregation.” *The Journal of Biological Chemistry* 290 (24): 14893–903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.652693>.
- Mondragón-Rodríguez, Siddhartha, Emilie Trillaud-Doppia, Anthony Dudilot, Catherine Bourgeois, Michel Lauzon, Nicole Leclerc, and Jannic Boehm. 2012. “Interaction of Endogenous Tau Protein with Synaptic Proteins Is Regulated by N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Dependent Tau Phosphorylation.” *The Journal of Biological Chemistry* 287 (38): 32040–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401240>.
- Morgan, D., D. M. Diamond, P. E. Gottschall, K. E. Ugen, C. Dickey, J. Hardy, K. Duff, et al. 2000. “A Beta Peptide Vaccination Prevents Memory Loss in an Animal Model of Alzheimer’s Disease.” *Nature* 408 (6815): 982–85. <https://doi.org/10.1038/35050116>.
- Mosconi, Lisa, Alberto Pupi, and Mony J. De Leon. 2008. “NIH Public Access.” *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 1147 (4): 180–95. <https://doi.org/10.1196/annals.1427.007.Brain>.
- Mukrasch, Marco D., Stefan Bibow, Jegannath Korukottu, Sadasivam Jeganathan, Jacek Biernat, Christian Griesinger, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2009. “Structural Polymorphism of 441-Residue Tau at Single Residue Resolution.” *PLoS Biology* 7 (2): 0399–0414. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000034>.
- Muntané, G., E. Dalfó, A. Martinez, and I. Ferrer. 2008. “Phosphorylation of Tau and Alpha-Synuclein in Synaptic-Enriched Fractions of the Frontal Cortex in Alzheimer’s Disease, and in Parkinson’s Disease and Related Alpha-Synucleinopathies.” *Neuroscience* 152 (4): 913–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.01.030>.
- Myeku, Natura, Catherine L. Clelland, Sheina Emrani, Nikolay V. Kukushkin, Wai Haung Yu, Alfred L. Goldberg, and Karen E. Duff. 2015. “Tau-Driven 26S Proteasome Impairment and Cognitive Dysfunction Can Be Prevented Early in Disease by Activating cAMP-PKA Signaling.” *Nature Medicine* 6 (December): 1–11. <https://doi.org/10.1038/nm.4011>.
- Narendra, Derek P., Seok Min Jin, Atsushi Tanaka, Der Fen Suen, Clement A. Gautier, Jie Shen, Mark R. Cookson, and Richard J. Youle. 2010. “PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin.” *PLoS Biology* 8 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000298>.
- Narendra, Derek, Atsushi Tanaka, Der Fen Suen, and Richard J. Youle. 2008. “Parkin Is Recruited Selectively to Impaired Mitochondria and Promotes Their Autophagy.” *Journal of Cell Biology* 183 (5): 795–803. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>.
- Nelson, Peter T., Irina Alafuzoff, Eileen H. Bigio, Constantin Bouras, Heiko Braak, Nigel J. Cairns, Rudolph J. Castellani, et al. 2012. “Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature.” *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 71 (5): 362–81. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825018f7>.
- Noble, Wendy, Emmanuel Planel, Cindy Zehr, Vicki Olm, Jordana Meyerson, Farhana Suleman, Kate Gaynor, et al. 2005. “Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 by Lithium Correlates with Reduced Tauopathy and Degeneration in Vivo.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (19): 6990–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500466102>.
- Oddo, Salvatore, Vitaly Vasilevko, Antonella Caccamo, Masashi Kitazawa, David H. Cribbs, and Frank M. LaFerla. 2006. “Reduction of Soluble Aβ and Tau, but Not Soluble Aβ Alone, Ameliorates Cognitive Decline in Transgenic Mice with Plaques and Tangles.” *The Journal of Biological Chemistry* 281 (51): 39413–23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608485200>.
- Opattova, Alena, Martin Cente, Michal Novak, and Peter Filipcik. 2015. “The Ubiquitin Proteasome System as a Potential Therapeutic Target for Treatment of Neurodegenerative Diseases.” *Gen. Physiol. Biophys* 34: 337–52. [https://doi.org/10.4149/gpb\\_2015024](https://doi.org/10.4149/gpb_2015024).

- Orgogozo, J.-M., S. Gilman, J.-F. Dartigues, B. Laurent, M. Puel, L. C. Kirby, P. Jouanny, et al. 2003. "Subacute Meningoencephalitis in a Subset of Patients with AD after Abeta42 Immunization." *Neurology* 61 (1): 46–54.
- Orr, Anna G., Edward C. Hsiao, Max M. Wang, Kaitlyn Ho, Daniel H. Kim, Xin Wang, Weikun Guo, et al. 2015. "Astrocytic Adenosine Receptor A2A and Gs-Coupled Signaling Regulate Memory." *Nature Neuroscience* 18 (3): 423–34. <https://doi.org/10.1038/nn.3930>.
- Ott, A., R. P. Stolk, F. van Harskamp, H. A. P. Pols, A. Hofman, and M. M. B. Breteler. 1999. "Diabetes Mellitus and the Risk of Dementia: The Rotterdam Study." *Neurology* 53 (9): 1937–1937. <https://doi.org/10.1212/WNL.53.9.1937>.
- Oyama, Fumitaka, Svetlana Kotliarova, Akihiro Harada, Mamoru Ito, Haruko Miyazaki, Yoshito Ueyama, Nobutaka Hirokawa, Nobuyuki Nukina, and Yasuo Ihara. 2004. "Gem GTPase and Tau: Morphological Changes Induced by Gem GTPase in CHO Cells Are Antagonized by Tau." *Journal of Biological Chemistry* 279 (26): 27272–77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401634200>.
- Panda, Dulal, Jonathan C. Samuel, Michelle Massie, Stuart C. Feinstein, and Leslie Wilson. 2003. "Differential Regulation of Microtubule Dynamics by Three- and Four-Repeat Tau: Implications for the Onset of Neurodegenerative Disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (16): 9548–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1633508100>.
- Pandey, Mukesh K., and Timothy R. DeGrado. 2016. "Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3)-Targeted Therapy and Imaging."
- Panza, Francesco, Vincenzo Solfrizzi, Davide Seripa, Bruno P. Imbimbo, Madia Lozupone, Andrea Santamato, Rosanna Tortelli, et al. 2016. "Tau-Based Therapeutics for Alzheimer's Disease: Active and Passive Immunotherapy." *Immunotherapy* 8 (9): 1119–34. <https://doi.org/10.2217/imt-2016-0019>.
- Perez, Mar, Ismael Santa-Maria, Elena Gomez De Barreda, Xiongwei Zhu, Raquel Cuadros, Jose Roman Cabrero, Francisco Sanchez-Madrid, et al. 2009. "Tau - An Inhibitor of Deacetylase HDAC6 Function." *Journal of Neurochemistry* 109 (6): 1756–66. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06102.x>.
- Petrucelli, Leonard, Dennis Dickson, Kathryn Kehoe, Julie Taylor, Heather Snyder, Andrew Grover, Michael De Lucia, et al. 2004. "CHIP and Hsp70 Regulate Tau Ubiquitination, Degradation and Aggregation." *Human Molecular Genetics* 13 (7): 703–14. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh083>.
- Phiel, Christopher J., Christina A. Wilson, Virginia M.-Y. Lee, and Peter S. Klein. 2003. "GSK-3alpha Regulates Production of Alzheimer's Disease Amyloid-Beta Peptides." *Nature* 423 (lane 2): 435–39. <https://doi.org/10.1038/nature01640>.
- Pickhardt, Marcus, Zuzana Gazova, Martin von Bergen, Inna Khlistunova, Yipeng Wang, Antje Hascher, Eva-Maria Mandelkow, Jacek Biernat, and Eckhard Mandelkow. 2005. "Anthraquinones Inhibit Tau Aggregation and Dissolve Alzheimer's Paired Helical Filaments in Vitro and in Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (5): 3628–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410984200>.
- Pickhardt, Marcus, Gregor Larbig, Inna Khlistunova, Atilla Coksezen, Bernd Meyer, Eva-Maria Mandelkow, Boris Schmidt, and Eckhard Mandelkow. 2007. "Phenylthiazolyl-Hydrazide and Its Derivatives Are Potent Inhibitors of Tau Aggregation and Toxicity in Vitro and in Cells." *Biochemistry* 46 (35): 10016–23. <https://doi.org/10.1021/bi700878g>.
- Pilling, Aaron D., Dai Horiuchi, Curtis M. Lively, and William M. Saxton. 2006. "Kinesin-1 and Dynein Are the Primary Motors for Fast Transport of Mitochondria in Drosophila Motor Axons." *Molecular Biology of the Cell* 17 (4): 2057–68. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-06-0526>.
- Pinheiro, Sara, Joana Silva, Cristina Mota, João Vaz-Silva, Ana Veloso, Vítor Pinto, Nuno Sousa, João Cerqueira, and Ioannis Sotiropoulos. 2016. "Tau Mislocation in Glucocorticoid-Triggered Hippocampal Pathology." *Molecular Neurobiology* 53 (7): 4745–53. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9356-2>.
- Planel, E. 2004. "Alterations in Glucose Metabolism Induce Hypothermia Leading to Tau Hyperphosphorylation through Differential Inhibition of Kinase and Phosphatase Activities:

- Implications for Alzheimer's Disease." *Journal of Neuroscience* 24 (10): 2401–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5561-03.2004>.
- Pooler, Amy M, Emma C Phillips, Dawn H W Lau, Wendy Noble, and Diane P Hanger. 2013. "Physiological Release of Endogenous Tau Is Stimulated by Neuronal Activity." *EMBO Reports* 14 (4): 389–94. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.15>.
- Prince, Martin J., A Commas-Herrera, M Knapp, M Guerchet, and M Karagiannidou. 2016. "World Alzheimer Report 2016 - Improving Healthcare for People Living with Dementia: Coverage, Quality and Costs Now and in the Future." September 20, 2016. <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2016>.
- Qi, Haoling, François-Xavier Cantrelle, Houda Benhelli-Mokrani, Caroline Smet-Nocca, Luc Buée, Guy Lippens, Eliette Bonnefoy, Marie-Christine Galas, and Isabelle Landrieu. 2015. "Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Characterization of Interaction of Tau with DNA and Its Regulation by Phosphorylation." *Biochemistry* 54 (7): 1525–33. <https://doi.org/10.1021/bi5014613>.
- Rapoport, Mark, Hana N. Dawson, Lester I. Binder, Michael P. Vitek, and Adriana Ferreira. 2002. "Tau Is Essential to Beta -Amyloid-Induced Neurotoxicity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (9): 6364–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.092136199>.
- Regan, Philip, Thomas Piers, Jee-Hyun Yi, Dong-Hyun Kim, Seonghoo Huh, Se Jin Park, Jong Hoon Ryu, Daniel J. Whitcomb, and Kwangwook Cho. 2015. "Tau Phosphorylation at Serine 396 Residue Is Required for Hippocampal LTD." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35 (12): 4804–12. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2842-14.2015>.
- Roberson, Erik D., Kimberly Scarce-Levie, Jorge J. Palop, Fengrong Yan, Irene H. Cheng, Tiffany Wu, Hilary Gerstein, Gui-Qiu Yu, and Lennart Mucke. 2007. "Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid Beta-Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model." *Science (New York, N.Y.)* 316 (5825): 750–54. <https://doi.org/10.1126/science.1141736>.
- Rodríguez-Martín, Teresa, Amy M. Pooler, Dawn H. W. Lau, Gábor M. Mórotz, Kurt J. De Vos, Jonathan Gilley, Michael P. Coleman, and Diane P. Hanger. 2016. "Reduced Number of Axonal Mitochondria and Tau Hypophosphorylation in Mouse P301L Tau Knockin Neurons." *Neurobiology of Disease* 85: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.10.007>.
- Rossi, Giacomina, Donatella Conconi, Elena Panzeri, Serena Redaelli, Elena Piccoli, Laura Paoletta, Leda Dalprà, and Fabrizio Tagliavini. 2013. "Mutations in MAPT Gene Cause Chromosome Instability and Introduce Copy Number Variations Widely in the Genome." *Journal of Alzheimer's Disease* 33 (4): 969–82. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121633>.
- Rutgers, K. S., R. J. A. Nabuurs, S. a. A. van den Berg, G. J. Schenk, M. Rotman, C. T. Verrips, S. G. van Duinen, et al. 2011. "Transmigration of Beta Amyloid Specific Heavy Chain Antibody Fragments across the in Vitro Blood-Brain Barrier." *Neuroscience* 190 (September): 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.076>.
- Ruthel, Gordon, and Peter J. Hollenbeck. 2003. "Response of Mitochondrial Traffic to Axon Determination and Differential Branch Growth." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 23 (24): 8618–24. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2324-03.2003> [pii].
- Salloway, Stephen, Reisa Sperling, Nick C. Fox, Kaj Blennow, William Klunk, Murray Raskind, Marwan Sabbagh, et al. 2014. "Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer's Disease." *The New England Journal of Medicine* 370 (4): 322–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304839>.
- Saman, Sudad, WonHee Kim, Mario Raya, Yvonne Visnick, Suhad Miro, Sarmad Saman, Bruce Jackson, et al. 2012. "Exosome-Associated Tau Is Secreted in Tauopathy Models and Is Selectively Phosphorylated in Cerebrospinal Fluid in Early Alzheimer Disease." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (6): 3842–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.277061>.
- Sanders, David W., Sarah K. Kaufman, Sarah L. DeVos, Apurwa M. Sharma, Hilda Mirbaha, Aimin Li, Scarlett J. Barker, et al. 2014. "Distinct Tau Prion Strains Propagate in Cells and Mice and Define Different Tauopathies." *Neuron* 82 (6): 1271–88. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.04.047>.

- Santarella, Rachel A., Georgios Skiniotis, Kenneth N. Goldie, Peter Tittmann, Heinz Gross, Eva-Maria Mandelkow, E. Mandelkow, and Andreas Hoenger. 2004. "Surface-Decoration of Microtubules by Human Tau." *Journal of Molecular Biology* 339 (3): 539–53. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.04.008>.
- Saxton, W. M., and P. J. Hollenbeck. 2012. "The Axonal Transport of Mitochondria." *Journal of Cell Science* 125 (9): 2095–2104. <https://doi.org/10.1242/jcs.053850>.
- Schenk, D., R. Barbour, W. Dunn, G. Gordon, H. Grajeda, T. Guido, K. Hu, et al. 1999. "Immunization with Amyloid-Beta Attenuates Alzheimer-Disease-like Pathology in the PDAPP Mouse." *Nature* 400 (6740): 173–77. <https://doi.org/10.1038/22124>.
- Schwalbe, Martin, Harindranath Kadavath, Jacek Biernat, Valery Ozenne, Martin Blackledge, Eckhard Mandelkow, and Markus Zweckstetter. 2015. "Structural Impact of Tau Phosphorylation at Threonine 231." *Structure* 23 (8): 1448–58. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.06.002>.
- Schwarz, Adam J., Peng Yu, Bradley B. Miller, Sergey Shcherbinin, James Dickson, Michael Navitsky, Abhinay D. Joshi, Michael D. Devous, and Mark S. Mintun. 2016. "Regional Profiles of the Candidate Tau PET Ligand 18F-AV-1451 Recapitulate Key Features of Braak Histopathological Stages." *Brain: A Journal of Neurology* 139 (Pt 5): 1539–50. <https://doi.org/10.1093/brain/aww023>.
- Seitz-Tutter, D., G. M. Langford, and D. G. Weiss. 1988. "Dynamic Instability of Native Microtubules from Squid Axons Is Rare and Independent of Gliding and Vesicle Transport." *Experimental Cell Research* 178 (2): 504–12.
- Sengupta, A., J. Kabat, M. Novak, Q. Wu, I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal. 1998. "Phosphorylation of Tau at Both Thr 231 and Ser 262 Is Required for Maximal Inhibition of Its Binding to Microtubules." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 357 (2): 299–309. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0813>.
- Sergeant, N., A. Watzek, and A. Delacourte. 1999. "Neurofibrillary Degeneration in Progressive Supranuclear Palsy and Corticobasal Degeneration: Tau Pathologies with Exclusively 'exon 10' isoforms." *Journal of Neurochemistry* 72 (3): 1243–49.
- Sergeant, Nicolas, Alexis Bretteville, Malika Hamdane, Marie-Laure Caillet-Boudin, Pierre Grognet, Stephanie Bombois, David Blum, et al. 2008. "Biochemistry of Tau in Alzheimer's Disease and Related Neurological Disorders." *Expert Review of Proteomics* 5 (2): 207–24. <https://doi.org/10.1586/14789450.5.2.207>.
- Shipton, Olivia A., Julie R. Leitz, Jenny Dworzak, Christine E. J. Acton, Elizabeth M. Tunbridge, Franziska Denk, Hana N. Dawson, et al. 2011. "Tau Protein Is Required for Amyloid {beta}-Induced Impairment of Hippocampal Long-Term Potentiation." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (5): 1688–92. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2610-10.2011>.
- Sibille, Nathalie, Isabelle Huvent, Caroline Fauquant, Dries Verdegem, Laziza Amniai, Arnaud Leroy, Jean Michel Wieruszkeski, Guy Lippens, and Isabelle Landrieu. 2012. "Structural Characterization by Nuclear Magnetic Resonance of the Impact of Phosphorylation in the Proline-Rich Region of the Disordered Tau Protein." *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 80 (2): 454–62. <https://doi.org/10.1002/prot.23210>.
- Sjoberg, M. K. 2006. "Tau Protein Binds to Pericentromeric DNA: A Putative Role for Nuclear Tau in Nucleolar Organization." *Journal of Cell Science* 119 (10): 2025–34. <https://doi.org/10.1242/jcs.02907>.
- Snow, A. D., T. N. Wight, D. Nochlin, Y. Koike, K. Kimata, S. J. DeArmond, and S. B. Prusiner. 1990. "Immunolocalization of Heparan Sulfate Proteoglycans to the Prion Protein Amyloid Plaques of Gerstmann-Straussler Syndrome, Creutzfeldt-Jakob Disease and Scrapie." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 63 (5): 601–11.
- Sokolow, Sophie, Kristen M. Henkins, Tina Bilousova, Bianca Gonzalez, Harry V. Vinters, Carol A. Miller, Lindsey Cornwell, Wayne W. Poon, and Karen H. Gylys. 2015. "Pre-Synaptic C-Terminal Truncated Tau Is Released from Cortical Synapses in Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 133 (3): 368–79. <https://doi.org/10.1111/jnc.12991>.
- Spillantini, M. G., T. D. Bird, and B. Ghetti. 1998. "Frontotemporal Dementia and Parkinsonism Linked to Chromosome 17: A New Group of Tauopathies." *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 8 (2): 387–402.

- Spillantini, Maria Grazia, and Michel Goedert. 2013. "Tau Pathology and Neurodegeneration." *The Lancet. Neurology* 12 (6): 609–22. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70090-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5).
- Spillantini, Maria Grazia, Jill R. Murrell, Michel Goedert, Martin R. Farlow, Aaron Klug, and Bernardino Ghetti. 1998. "Mutation in the Tau Gene in Familial Multiple System Tauopathy with Presenile Dementia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (13): 7737–41.
- Spires-Jones, Tara L., and Bradley T. Hyman. 2014. "The Intersection of Amyloid Beta and Tau at Synapses in Alzheimer's Disease." *Neuron* 82 (4): 756–71. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.004>.
- Sultan, Audrey, Fabrice Nessler, Marie Violet, Séverine Bégard, Anne Loyens, Smail Talahari, Zeyni Mansuroglu, et al. 2011. "Nuclear Tau, a Key Player in Neuronal DNA Protection." *Journal of Biological Chemistry* 286 (6): 4566–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.199976>.
- Sun, Tao, Haifa Qiao, Ping Yue Pan, Yanmin Chen, and Zu Hang Sheng. 2013. "Motile Axonal Mitochondria Contribute to the Variability of Presynaptic Strength." *Cell Reports* 4 (3): 413–19. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.040>.
- Suzuki, Mamiko, and Tetsuya Kimura. 2017. "Microtubule-Associated Tau Contributes to Intra-Dendritic Trafficking of AMPA Receptors in Multiple Ways." *Neuroscience Letters* 653 (July): 276–82. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.056>.
- Tai, Hwan-Ching, Alberto Serrano-Pozo, Tadafumi Hashimoto, Matthew P. Frosch, Tara L. Spires-Jones, and Bradley T. Hyman. 2012. "The Synaptic Accumulation of Hyperphosphorylated Tau Oligomers in Alzheimer Disease Is Associated with Dysfunction of the Ubiquitin-Proteasome System." *The American Journal of Pathology* 181 (4): 1426–35. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.033>.
- Takahashi, Reisuke H., Estibaliz Capetillo-Zarate, Michael T. Lin, Teresa A. Milner, and Gunnar K. Gouras. 2010. "Co-Occurrence of Alzheimer's Disease  $\beta$ -Amyloid and  $\tau$  Pathologies at Synapses." *Neurobiology of Aging* 31 (7): 1145–52. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.021>.
- Tardivel, Meryem, Séverine Bégard, Luc Bousset, Simon Dujardin, Audrey Coens, Ronald Melki, Luc Buée, and Morvane Colin. 2016. "Tunneling Nanotube (TNT)-Mediated Neuron-to-Neuron Transfer of Pathological Tau Protein Assemblies." *Acta Neuropathologica Communications* 4 (November). <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0386-4>.
- Tashiro, K., M. Hasegawa, Y. Ihara, and T. Iwatsubo. 1997. "Somatodendritic Localization of Phosphorylated Tau in Neonatal and Adult Rat Cerebral Cortex." *Neuroreport* 8 (12): 2797–2801.
- Tatebayashi, Yoshitaka, Niloufar Haque, Yunn-Chyn Tung, Khalid Iqbal, and Inge Grundke-Iqbal. 2004. "Role of Tau Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  in the Regulation of Organelle Transport." *Journal of Cell Science* 117 (9): 1653–63. <https://doi.org/10.1242/jcs.01018>.
- Temido-Ferreira, Mariana, Diana G. Ferreira, Vânia L. Batalha, Inês Marques-Morgado, Joana E. Coelho, Pedro Pereira, Rui Gomes, et al. 2018. "Age-Related Shift in LTD Is Dependent on Neuronal Adenosine A2A Receptors Interplay with mGluR5 and NMDA Receptors." *Molecular Psychiatry*, June. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0110-9>.
- Teune, Laura K., Anna L. Bartels, Bauke M. de Jong, Antoon T. M. Willemsen, Silvia A. Eshuis, Jeroen J. de Vries, Joost C. H. van Oostrom, and Klaus L. Leenders. 2010. "Typical Cerebral Metabolic Patterns in Neurodegenerative Brain Diseases." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 25 (14): 2395–2404. <https://doi.org/10.1002/mds.23291>.
- Theunis, Clara, Natalia Crespo-Biel, Valérie Gafner, Maria Pihlgren, María Pilar López-Deber, Pedro Reis, David T. Hickman, et al. 2013. "Efficacy and Safety of A Liposome-Based Vaccine against Protein Tau, Assessed in Tau.P301L Mice That Model Tauopathy." *PLoS ONE* 8 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072301>.
- Thornton, Claire, Nicola J. Bright, Magdalena Sastre, Phillip J. Muckett, and David Carling. 2011. "AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is a Tau Kinase, Activated in Response to Amyloid  $\beta$ -Peptide Exposure." *Biochemical Journal* 434 (3): 503–12. <https://doi.org/10.1042/BJ20101485>.



- Tiwari, Sachin S., Marie d'Orange, Claire Troakes, Badrun N. Shurovi, Olivia Engmann, Wendy Noble, Tibor Hortobágyi, and Karl P. Giese. 2015. "Evidence That the Presynaptic Vesicle Protein CSPalpha Is a Key Player in Synaptic Degeneration and Protection in Alzheimer's Disease." *Molecular Brain* 8 (January): 6. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0096-z>.
- Tracy, Tara E., Peter Dongmin Sohn, S. Sakura Minami, Chao Wang, Sang-Won Min, Yaqiao Li, Yungui Zhou, et al. 2016. "Acetylated Tau Obstructs KIBRA-Mediated Signaling in Synaptic Plasticity and Promotes Tauopathy-Related Memory Loss." *Neuron* 90 (2): 245–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.005>.
- Trinczek, B., J. Biernat, K. Baumann, E. M. Mandelkow, and E. Mandelkow. 1995. "Domains of Tau Protein, Differential Phosphorylation, and Dynamic Instability of Microtubules." *Molecular Biology of the Cell* 6 (12): 1887–1902.
- Troquier, Laetitia, Raphaëlle Caillierez, Sylvie Burnouf, Francisco J. Fernandez-Gomez, Marie-Eve Grosjean, Nadege Zommer, Nicolas Sergeant, Susanna Schraen-Maschke, David Blum, and Luc Buee. 2012. "Targeting Phospho-Ser422 by Active Tau Immunotherapy in the THY22 Mouse Model: A Suitable Therapeutic Approach." *Current Alzheimer Research* 9 (4): 397–405.
- Tseng, Bertrand P., Kim N. Green, Julie L. Chan, Mathew Blurton-Jones, and Frank M. LaFerla. 2008. "A $\beta$  Inhibits the Proteasome and Enhances Amyloid and Tau Accumulation." *Neurobiology of Aging* 29 (11): 1607–18. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.014>.
- Tsuboi, Yoshio, Katsumi Doh-Ura, and Tatsuo Yamada. 2009. "Continuous Intraventricular Infusion of Pentosan Polysulfate: Clinical Trial against Prion Diseases." *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 29 (5): 632–36. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2009.01058.x>.
- Vingtdeux, Valérie, Peter Davies, Dennis W. Dickson, and Philippe Marambaud. 2011. "AMPK Is Abnormally Activated in Tangle- and Pre-Tangle-Bearing Neurons in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies." *Acta Neuropathologica* 121 (3): 337–49. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0759-x>.
- Violet, Marie, Alban Chauderlier, Lucie Delattre, Meryem Tardivel, Meliza Sendid Chouala, Audrey Sultan, Elodie Marciniak, et al. 2015. "Prefibrillar Tau Oligomers Alter the Nucleic Acid Protective Function of Tau in Hippocampal Neurons in Vivo." *Neurobiology of Disease* 82: 540–51. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.09.003>.
- Violet, Marie, Lucie Delattre, Meryem Tardivel, Audrey Sultan, Alban Chauderlier, Raphaëlle Caillierez, Smail Talahari, et al. 2014. "A Major Role for Tau in Neuronal DNA and RNA Protection in Vivo under Physiological and Hyperthermic Conditions." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (March). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00084>.
- Wan, Q., Z. G. Xiong, H. Y. Man, C. A. Ackerley, J. Branton, W. Y. Lu, L. E. Becker, J. F. MacDonald, and Y. T. Wang. 1997. "Recruitment of Functional GABA(A) Receptors to Postsynaptic Domains by Insulin." *Nature* 388 (6643): 686–90. <https://doi.org/10.1038/41792>.
- Wang, Jian Zhi, Inge Grundke-Iqbal, and Khalid Iqbal. 2007. "Kinases and Phosphatases and Tau Sites Involved in Alzheimer Neurofibrillary Degeneration." *European Journal of Neuroscience* 25 (1): 59–68. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05226.x>.
- Wang, Yipeng, and Eckhard Mandelkow. 2016. "Tau in Physiology and Pathology." *Nature Reviews Neuroscience* 17 (1): 5–21. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1>.
- Wei, Yan, Mei Hua Qu, Xing Sheng Wang, Lan Chen, Dong Liang Wang, Ying Liu, Qian Hua, and Rong Qiao He. 2008. "Binding to the Minor Groove of the Double-Strand, Tau Protein Prevents DNA Damage by Peroxidation." *PLoS ONE* 3 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002600>.
- Wei, Yu Ping, Jin Wang Ye, Xiong Wang, Li Ping Zhu, Qing Hua Hu, Qun Wang, Dan Ke, Qing Tian, and Jian Zhi Wang. 2018. "Tau-Induced Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase-IV Activation Aggravates Nuclear Tau Hyperphosphorylation." *Neuroscience Bulletin* 34 (2): 261–69. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0148-8>.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, and M. W. Kirschner. 1975. "A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (5): 1858–62.

- Werth, J. L., and S. A. Thayer. 1994. "Mitochondria Buffer Physiological Calcium Loads in Cultured Rat Dorsal Root Ganglion Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 14 (1): 348–56.
- Wilcock, G. K., and M. M. Esiri. 1982. "Plaques, Tangles and Dementia. A Quantitative Study." *Journal of the Neurological Sciences* 56 (2–3): 343–56.
- Wischik, C. M., P. C. Edwards, R. Y. Lai, M. Roth, and C. R. Harrington. 1996. "Selective Inhibition of Alzheimer Disease-like Tau Aggregation by Phenothiazines." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (20): 11213–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11213>.
- Wischik, Claude M., Roger T. Staff, Damon J. Wischik, Peter Bentham, Alison D. Murray, John M. D. Storey, Karin A. Kook, and Charles R. Harrington. 2015. "Tau Aggregation Inhibitor Therapy: An Exploratory Phase 2 Study in Mild or Moderate Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease* 44 (2): 705–20. <https://doi.org/10.3233/JAD-142874>.
- Witman, G. B., D. W. Cleveland, M. D. Weingarten, and M. W. Kirschner. 1976. "Tubulin Requires Tau for Growth onto Microtubule Initiating Sites." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (11): 4070–74.
- Wu, Jessica W., Mathieu Herman, Li Liu, Sabrina Simoes, Christopher M. Acker, Helen Figueroa, Joshua I. Steinberg, et al. 2013. "Small Misfolded Tau Species Are Internalized via Bulk Endocytosis and Anterogradely and Retrogradely Transported in Neurons." *The Journal of Biological Chemistry* 288 (3): 1856–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.394528>.
- Wu, Jessica W., Syed A. Hussaini, Isle M. Bastille, Gustavo A. Rodriguez, Ana Mrejeru, Kelly Rilett, David W. Sanders, et al. 2016. "Neuronal Activity Enhances Tau Propagation and Tau Pathology in Vivo." *Nature Neuroscience* 19 (8): 1085–92. <https://doi.org/10.1038/nn.4328>.
- Yagishita, Sosuke, Miyuki Murayama, Tomoe Ebihara, Kei Maruyama, and Akihiko Takashima. 2015. "Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ -Mediated Phosphorylation in the Most C-Terminal Region of Protein Interacting with C Kinase 1 (PICK1) Regulates the Binding of PICK1 to Glutamate Receptor Subunit GluA2." *The Journal of Biological Chemistry* 290 (49): 29438–48. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619668>.
- Yamada, Elizabeth S., Gesine Respondek, Stefanie Müssner, Anderson de Andrade, Matthias Höllerhage, Christel Depienne, Agnès Rastetter, et al. 2014. "Annonacin, a Natural Lipophilic Mitochondrial Complex I Inhibitor, Increases Phosphorylation of Tau in the Brain of FTDP-17 Transgenic Mice." *Experimental Neurology* 253: 113–25. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.12.017>.
- Yamada, K. M., B. S. Spooner, and N. K. Wessells. 1970. "Axon Growth: Roles of Microfilaments and Microtubules." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 66 (4): 1206–12.
- Yamada, Kaoru, Jerrah K. Holth, Fan Liao, Floy R. Stewart, Thomas E. Mahan, Hong Jiang, John R. Cirrito, et al. 2014. "Neuronal Activity Regulates Extracellular Tau in Vivo." *The Journal of Experimental Medicine* 211 (3): 387–93. <https://doi.org/10.1084/jem.20131685>.
- Yanamandra, Kiran, Hong Jiang, Thomas E. Mahan, Susan E. Maloney, David F. Wozniak, Marc I. Diamond, and David M. Holtzman. 2015. "Anti-Tau Antibody Reduces Insoluble Tau and Decreases Brain Atrophy." *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2 (3): 278–88. <https://doi.org/10.1002/acn3.176>.
- Yanamandra, Kiran, Najla Kfoury, Hong Jiang, Thomas E. Mahan, Shengmei Ma, Susan E. Maloney, David F. Wozniak, Marc I. Diamond, and David M. Holtzman. 2013. "Anti-Tau Antibodies That Block Tau Aggregate Seeding in Vitro Markedly Decrease Pathology and Improve Cognition in Vivo." *Neuron* 80 (2): 402–14. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.07.046>.
- Youle, Richard J., and Derek P. Narendra. 2011. "Mechanisms of Mitophagy." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (1): 9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>.
- Zempel, Hans, and Eva-Maria Mandelkow. 2015. "Tau Missorting and Spastin-Induced Microtubule Disruption in Neurodegeneration: Alzheimer Disease and Hereditary Spastic Paraplegia." *Molecular Neurodegeneration* 10 (December). <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0064-1>.
- Zempel, Hans, Edda Thies, Eckhard Mandelkow, and Eva-Maria Mandelkow. 2010. "Abeta Oligomers Cause Localized Ca(2+) Elevation, Missorting of Endogenous Tau into Dendrites, Tau Phosphorylation, and Destruction of Microtubules and Spines." *The Journal of*

- Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (36): 11938–50. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2357-10.2010>.
- Zhang, Zhong-hao, Qiu-yan Wu, Rui Zheng, Chen Chen, Yao Chen, Qiong Liu, Peter R. Hoffmann, Jia-zuan Ni, and Guo-Li Song. 2017. “Selenomethionine Mitigates Cognitive Decline by Targeting Both Tau Hyperphosphorylation and Autophagic Clearance in an Alzheimer’s Disease Mouse Model.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 37 (9): 3229–16. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3229-16.2017>.
- Ziviani, E., R. N. Tao, and A. J. Whitworth. 2010. “Drosophila Parkin Requires PINK1 for Mitochondrial Translocation and Ubiquitinates Mitofusin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (11): 5018–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913485107>.

## **Annexe 2 : Revue "AMPK in Neurodegenerative Diseases"**

Ce chapitre a été publié dans la revue *Experientia Supplementum* en 2016.

AMP-activated Protein Kinase pp 153-177 ; [https://doi.org/10.1007/978-3-319-43589-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-43589-3_7)

### **AMPK in Neurodegenerative Diseases**

Manon Domise & Valérie Vingtdeux.

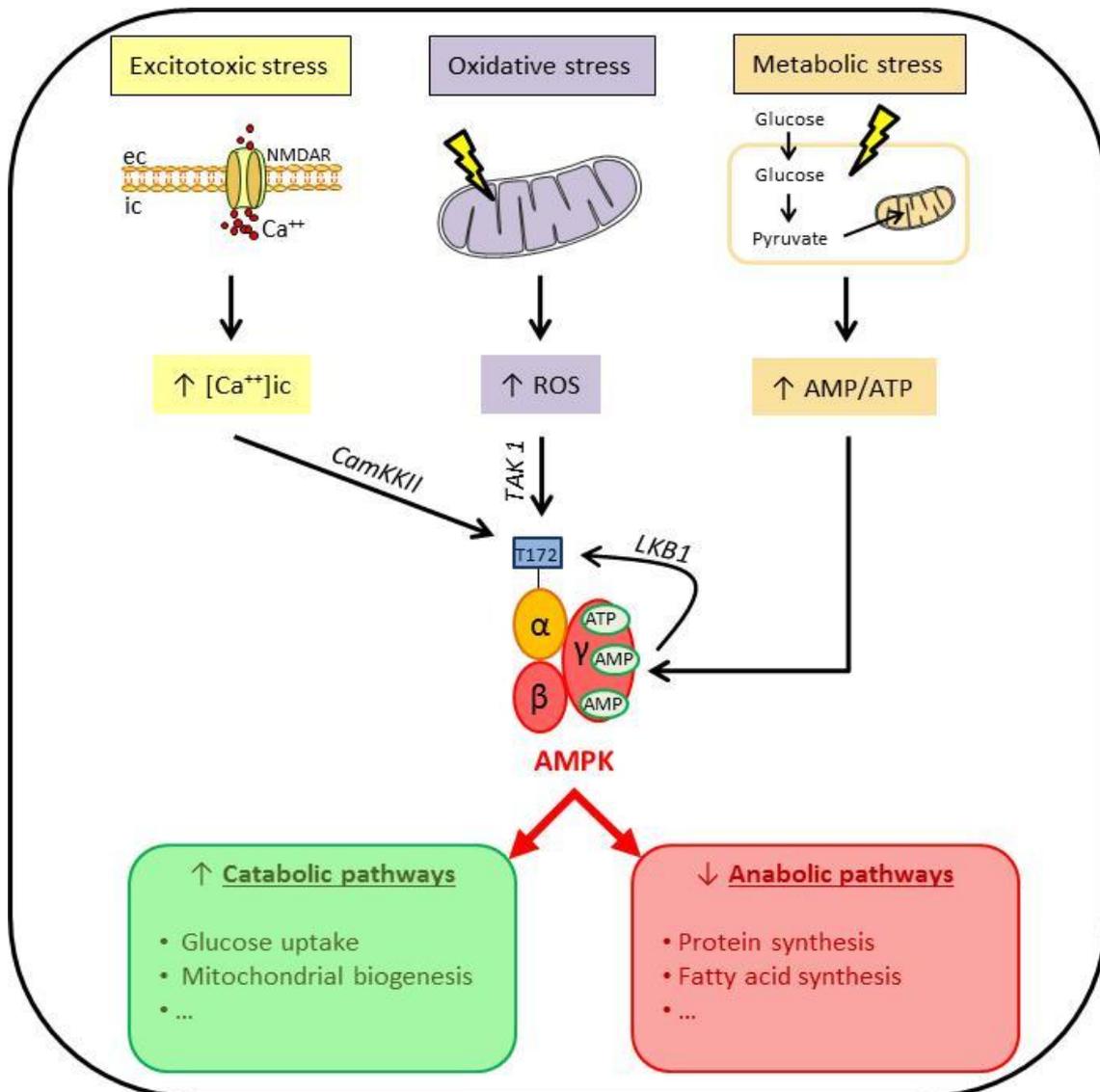
## **Abstract**

Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and Amyotrophic lateral sclerosis are neurodegenerative disorders that are characterized by a progressive degeneration of nerve cells eventually leading to dementia. While these diseases affect different neuronal populations and present distinct clinical features, they share in common several features and signaling pathways. In particular, energy metabolism defects, oxidative stress and excitotoxicity are commonly described and might be correlated with AMP-activated protein kinase (AMPK) deregulation. AMPK is a master energy sensor which was reported to be over-activated in the brain of patients affected by these neurodegenerative disorders. While the exact role played by AMPK in these diseases remains to be clearly established, several studies reported the implication of AMPK in various signaling pathways that are involved in these diseases progression. In this chapter we review the current literature regarding the involvement of AMPK in the development of these diseases and discuss the common pathways involved.

## 1. Introduction

Neurodegenerative diseases including Alzheimer's (AD), Parkinson's (PD), Huntington's (HD) and Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) are characterized by the progressive degeneration of nerve cells eventually leading to dementia. While these disorders affect different neuronal populations they share in common several features. For instance, they are characterized by the presence in degenerating neurons of protein aggregates that likely result from defective clearance mechanisms including proteasomal dysfunction and lysosomal clearance. In addition, metabolic alterations, excitotoxicity and oxidative stress are often described. All of the latter could participate in the deregulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) that was reported to occur in these diseases (Fig. 1). AMPK is a heterotrimer composed of one  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  subunits, often referred to as a master energy sensor. Indeed, AMPK possesses on its regulatory  $\gamma$  subunit four CBS (cystathionine-beta-synthase) domains which are binding sites for adenine nucleotides. Three of these sites can bind AMP, ADP and ATP (Sanders et al., 2007, Gowans et al., 2013, Xiao et al., 2011). Metabolic stresses that increase the AMP:ATP ratio will allow the preferential binding of AMP to the  $\gamma$  subunit thereby inducing a conformational change and favoring the phosphorylation of the residue Thr<sup>172</sup> located on the catalytic  $\alpha$  subunit by upstream AMPK kinases (Sanders et al., 2007, Gowans et al., 2013). The liver kinase B1 (LKB1) seems to be mostly responsible for AMPK phosphorylation in these conditions (Hawley et al., 2003, Woods et al., 2003, Shaw et al., 2004). At least two other kinases were reported to phosphorylate AMPK on Thr<sup>172</sup>, the Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase II (CamKKII) that is regulated by an increase in intracellular calcium levels (Woods et al., 2005, Hawley et al., 2005, Hurley et al., 2005, Connolly et al., 2014) and the transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1) that was reported to phosphorylate AMPK under oxidative stress conditions (Momcilovic et al., 2006, Chen et al., 2013). While not much is known about AMPK function in neuronal cells, studies realized in other cell types demonstrated that AMPK is a very important hub involved in the regulation of many intracellular pathways. In order to preserve energy levels, AMPK was described to down-regulate many energy consuming pathways. These include: protein synthesis in particular through the regulation of mTORC1-mediated translational control (Inoki et al., 2003, Gwinn et al., 2008) and eukaryotic elongation factor 2 (eEF2)-mediated translation (Browne et al., 2004, Horman et al., 2002); and fatty acid synthesis through the direct phosphorylation of acetyl CoA carboxylase 1 (ACC1) and the expression of enzymes involved in fatty acid synthesis by inhibition of the lipogenic transcription factor sterol regulatory element-binding protein C1 (SREBP1C; (Li et al., 2011)). On the opposite AMPK up-regulates energy producing pathways such as mitochondrial biogenesis through the activation of the PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ) pathway (Jager et al., 2007), glucose uptake through the regulation of glucose transporters expression (Zheng et al., 2001) and cell surface localization (Russell et al., 1999, Abbud et al., 2000, Weisova et al., 2009), glucose utilization through the direct phosphorylation of enzymes involved in the glycolytic pathway

including hexokinase (Abnous and Storey, 2008), 6-phosphofructo-2-kinase (PFK-2, (Marsin et al., 2000)), and pyruvate dehydrogenase kinase (PDK, (Wu et al., 2013)), and autophagy through the inhibition of ULK1 (Egan et al., 2011, Kim et al., 2011) and mTORC1 complex (review in (Shaw, 2009)) (Figure 1).



**Figure 1: Regulation of AMPK.** AMPK is a metabolic sensor which is activated by different stresses. Excitotoxic and oxidative stresses promote respectively the activation of CamKKII and TAK1 that phosphorylate AMPK on its residue Thr<sup>172</sup> which is necessary for its activation. Metabolic stress induces an increase of the AMP/ATP ratio that promotes AMP binding to the  $\gamma$  subunit of AMPK. This induces a conformational change that allows the phosphorylation of AMPK by LKB1. Once activated, AMPK triggers catabolic pathways and represses anabolic pathways in order to maintain energetic homeostasis. ROS: reactive oxygen species; CamKKII: Calcium/calmodulin kinase kinase II; LKB1: liver kinase B1; TAK1: transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1; NMDAR: N-methyl D-aspartate receptor. Figure was produced in part using Servier MedicalArt.

In this chapter, we will review the current literature regarding AMPK involvement in the development of main neurodegenerative diseases that include Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's and Amyotrophic lateral sclerosis and discuss the possible common pathological mechanisms involved. It is also important to note that AMPK is also studied in the context of ischemic stroke in animal models. While ischemic stroke can be considered as a neurodegenerative disease, the involvement of AMPK in this context has already been the subject of many reviews (Manwani and McCullough, 2013, Weisova et al., 2011) and will not be discussed here.

## 2. AMPK in neurodegenerative diseases

### 2.1. Alzheimer's disease (AD)

AD is a progressive neurodegenerative disorder characterized by memory loss and behavioral abnormalities that are correlated with neuronal and synaptic degeneration in specific brain areas. Brain regions are sequentially affected by the pathology starting from the entorhinal cortex to the hippocampus and whole neocortex following cortico-cortical connexions. At the histological level, AD is characterized by the presence in the brain of senile plaques and neurofibrillary tangles. Senile plaques result from the extracellular aggregation of a peptide called Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ).  $A\beta$  peptides are produced upon the sequential proteolytic processing of its precursor protein (APP) by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases. Neurofibrillary tangles are composed of paired helical filaments that result from the intracellular aggregation of hyper- and abnormally phosphorylated tau proteins. While the exact role of APP and  $A\beta$  remains to be clearly established, tau is a microtubule associated protein whose main function which is regulated by phosphorylation consists on the regulation of microtubule dynamics. There are some rare familial forms of AD which present mutations in APP, Presenilin-1 or Presenilin-2 genes; the latter two being the core components of the  $\gamma$ -secretase complex. However, the vast majorities of AD cases are of sporadic origin and are likely driven by a combination of genetic and environmental factors. The main genetic risk factor is the allele  $\epsilon 4$  of *APOE* (coding for Apolipoprotein E); in addition, other risks factors have been identified following genome-wide association studies and include *CLU* (coding for clusterin), *CRI* (coding for the complement component receptor 1), *PICALM*, and *BINI* (Lambert et al., 2009, Harold et al., 2009, Seshadri et al., 2010). Environmental factors include age, arterial hypertension, obesity, diabetes, and metabolic syndrome (review in (Barberger-Gateau et al., 2013)).

Beside senile plaques and neurofibrillary tangles, perturbations in calcium homeostasis, oxidative stress, and energy metabolism defects are observed in the brain of AD patients (Bezprozvanny and Mattson, 2008, Green and LaFerla, 2008, Mattson, 2007, Sayre et al., 2008). For instance, positron emission tomography (PET) imaging with the 2-[ $^{18}F$ ]-fluorodeoxyglucose (FDG) tracer is used as a



diagnostic marker in AD where reduced glucose energy metabolism can be observed even at early stages of the disease (Mosconi, 2005, Ferreira et al., 2010). Additionally, mitochondrial dysfunctions are also commonly described to be associated with AD (for review see: (Cabezas-Opazo et al., 2015)). These include mitochondrial morphology, dynamics and bioenergetics defects (DuBoff et al., 2013, Bubber et al., 2005, Garcia-Escudero et al., 2013). Interestingly, these mitochondrial abnormalities were found to be restricted to vulnerable neurons and to occur in neurons lacking neurofibrillary tangles thus suggesting that they could represent an early event in AD (Hirai et al., 2001). Additionally, mitochondrial axonal transport is also impaired (Wang et al., 2015, Sheng, 2014). Both amyloid and tau proteins have been shown to induce mitochondrial dysfunctions (Grimm et al., 2016). Conversely, studies also report that mitochondrial complex I and III dysfunctions associated to reactive oxygen species (ROS) generation enhance A $\beta$  production both *in vitro* and *in vivo* (Leuner et al., 2012).

AMPK was found to be deregulated in AD brains where immunohistochemistry studies revealed that activated AMPK co-localized with hyperphosphorylated tau in pre-tangle and tangle-bearing neurons (Vingtdeux et al., 2011b). In addition, AMPK activation in AD was also demonstrated by western-blotting where phosphorylated AMPK was significantly up-regulated in AD brains as well as in APP<sup>SWE,IND</sup>(J20) and APP<sup>SWE</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mice models of the disease (Ma et al., 2014, Mairet-Coello et al., 2013, Son et al., 2012). AMPK deregulation was also observed in Tauopathies, a subset of neurodegenerative disorders characterized by the presence of abnormally and hyperphosphorylated tau proteins, including tangle-predominant dementia, Guam Parkinson dementia complex, Pick's disease, frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17, corticobasal degeneration, progressive supranuclear palsy, and agyrophilic grain disease (Vingtdeux et al., 2011b).

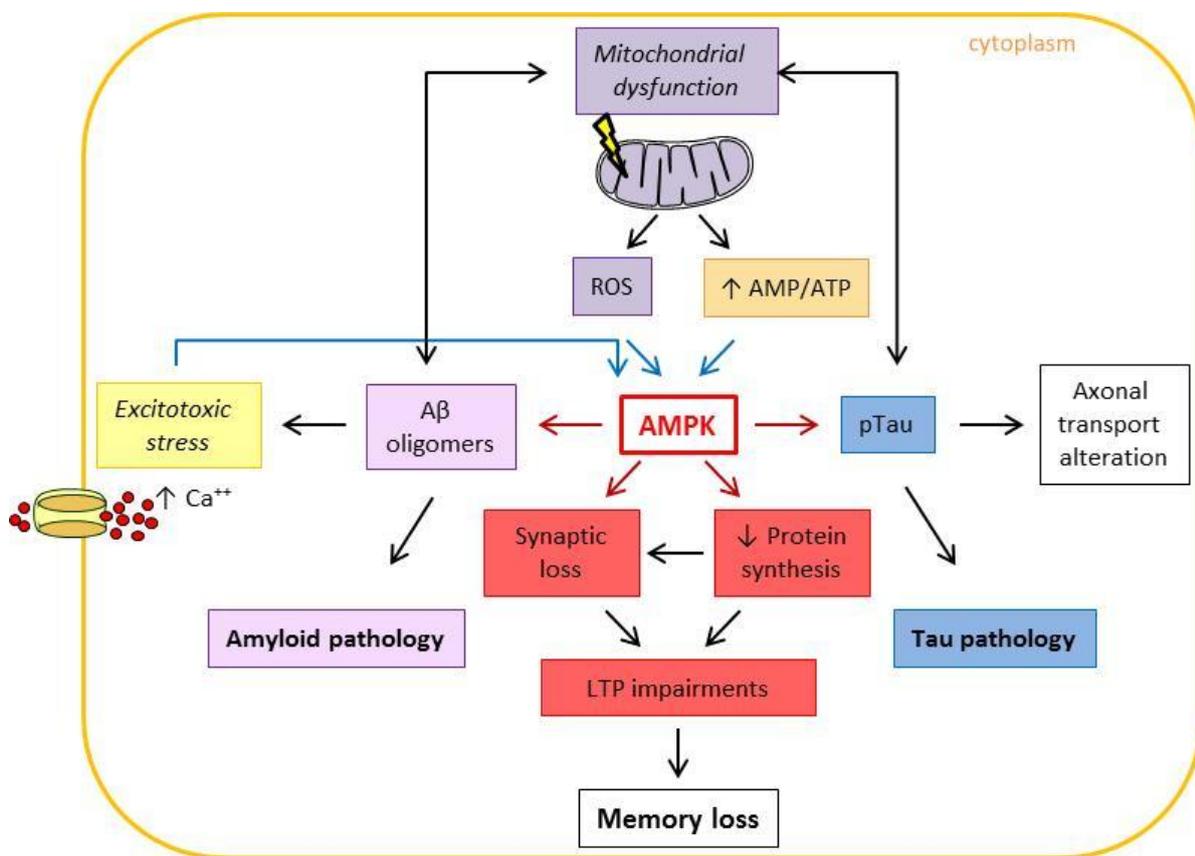
The exact role played by AMPK in AD remains controversial. The fact that AMPK co-localizes with hyperphosphorylated tau in AD led to the hypothesis that AMPK could represent a new tau kinase. Indeed, *in vitro* studies using recombinant proteins showed that AMPK could phosphorylate tau *in vitro* at several epitopes including Thr<sup>231</sup>, Ser<sup>262</sup>, Ser<sup>356</sup>, and Ser<sup>396/404</sup> (Thornton et al., 2011, Vingtdeux et al., 2011b). In cellular models, AMPK was also found to phosphorylate tau under stress conditions (Thornton et al., 2011). More particularly, A $\beta$  oligomers were found to induce specifically AMPK  $\alpha$ 1 subunit activation by increasing intracellular calcium concentration and subsequent CamKKII activation. This A $\beta$ -oligomers-mediated AMPK activation was suggested to induce tau phosphorylation at epitopes Ser<sup>262</sup> and Ser<sup>396/404</sup> in primary neuronal cultures (Thornton et al., 2011). In addition, it was postulated that this pathway was responsible for the toxic effects induced by A $\beta$  oligomers on translational block (Yoon et al., 2012), dendritic spines (Mairet-Coello et al., 2013), and synaptic plasticity (Ma et al., 2014). Indeed AMPK activation following 2-deoxy-D-glucose (2-DG) or A $\beta$  oligomers treatment was found to impair long-term potentiation (LTP) in *ex-vivo* hippocampal slices (Potter et al., 2010, Ma et al., 2014). These results were corroborated in APP<sup>SWE</sup>/PS1<sup>dE9</sup>

transgenic animals where AMPK inhibition was found to rescue the LTP impairments mediated by A $\beta$  (Ma et al., 2014). In these studies AMPK negative effects on synaptic plasticity were found to be the result of decreased protein synthesis through mTORC1 and eEF2 pathways respectively (Potter et al., 2010, Ma et al., 2014). On the contrary, other studies reported that AMPK activation induced by leptin or metformin reduced tau phosphorylation (Greco et al., 2009, Greco et al., 2011, Kickstein et al., 2010). The effect of metformin might however be AMPK-independent. Indeed, metformin was suggested to induce protein phosphatase 2A (PP2A) activation thereby leading to tau dephosphorylation (Kickstein et al., 2010). In a recent study, AMPK modulation was also related to tau dephosphorylation and rather correlated to AMPK phosphorylation at Ser<sup>485</sup>, which is thought to be an inhibitory AMPK phosphorylation site prohibiting further phosphorylation at epitope Thr<sup>172</sup> (Horman et al., 2006). In conditions of metabolic syndrome, insulin resistance or glucose depletion, tau phosphorylation might be differently regulated either because AMPK activation status could differ or because other tau kinases and phosphatases might be involved (Kim et al., 2015). While these findings are somehow controversial, it is clear that tau is an AMPK target either direct or indirect depending on the environmental conditions. Tau epitopes regulated by AMPK include Ser<sup>262</sup> and Ser<sup>356</sup> which are KXGS domains located in tau microtubules binding repeat regions. Phosphorylation of these particular epitopes regulates tau affinity for microtubules (Fischer et al., 2009). As a consequence AMPK-mediated tau phosphorylation might control tau binding with microtubules and thereby axonal transport of cargos including mitochondria (Sato-Harada et al., 1996, Reddy, 2011). Tau Thr<sup>231</sup> is another central epitope since it was reported to serve as a priming site for GSK3 $\beta$ , a very important tau kinase participating to tau hyperphosphorylation and aggregation (Lin et al., 2007).

AMPK was also found to be involved in APP metabolism. A decrease of A $\beta$  production was reported in primary neurons after AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) dependent AMPK stimulation; conversely, A $\beta$  levels were increased in primary neurons lacking the AMPK  $\alpha$ 2 subunit (Won et al., 2010). Opposite results have also been obtained, and for instance AMPK activation following metformin treatment was reported to increase the transcription of BACE1, one of the enzymes involved in A $\beta$  production and hence to be associated with increased A $\beta$  levels (Chen et al., 2009). The effect of AMPK on A $\beta$  production and/or degradation is likely to be controlled by energy status given that depending on the extracellular glucose concentrations opposite results are obtained (Yang et al., 2015). As a master regulator of autophagy, AMPK activation following resveratrol or AICAR treatment was found to reduce A $\beta$  secretion by increasing its degradation through the autophagic/lysosomal pathway (Vingtdeux et al., 2010, Vingtdeux et al., 2011a). In general, AMPK activation might be beneficial by helping clearing protein aggregates through autophagy induction. However, in latter stages of the disease, lysosomal-mediated degradation is impaired (Nixon and Yang, 2011), consequently, increasing autophagosomes production without increasing autophagic flux might have deleterious consequences. Indeed, inhibition of autophagic flux will decrease the

degradation of misfolded proteins including A $\beta$  and tau (Pickford et al., 2008, Wang et al., 2010) as well as dysfunctional mitochondria. In addition, autophagosomes accumulation might be a source for A $\beta$  production (Yu et al., 2005) thereby inducing a vicious circle.

In conclusion, these data support a role for AMPK in AD as an upstream player in the pathology development. Overall, AMPK could play a role in AD by participating in A $\beta$  production and/or clearance as well as on tau phosphorylation, the two hallmarks of AD. Additionally, AMPK was found to mediate the toxic effects of A $\beta$  on synaptic numbers and plasticity. These detrimental effects of AMPK in the latter stages of AD are summarized in Figure 2.



**Figure 2: Harmful roles of AMPK in the late stages of Alzheimer's disease.** Alzheimer's disease is characterized by excitotoxicity as well as metabolic and oxidative stresses. Mitochondrial dysfunction eventually leads to the production of ROS and to the increase of the AMP/ATP ratio that correspond respectively to oxidative and metabolic stresses. These two events activate AMPK which in return decreases protein synthesis ultimately leading to synaptic loss and LTP impairments that contribute to memory loss. AMPK is also involved in tau and amyloid pathologies. On one side, AMPK phosphorylates tau protein thereby altering microtubules assembly and as a result axonal transport of vesicles and mitochondria. On the other side, AMPK play a part in the production and degradation of A $\beta$  peptides. Finally, A $\beta$  and tau might contribute to the chronic activation of AMPK by inducing mitochondrial impairments and excitotoxicity. LTP: long term potentiation; ROS: reactive oxygen species. Figure was produced in part using Servier Medical Art.

## 2.2. Parkinson's disease (PD)

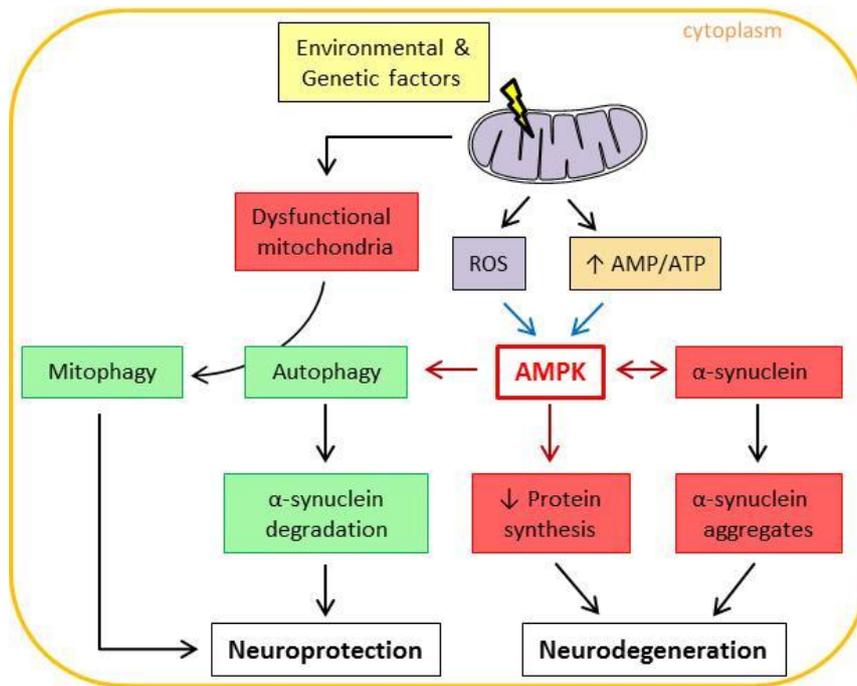
PD is characterized by resting tremor, rigidity, bradykinesia, gait disturbance, and postural instability. Pathological features include loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra associated with Lewy bodies inclusions (Beitz, 2014). These Lewy bodies are mainly composed of aggregated  $\alpha$ -synuclein. PD etiology involves many genetic and environmental factors (Olanow and Tatton, 1999, Verstraeten et al., 2015). While the majority of cases are sporadic, mutations in a number of genes were identified to be responsible for rare familial forms of the disease. These genes include *SNCA* (coding for  $\alpha$ -synuclein), *Park2* (coding for the cytosolic E3 ubiquitin ligase Parkin), and *PINK1* (coding for PTEN-induced kinase 1). In addition, genetic variants have been identified as PD risk alleles in *LRRK2* (leucine-rich repeat kinase 2), *SNCA*, H1 haplotype of microtubule-associated protein tau, and *GBA* (coding for beta acid glucosidase) (for review see (Verstraeten et al., 2015)). Environmental factors include exposure to environmental toxins (pesticides, herbicides and industrial chemicals), and drugs of abuse (Olanow and Tatton, 1999).

Interestingly, many of these genetic and environmental factors are linked to mitochondrial function. For example, PINK1 is localized to the mitochondria where it exerts a protective role that is abolished by mutations, overall resulting in a cellular increased susceptibility to stress (Valente et al., 2004). Parkin is a protein that was found to be recruited specifically to dysfunctional mitochondria to promote their degradation by the autophagic pathway (Narendra et al., 2008), referred to as mitophagy (for review see: (Youle and Narendra, 2011)). In addition, PINK1 was found to activate Parkin on impaired mitochondria (Narendra et al., 2010). Therefore, it was proposed that parkin might be involved in mitochondrial quality control as a way to remove damaged mitochondria. Additionally,  $\alpha$ -synuclein itself was also reported to induce mitochondrial alterations in neuronal cells and transgenic mice (Hsu et al., 2000, Martin et al., 2006). As for sporadic cases, a decrease in the activity of mitochondrial respiratory chain complex I was found in the substantia nigra of PD patient's brain (Schapira et al., 1990). Complex I was found to be functionally impaired i.e. oxydatively damaged and misassembled (Keeney et al., 2006). In addition, regarding environmental risk factors, many pesticides and 1-methyl-4-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) share the common mechanism of causing mitochondrial dysfunction (Scherer et al., 2002). Finally, FDG-PET studies also demonstrated marked reductions in glucose metabolism in the brain of PD patients (Eckert *et al.*, 2005).

AMPK deregulation was observed in the brain of PD patients where activated AMPK was found near the ream of Lewy bodies in the cytoplasm as opposed to control individuals where AMPK was mainly nuclear (Jiang et al., 2013). AMPK activation was also reported in animal models of PD induced by intra-striatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) or MPTP (Kim et al., 2013, Choi et al., 2010). On the contrary,  $\alpha$ -synuclein expression in cell models was reported to down-regulate AMPK activation (Dulovic et al., 2014). Whether AMPK activation is beneficial or detrimental in PD remains

controversial. AMPK activation was reported in some instance to be detrimental given that further activation of AMPK for example following metformin administration significantly enhanced dopaminergic neurons degeneration induced by 6-OHDA whereas over-expression of a dominant-negative AMPK in the striatum reduced dopaminergic neurons degeneration following 6-OHDA (Kim et al., 2013). In cellular models, PD toxins (6-OHDA, MPP+ or rotenone) induced AMPK activation and Akt inactivation that cooperatively contributed to the downregulation of mTOR-mediated S6K1 (ribosomal p70 S6 kinase) and 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1), thereby leading to neuronal cell death (Xu et al., 2014). AMPK might also participate in Lewy bodies accumulation through direct phosphorylation of  $\alpha$ -synuclein (Jiang et al., 2013) that could impair the clearance of its aggregates (Tenreiro et al., 2014). On the opposite, AMPK activation using AICAR or metformin was reported to reduce the toxicity mediated by  $\alpha$ -synuclein (Dulovic et al., 2014). AMPK also protected cells against rotenone toxicity by enhancing autophagy (Hou et al., 2015). This AMPK-induced autophagic pathway also regulates  $\alpha$ -synuclein degradation following resveratrol treatment (Wu et al., 2011). AMPK might also participate in mitochondrial function regulation in PD. Results obtained in *Drosophila melanogaster* models suggest that AMPK activation could be beneficial for familial forms of PD that present mutations in Parkin or LRRK2. Indeed, genetic inactivation of AMPK was reported to reduce the beneficial effects of epigallocatechin gallate (EGCG), an antioxidant found in green tea, in mutant LRRK2 and Parkin-null flies (Ng et al., 2012). In addition, results obtained from patient's primary fibroblasts presenting Park2 mutations also suggest that the beneficial effects on mitochondrial function and autophagy induced by resveratrol were due to AMPK activation (Ferretta et al., 2014).

Altogether these studies highlight the potential double role that can be played by AMPK in PD (Fig. 3). On one side, AMPK could be neuroprotective by participating for example in mitochondrial quality control; yet under other circumstances, AMPK could participate in neurodegeneration.



**Figure 3: Dual role of AMPK in Parkinson's disease.** Environmental and genetic risk factors are involved in the buildup of mitochondrial alterations. These alterations eventually lead to oxidative stress through the production of ROS and to metabolic stress via an increase of the AMP/ATP ratio. These stresses induce the activation of AMPK which phosphorylates  $\alpha$ -synuclein, the latter promoting its aggregation and ultimately neurodegeneration. Neurodegeneration might also result from decreased protein synthesis triggered by AMPK activation. On the contrary, AMPK could also exert a neuroprotective effect in particular by inducing the degradation of damaged mitochondria and  $\alpha$ -synuclein aggregates via autophagy. ROS: reactive oxygen species. Figure was produced in part using Servier Medical Art.

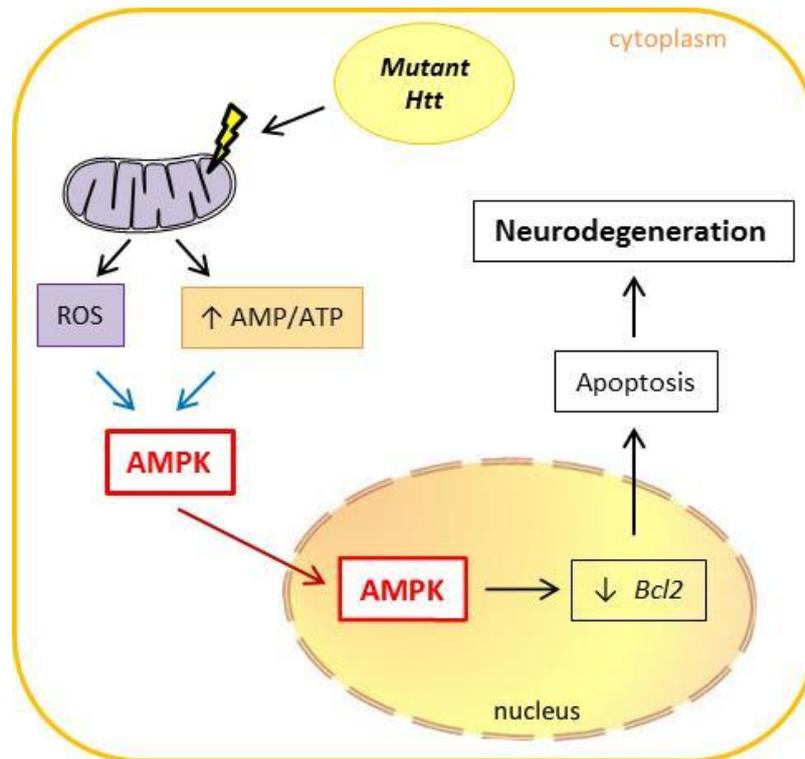
### 2.3. Huntington's disease (HD)

Clinical manifestations of HD include motor disturbances comprising chorea and dystonia, and cognitive and behavioral dysfunctions. HD is characterized by the loss of medium spiny neurons in the striatum and eventually more widespread loss of cortical, thalamic, hippocampal and hypothalamic neurons. Another characteristic of the disease is the appearance of nuclear and cytoplasmic inclusions that contain mutant huntingtin and polyglutamine (Walker, 2007). HD is an autosomal dominant genetic disease that is induced by the repetition of a polyglutamine CAG triplet repeat in the exon 1 of the huntingtin (Htt) gene with 41 or more polyQ repeats being fully penetrant ('A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group,' 1993). These repeats might confer a toxic gain of function for mutant Htt (mHtt) or a loss of normal Htt function (Zuccato et al., 2010). The physiological role of Htt remain poorly understood, however, it was suggested to be involved in axonal, vesicular and mitochondrial transport (Smith et al., 2009, Tian et al., 2014).

In HD, mitochondrial dynamics, fusion and fission mechanisms as well as the activity of enzymes involved in oxidative phosphorylation are disturbed (Shirendeb et al., 2011, Song et al., 2011, Browne et al., 1997, Gu et al., 1996). These perturbations have for consequence to increase the accumulation of fragmented and damaged mitochondria and thus the levels of oxidative stress. Additionally, mitophagy defects were also proposed to participate in the disease progression (Wong and Holzbaur, 2014). A selective impairment of glycolytic metabolism in the striatum of HD patient early in the course of their disease was observed by *in vivo* PET measurements (Powers et al., 2007). This glucose hypometabolism in the early stages of the disease was also reported in the cerebral cortex and in the brain caudate (Shin et al., 2013, Ciarmiello et al., 2012). Deficits in glycolysis have also been reported in striatal neurons in a rat model of the disease (Gouarne et al., 2013). Huntingtin itself might play a role in glycolysis. Indeed, Htt was found to interact with the glycolytic enzyme GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (Burke et al., 1996). However, studies of HD patients brains did not conclusively find an alteration of GAPDH activity (Browne et al., 1997, Tabrizi et al., 1999, Kish et al., 1998, Olah et al., 2008). GAPDH was described to bear additional functions unrelated to its energetic role. GAPDH might act in concert with the ubiquitin-E3-ligase Siah1 to induce mHtt neurotoxicity by assisting its nuclear translocation (Bae et al., 2006). Huntingtin could also be involved in fast axonal transport by scaffolding GAPDH on vesicles thereby providing on-board energy (Zala et al., 2013). Finally, a recent study demonstrated that mHtt interfered with mitophagy. Indeed, mHtt was found to affect GAPDH-driven mitophagy thereby leading to the accumulation of damaged mitochondria (Hwang et al., 2015).

The  $\alpha 1$  subunit of AMPK seems to be particularly involved in HD pathogenesis. Indeed, it was found to be activated in the nucleus of striatal neurons where it was suggested to down-regulate the anti-apoptotic protein Bcl2 thus inducing cell death (Ju et al., 2011) (Fig. 4). Accumulation of activated AMPK was also reported in the striatum of transgenic mouse models of HD, R6/2 mice harboring exon 1 of the human Htt gene with 144 CAG repeats (Chou et al., 2005, Mochel et al., 2012, Ju et al., 2014). This over-activation of AMPK could be reversed by activating  $A_{2A}$  receptors using an agonist, additionally diminishing the HD-like pathology in these animals (Chou et al., 2005, Ju et al., 2011).  $A_{2A}$  receptors signaling pathway involves PKA activation. PKA was reported to phosphorylate AMPK  $\alpha 1$  at residue Ser<sup>173</sup>, thereby preventing the activating phosphorylation at Thr<sup>172</sup> (Djouder et al., 2010). Additionally, AMPK activation in this mouse model might also result from increased oxidative stress (Ju et al., 2014). On the contrary, in cellular models, AMPK activation through viniferin treatment was reported to provide neuroprotection against mHtt (Fu et al., 2012). Finally, metformin, which can activate AMPK was reported to be beneficial in males R6/2 (Ma et al., 2007). However, the exact mechanism behind metformin beneficial effects remains to be determined.

Overall, these studies also highlight AMPK signaling pathway as a potential player in the pathology of HD.



**Figure 4: Model of AMPK mediated-apoptosis in Huntington’s disease.** Mutant Huntingtin induces mitochondrial alterations that lead to oxidative stress and hypometabolism. These participate to the activation of AMPK and to its translocation from the cytoplasm to the nucleus where AMPK down-regulates the anti-apoptotic protein Bcl2. This pathway promotes apoptosis and thereby neurodegeneration. ROS: reactive oxygen species; Htt: Huntingtin. Schematic is adapted from (Ju et al., 2011). Figure was produced in part using Servier Medical Art.

#### 2.4. Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)

ALS is characterized by the progressive loss of upper and lower motor neurons at the spinal or bulbar level (Rowland and Shneider, 2001). The most common symptoms of ALS are muscle weakness, muscular atrophy, spasticity and eventually paralysis. While the exact cause of the disease is unknown, around 10% of familial forms exist involving for example the *SOD1* gene (superoxide dismutase 1), *TARDBP* (encoding TAR DNA-binding protein 43), *FUS* (fused in sarcoma), and hexanucleotide repeat expansion in *C9ORF72* (Zarei et al., 2015, Renton et al., 2014). The sporadic forms of the disease might be driven by genetic and lifestyle risk factors (Ingre et al., 2015). At the histological level, ALS is characterized by the aggregation of ubiquitinated proteins that can include TDP43, p62, and FUS in affected neurons (Blokhuis et al., 2013). ALS is associated with defects in energy metabolism comprising weight loss, increase resting energy expenditure (hypermetabolism), and hyperlipidemia (Dupuis et al., 2011). The precise origin of these metabolic dysfunctions remains unclear.



AMPK activation was found to be deregulated in motor neurons of ALS patients (Liu et al., 2015b). In cells and mouse models of the disease, AMPK regulation differs according to the model used. In the mSOD1<sup>G93A</sup> mouse model, AMPK activity is increased in spinal cords from symptom onset (Lim et al., 2012, Perera et al., 2014, Zhao et al., 2015). Similar results were obtained *in vitro*, in spinal cord cultures, motor neuron cell lines expressing mutant SOD1, and embryonic neural stem cells derived from SOD1<sup>G93A</sup> mice (Lim et al., 2012, Perera et al., 2014, Sui et al., 2014). On the opposite, AMPK activation was reported to be downregulated in mutant TDP43<sup>A315T</sup> mouse models spinal cord and brain (Perera et al., 2014). Similar results were also obtained in motor neuronal cell lines expressing mutant TDP-43, probably as a consequence of increased PP2A activity (Perera et al., 2014). On the contrary, AMPK activity was reported to be increased in the spinal cord of a mouse model over-expressing wild-type TDP43 (Liu et al., 2015b). AMPK was also suggested to be involved in TDP-43 mislocalization from the nucleus to the cytoplasm (Liu et al., 2015a). Similarly, AMPK activation was described to induce the human antigen R (HuR, a major mRNA stabilizer recently shown to regulate TDP-43 and FUS (Lu et al., 2014)) delocalization by directly phosphorylating importin- $\alpha$ 1 (Liu et al., 2015b). The impact of AMPK activation in this disease remains a matter of debate. Indeed, modulation of AMPK activity in these various models have given conflicting data. Metformin administration in SOD1<sup>G93A</sup> mice accelerated disease onset and progression in females only (Davis and Lin, 2011) while resveratrol was found to provide beneficial effects (Mancuso et al., 2014, Song et al., 2014). The beneficial effect of resveratrol could act in part through an increase of Sirtuin 1 expression, normalization of autophagic flux and reduced oxidative stress (Mancuso et al., 2014, Song et al., 2014). Similarly, preconditioning with latrepirdine, a small molecule shown to activate AMPK (Weisova et al., 2013) was reported to delay symptoms onset and to increase lifespan of SOD<sup>G93A</sup> mice (Coughlan et al., 2015). Decreasing AMPK activity in cell cultures or in *Caenorhabditis elegans* expressing mutant SOD1 or TDP43 was reported to be beneficial (Mancuso et al., 2014) and to rescue TDP43 mislocalization in motor neuronal cells and to delay disease progression in TDP43 wild-type mice (Liu et al., 2015b). Finally, AMPK  $\alpha$ 2 deficient mice were recently described to present gait abnormalities resembling early stages of ALS supporting a key role for AMPK in the development of this disease (Vergouts et al., 2015).

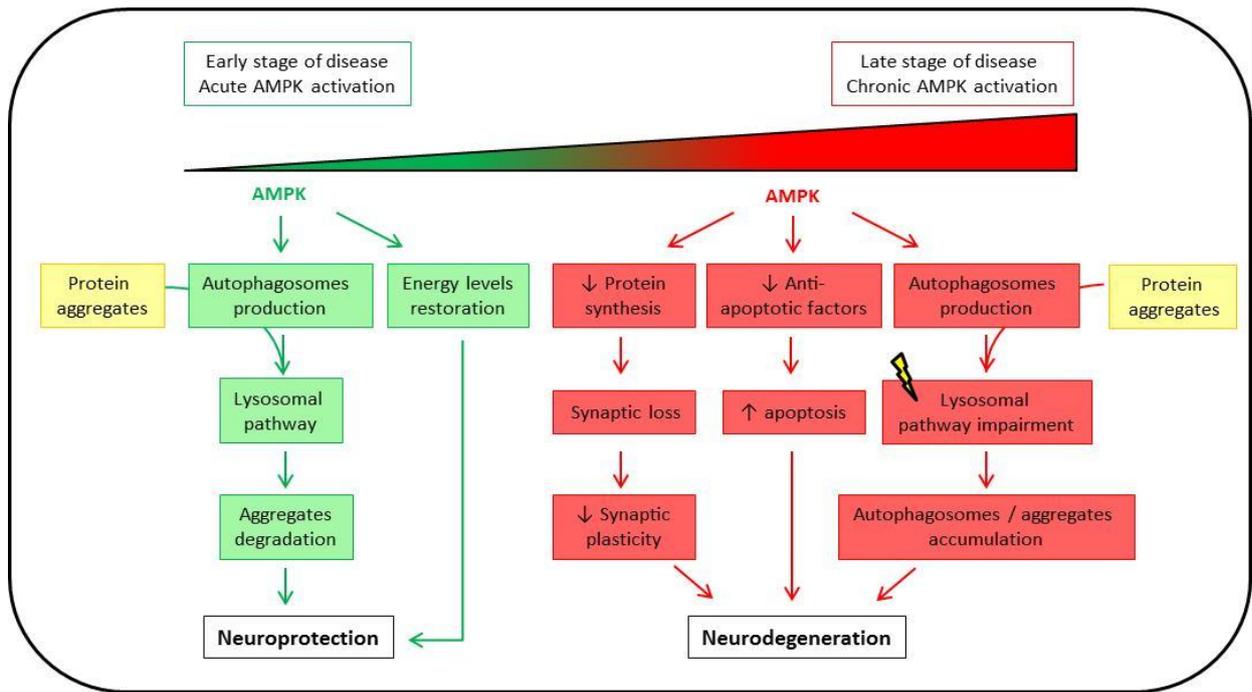
In conclusion, the role played by AMPK in ALS might vary according to the nature of the disease as mutations in SOD1 and TDP43 were reported to affect differently the kinase.

### 3. General considerations

The specific vulnerability of the neuronal populations affected in each of these diseases is likely to be driven by both genetic and environmental factors. Interestingly, many of these factors converge to an impairment of cellular energy metabolism. This is the case for instance of mutations in genes that are

directly involved in mitochondrial function or clearance (such as SOD1, PINK1 and Parkin). These mitochondrial dysfunctions might contribute to the increase neuronal excitotoxicity and AMPK deregulation. In addition to impairing energy metabolism, mitochondrial insults can cause an imbalance between ROS production and removal, thereby participating in oxidative stress, another common factor of these diseases (Sayre et al., 2008). This oxidative stress through the activation of TAK1 might also contribute to the chronic activation of AMPK. Conversely, given its role on mitochondria function, biogenesis, and degradation, it is also possible that AMPK participates in the establishment of mitochondrial dysfunctions that are observed in these diseases. Whether AMPK deregulation is triggered by these metabolic perturbations or could be involved in their development will be an important issue to investigate.

While AMPK is highly expressed in neurons, its physiological function remains poorly studied. Nonetheless, AMPK is vital for neuronal survival. Indeed, results obtained in *Drosophila* demonstrated that genetic ablation of AMPK subunits  $\gamma$  (*lochrig* mutant, (Tschape et al., 2002)) or  $\beta$  (*alicorn* mutant, (Spasic et al., 2008)) induce progressive neurodegeneration. Although it is becoming increasingly evident that AMPK might participate in these neurodegenerative diseases development, whether this activation is beneficial or detrimental remains matter of debate. In general, the contradictory results that have been obtained *in vivo* regarding the beneficial or detrimental role of AMPK could also be due to peripheral AMPK activity. Several papers reported beneficial effects of peripheral AMPK activation on cognition. For instance it was shown that AMPK activation following AICAR administration in mice enhanced endurance and spatial memory in the Morris water maze (Kobilo et al., 2014). AICAR blood-brain barrier permeability is very low (Marangos et al., 1990), therefore its effects on cognition or on the brain in general are likely to be indirect. The beneficial effects of AICAR reported in the Kobilo *et al.* study were demonstrated to be mediated by muscle AMPK activation since mice over-expressing a muscle-specific dominant negative of AMPK  $\alpha 2$  did not show any improvements following AICAR administration. These behavioral improvements were suggested to result from enhanced dentate gyrus neurogenesis in AICAR treated animals (Kobilo et al., 2011). On the contrary direct administration of AICAR in the brain by means of intracerebral infusions was found to impair memory functions (Dash et al., 2006) and lead to excitotoxicity in an HD mouse model (Ju et al., 2011). As a consequence, it is very important to take into account the drug used to activate or inhibit AMPK and its administration route to determine the impact of peripheral AMPK activation in addition to its central regulation before drawing conclusions.



**Figure 5: AMPK in neurodegenerative diseases, friend or foe?** At the onset of neurodegenerative diseases, activation of AMPK might be beneficial since it allows the restoration of energetic homeostasis and the elimination of protein aggregates which are often reported to be toxic for neurons. Indeed, AMPK promotes the formation of autophagosomes in order to induce protein aggregates and impaired mitochondria degradation through the autophagy/lysosomal pathway. On the other hand, in the late stages of these diseases, chronic AMPK activation becomes disadvantageous for neurons. This over-activation of AMPK could lead to neurodegeneration through several signaling pathways. Decreasing protein synthesis could drive synaptic loss and impair synaptic plasticity subsequently leading to neurodegeneration. Decreasing anti-apoptotic factors could lead to induction of apoptosis and neurodegeneration. Finally, the production of autophagosomes combined with an alteration of lysosomal clearance (which is often reported to occur in these disorders), in the end, leads to the accumulation of autophagosomes and contributes to upsurge the levels of toxic protein aggregates and defective mitochondria.

It is very likely that AMPK could act both as a friend and as a foe during the course of these neurodegenerative diseases progression. Indeed, AMPK might be activated in the early stages of these diseases to help maintain or restore neuronal energy metabolism. However, chronic AMPK activation would eventually become detrimental to brain functions by repressing pathways that consume energy. Overall, several common mechanisms regulated by AMPK can be identified and are summarized in Fig. 5. For instance, the beneficial effects of AMPK often involve an increase of the autophagy pathway that might be involved in the clearance of misfolded proteins, protein aggregates or defective mitochondria. It was also reported that AMPK might activate PP2A thereby reducing the phosphorylation status of tau and  $\alpha$ -synuclein. On the opposite, the deleterious impact of AMPK implies the phosphorylation of proteins which aggregates represent the common hallmarks of these

diseases, including tau, A $\beta$ , and  $\alpha$ -synuclein. Additionally, AMPK chronic activation by repressing protein synthesis could, on the long term, impair synaptic integrity and plasticity, and eventually lead to cell death.

#### **4. Conclusion**

While the clinical manifestations, neuronal populations affected and proteins involved differ widely between these diseases, energy metabolism perturbations are often reported early in the course of these diseases progression. These metabolic perturbations might result from the various environmental and genetic risk factors that drive these pathologies as it is already well acknowledge for mutations that affect directly mitochondrial functions. As a consequence, one can expect AMPK over-activation to be an additional early feature of these disorders. Hence, AMPK was suggested to participate in these diseases progression by contributing in the establishment of the observed lesions mainly by regulating the clearance and post-translational modifications of the proteins forming the respective aggregates. Additionally, AMPK chronic over-activation might participate to neurodegeneration by repressing energy consuming pathways.

Given the demographic trend towards an aging population, the prevalence of these neurodegenerative diseases and thus their socioeconomic burden will continue to increase dramatically in the next decades. The current treatments are only symptomatic; there are no therapies available to cure these diseases. As a consequence, there is a need to better understand the underlying disease mechanisms in order to underpin the development of new diagnostic and therapeutic approaches. In this context, AMPK signaling pathways might be particularly interesting.

#### **5. Acknowledgments**

This work was supported by the French Fondation pour la coopération Scientifique – Plan Alzheimer 2008-2012 (Senior Innovative Grant 2013). MD holds a doctoral fellowship from Lille 2 University.

#### **6. References**

- Abbud, W., Habinowski, S., Zhang, J. Z., Kendrew, J., Elkairi, F. S., Kemp, B. E., Witters, L. A. and Ismail-Beigi, F. (2000) 'Stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) is associated with enhancement of Glut1-mediated glucose transport', *Arch Biochem Biophys*, 380(2), pp. 347-52.
- Abnous, K. and Storey, K. B. (2008) 'Skeletal muscle hexokinase: regulation in mammalian hibernation', *Mol Cell Biochem*, 319(1-2), pp. 41-50.

- Bae, B. I., Hara, M. R., Cascio, M. B., Wellington, C. L., Hayden, M. R., Ross, C. A., Ha, H. C., Li, X. J., Snyder, S. H. and Sawa, A. (2006) 'Mutant huntingtin: nuclear translocation and cytotoxicity mediated by GAPDH', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(9), pp. 3405-9.
- Barberger-Gateau, P., Lambert, J. C., Feart, C., Peres, K., Ritchie, K., Dartigues, J. F. and Alperovitch, A. (2013) 'From genetics to dietetics: the contribution of epidemiology to understanding Alzheimer's disease', *J Alzheimers Dis*, 33 Suppl 1, pp. S457-63.
- Beitz, J. M. (2014) 'Parkinson's disease: a review', *Front Biosci (Schol Ed)*, 6, pp. 65-74.
- Bezprozvanny, I. and Mattson, M. P. (2008) 'Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease', *Trends Neurosci*, 31(9), pp. 454-63.
- Blokhuys, A. M., Groen, E. J., Koppers, M., van den Berg, L. H. and Pasterkamp, R. J. (2013) 'Protein aggregation in amyotrophic lateral sclerosis', *Acta Neuropathol*, 125(6), pp. 777-94.
- Browne, G. J., Finn, S. G. and Proud, C. G. (2004) 'Stimulation of the AMP-activated protein kinase leads to activation of eukaryotic elongation factor 2 kinase and to its phosphorylation at a novel site, serine 398', *J Biol Chem*, 279(13), pp. 12220-31.
- Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M., Bird, E. D. and Beal, M. F. (1997) 'Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia', *Ann Neurol*, 41(5), pp. 646-53.
- Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J. P. and Gibson, G. E. (2005) 'Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications', *Ann Neurol*, 57(5), pp. 695-703.
- Burke, J. R., Enghild, J. J., Martin, M. E., Jou, Y. S., Myers, R. M., Roses, A. D., Vance, J. M. and Strittmatter, W. J. (1996) 'Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH', *Nat Med*, 2(3), pp. 347-50.
- Cabezas-Opazo, F. A., Vergara-Pulgar, K., Perez, M. J., Jara, C., Osorio-Fuentealba, C. and Quintanilla, R. A. (2015) 'Mitochondrial Dysfunction Contributes to the Pathogenesis of Alzheimer's Disease', *Oxid Med Cell Longev*, 2015, pp. 509654.
- Chen, Y., Zhou, K., Wang, R., Liu, Y., Kwak, Y. D., Ma, T., Thompson, R. C., Zhao, Y., Smith, L., Gasparini, L., Luo, Z., Xu, H. and Liao, F. F. (2009) 'Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(10), pp. 3907-12.
- Chen, Z., Shen, X., Shen, F., Zhong, W., Wu, H., Liu, S. and Lai, J. (2013) 'TAK1 activates AMPK-dependent cell death pathway in hydrogen peroxide-treated cardiomyocytes, inhibited by heat shock protein-70', *Mol Cell Biochem*, 377(1-2), pp. 35-44.
- Choi, J. S., Park, C. and Jeong, J. W. (2010) 'AMP-activated protein kinase is activated in Parkinson's disease models mediated by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine', *Biochem Biophys Res Commun*, 391(1), pp. 147-51.
- Chou, S. Y., Lee, Y. C., Chen, H. M., Chiang, M. C., Lai, H. L., Chang, H. H., Wu, Y. C., Sun, C. N., Chien, C. L., Lin, Y. S., Wang, S. C., Tung, Y. Y., Chang, C. and Chern, Y. (2005) 'CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model', *J Neurochem*, 93(2), pp. 310-20.
- Ciarmiello, A., Giovacchini, G., Orobello, S., Bruselli, L., Elifani, F. and Squitieri, F. (2012) '18F-FDG PET uptake in the pre-Huntington disease caudate affects the time-to-onset independently of CAG expansion size', *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 39(6), pp. 1030-6.
- Connolly, N. M., Dussmann, H., Anilkumar, U., Huber, H. J. and Prehn, J. H. (2014) 'Single-cell imaging of bioenergetic responses to neuronal excitotoxicity and oxygen and glucose deprivation', *J Neurosci*, 34(31), pp. 10192-205.
- Coughlan, K. S., Mitchem, M. R., Hogg, M. C. and Prehn, J. H. (2015) "'Preconditioning" with latrepirdine, an adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase activator, delays

- amyotrophic lateral sclerosis progression in SOD1(G93A) mice', *Neurobiol Aging*, 36(2), pp. 1140-50.
- Dash, P. K., Orsi, S. A. and Moore, A. N. (2006) 'Spatial memory formation and memory-enhancing effect of glucose involves activation of the tuberous sclerosis complex-Mammalian target of rapamycin pathway', *J Neurosci*, 26(31), pp. 8048-56.
- Davis, J. D. and Lin, S. Y. (2011) 'DNA damage and breast cancer', *World J Clin Oncol*, 2(9), pp. 329-38.
- Djouder, N., Tuerk, R. D., Suter, M., Salvioni, P., Thali, R. F., Scholz, R., Vaahtomeri, K., Auchli, Y., Rechsteiner, H., Brunisholz, R. A., Viollet, B., Makela, T. P., Wallimann, T., Neumann, D. and Krek, W. (2010) 'PKA phosphorylates and inactivates AMPK $\alpha$  to promote efficient lipolysis', *EMBO J*, 29(2), pp. 469-81.
- DuBoff, B., Feany, M. and Gotz, J. (2013) 'Why size matters - balancing mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease', *Trends Neurosci*, 36(6), pp. 325-35.
- Dulovic, M., Jovanovic, M., Xilouri, M., Stefanis, L., Harhaji-Trajkovic, L., Kravic-Stevovic, T., Paunovic, V., Ardah, M. T., El-Agnaf, O. M., Kostic, V., Markovic, I. and Trajkovic, V. (2014) 'The protective role of AMP-activated protein kinase in alpha-synuclein neurotoxicity in vitro', *Neurobiol Dis*, 63, pp. 1-11.
- Dupuis, L., Pradat, P. F., Ludolph, A. C. and Loeffler, J. P. (2011) 'Energy metabolism in amyotrophic lateral sclerosis', *Lancet Neurol*, 10(1), pp. 75-82.
- Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., Vasquez, D. S., Joshi, A., Gwinn, D. M., Taylor, R., Asara, J. M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M. and Shaw, R. J. (2011) 'Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy', *Science*, 331(6016), pp. 456-61.
- Ferreira, I. L., Resende, R., Ferreira, E., Rego, A. C. and Pereira, C. F. (2010) 'Multiple defects in energy metabolism in Alzheimer's disease', *Curr Drug Targets*, 11(10), pp. 1193-206.
- Ferretta, A., Gaballo, A., Tanzarella, P., Piccoli, C., Capitanio, N., Nico, B., Annese, T., Di Paola, M., Dell'aquila, C., De Mari, M., Ferranini, E., Bonifati, V., Pacelli, C. and Cocco, T. (2014) 'Effect of resveratrol on mitochondrial function: implications in parkin-associated familial Parkinson's disease', *Biochim Biophys Acta*, 1842(7), pp. 902-15.
- Fischer, D., Mukrasch, M. D., Biernat, J., Bibow, S., Blackledge, M., Griesinger, C., Mandelkow, E. and Zweckstetter, M. (2009) 'Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules', *Biochemistry*, 48(42), pp. 10047-55.
- Fu, J., Jin, J., Cichewicz, R. H., Hageman, S. A., Ellis, T. K., Xiang, L., Peng, Q., Jiang, M., Arbez, N., Hotaling, K., Ross, C. A. and Duan, W. (2012) 'trans-(-)-epsilon-Viniferin increases mitochondrial sirtuin 3 (SIRT3), activates AMP-activated protein kinase (AMPK), and protects cells in models of Huntington Disease', *J Biol Chem*, 287(29), pp. 24460-72.
- Garcia-Escudero, V., Martin-Maestro, P., Perry, G. and Avila, J. (2013) 'Deconstructing mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease', *Oxid Med Cell Longev*, 2013, pp. 162152.
- Gouarne, C., Tardif, G., Tracz, J., Latyszenok, V., Michaud, M., Clemens, L. E., Yu-Taeger, L., Nguyen, H. P., Bordet, T. and Pruss, R. M. (2013) 'Early deficits in glycolysis are specific to striatal neurons from a rat model of huntington disease', *PLoS One*, 8(11), pp. e81528.
- Gowans, G. J., Hawley, S. A., Ross, F. A. and Hardie, D. G. (2013) 'AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation', *Cell Metab*, 18(4), pp. 556-66.
- Greco, S. J., Hamzelou, A., Johnston, J. M., Smith, M. A., Ashford, J. W. and Tezapsidis, N. (2011) 'Leptin boosts cellular metabolism by activating AMPK and the sirtuins to reduce tau

- phosphorylation and beta-amyloid in neurons', *Biochem Biophys Res Commun*, 414(1), pp. 170-4.
- Greco, S. J., Sarkar, S., Johnston, J. M. and Tezapsidis, N. (2009) 'Leptin regulates tau phosphorylation and amyloid through AMPK in neuronal cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 380(1), pp. 98-104.
- Green, K. N. and LaFerla, F. M. (2008) 'Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease', *Neuron*, 59(2), pp. 190-4.
- Grimm, A., Schmitt, K. and Eckert, A. (2016) 'Advanced Mitochondrial Respiration Assay for Evaluation of Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease', *Methods Mol Biol*, 1303, pp. 171-83.
- Gu, M., Gash, M. T., Mann, V. M., Javoy-Agid, F., Cooper, J. M. and Schapira, A. H. (1996) 'Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus', *Ann Neurol*, 39(3), pp. 385-9.
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E. and Shaw, R. J. (2008) 'AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint', *Mol Cell*, 30(2), pp. 214-26.
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., Pahwa, J. S., Moskvin, V., Dowzell, K., Williams, A., Jones, N., Thomas, C., Stretton, A., Morgan, A. R., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M. K., Brayne, C., Rubinsztein, D. C., Gill, M., Lawlor, B., Lynch, A., Morgan, K., Brown, K. S., Passmore, P. A., Craig, D., McGuinness, B., Todd, S., Holmes, C., Mann, D., Smith, A. D., Love, S., Kehoe, P. G., Hardy, J., Mead, S., Fox, N., Rossor, M., Collinge, J., Maier, W., Jessen, F., Schurmann, B., Heun, R., van den Bussche, H., Heuser, I., Kornhuber, J., Wiltfang, J., Dichgans, M., Frolich, L., Hampel, H., Hull, M., Rujescu, D., Goate, A. M., Kauwe, J. S., Cruchaga, C., Nowotny, P., Morris, J. C., Mayo, K., Sleegers, K., Bettens, K., Engelborghs, S., De Deyn, P. P., Van Broeckhoven, C., Livingston, G., Bass, N. J., Gurling, H., McQuillin, A., Gwilliam, R., Deloukas, P., Al-Chalabi, A., Shaw, C. E., Tsolaki, M., Singleton, A. B., Guerreiro, R., Muhleisen, T. W., Nothen, M. M., Moebus, S., Jockel, K. H., Klopp, N., Wichmann, H. E., Carrasquillo, M. M., Pankratz, V. S., Younkin, S. G., Holmans, P. A., O'Donovan, M., Owen, M. J. and Williams, J. (2009) 'Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease', *Nat Genet*, 41(10), pp. 1088-93.
- Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., Alessi, D. R. and Hardie, D. G. (2003) 'Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade', *J Biol*, 2(4), pp. 28.
- Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G. and Hardie, D. G. (2005) 'Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase', *Cell Metab*, 2(1), pp. 9-19.
- Hirai, K., Aliev, G., Nunomura, A., Fujioka, H., Russell, R. L., Atwood, C. S., Johnson, A. B., Kress, Y., Vinters, H. V., Tabaton, M., Shimohama, S., Cash, A. D., Siedlak, S. L., Harris, P. L., Jones, P. K., Petersen, R. B., Perry, G. and Smith, M. A. (2001) 'Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease', *J Neurosci*, 21(9), pp. 3017-23.
- Horman, S., Browne, G., Krause, U., Patel, J., Vertommen, D., Bertrand, L., Lavoigne, A., Hue, L., Proud, C. and Rider, M. (2002) 'Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis', *Curr Biol*, 12(16), pp. 1419-23.
- Horman, S., Vertommen, D., Heath, R., Neumann, D., Mouton, V., Woods, A., Schlattner, U., Wallimann, T., Carling, D., Hue, L. and Rider, M. H. (2006) 'Insulin antagonizes ischemia-

- induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491', *J Biol Chem*, 281(9), pp. 5335-40.
- Hou, Y. S., Guan, J. J., Xu, H. D., Wu, F., Sheng, R. and Qin, Z. H. (2015) 'Sestrin2 Protects Dopaminergic Cells against Rotenone Toxicity through AMPK-Dependent Autophagy Activation', *Mol Cell Biol*, 35(16), pp. 2740-51.
- Hsu, L. J., Sagara, Y., Arroyo, A., Rockenstein, E., Sisk, A., Mallory, M., Wong, J., Takenouchi, T., Hashimoto, M. and Masliah, E. (2000) 'alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress', *Am J Pathol*, 157(2), pp. 401-10.
- Hurley, R. L., Anderson, K. A., Franzone, J. M., Kemp, B. E., Means, A. R. and Witters, L. A. (2005) 'The Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases', *J Biol Chem*, 280(32), pp. 29060-6.
- Hwang, S., Disatnik, M. H. and Mochly-Rosen, D. (2015) 'Impaired GAPDH-induced mitophagy contributes to the pathology of Huntington's disease', *EMBO Mol Med*.
- Ingre, C., Roos, P. M., Piehl, F., Kamel, F. and Fang, F. (2015) 'Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis', *Clin Epidemiol*, 7, pp. 181-93.
- Inoki, K., Zhu, T. and Guan, K. L. (2003) 'TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival', *Cell*, 115(5), pp. 577-90.
- Jager, S., Handschin, C., St-Pierre, J. and Spiegelman, B. M. (2007) 'AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(29), pp. 12017-22.
- Jiang, P., Gan, M., Ebrahim, A. S., Castanedes-Casey, M., Dickson, D. W. and Yen, S. H. (2013) 'Adenosine monophosphate-activated protein kinase overactivation leads to accumulation of alpha-synuclein oligomers and decrease of neurites', *Neurobiol Aging*, 34(5), pp. 1504-15.
- Ju, T. C., Chen, H. M., Chen, Y. C., Chang, C. P., Chang, C. and Chern, Y. (2014) 'AMPK-alpha1 functions downstream of oxidative stress to mediate neuronal atrophy in Huntington's disease', *Biochim Biophys Acta*, 1842(9), pp. 1668-80.
- Ju, T. C., Chen, H. M., Lin, J. T., Chang, C. P., Chang, W. C., Kang, J. J., Sun, C. P., Tao, M. H., Tu, P. H., Chang, C., Dickson, D. W. and Chern, Y. (2011) 'Nuclear translocation of AMPK-alpha1 potentiates striatal neurodegeneration in Huntington's disease', *J Cell Biol*, 194(2), pp. 209-27.
- Keeney, P. M., Xie, J., Capaldi, R. A. and Bennett, J. P., Jr. (2006) 'Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled', *J Neurosci*, 26(19), pp. 5256-64.
- Kickstein, E., Krauss, S., Thornhill, P., Rutschow, D., Zeller, R., Sharkey, J., Williamson, R., Fuchs, M., Kohler, A., Glossmann, H., Schneider, R., Sutherland, C. and Schweiger, S. (2010) 'Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(50), pp. 21830-5.
- Kim, B., Figueroa-Romero, C., Pacut, C., Backus, C. and Feldman, E. L. (2015) 'Insulin Resistance Prevents AMPK-induced Tau Dephosphorylation through Akt-mediated Increase in AMPK Ser-485 Phosphorylation', *J Biol Chem*, 290(31), pp. 19146-57.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. and Guan, K. L. (2011) 'AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1', *Nat Cell Biol*, 13(2), pp. 132-41.
- Kim, T. W., Cho, H. M., Choi, S. Y., Sugaira, Y., Hayasaka, T., Setou, M., Koh, H. C., Hwang, E. M., Park, J. Y., Kang, S. J., Kim, H. S., Kim, H. and Sun, W. (2013) '(ADP-ribose) polymerase 1 and AMP-activated protein kinase mediate progressive dopaminergic neuronal degeneration in a mouse model of Parkinson's disease', *Cell Death Dis*, 4, pp. e919.
- Kish, S. J., Lopes-Cendes, I., Guttman, M., Furukawa, Y., Pandolfo, M., Rouleau, G. A., Ross, B. M., Nance, M., Schut, L., Ang, L. and DiStefano, L. (1998) 'Brain glyceraldehyde-3-phosphate



- dehydrogenase activity in human trinucleotide repeat disorders', *Arch Neurol*, 55(10), pp. 1299-304.
- Kobilo, T., Guerrieri, D., Zhang, Y., Collica, S. C., Becker, K. G. and van Praag, H. (2014) 'AMPK agonist AICAR improves cognition and motor coordination in young and aged mice', *Learn Mem*, 21(2), pp. 119-26.
- Kobilo, T., Yuan, C. and van Praag, H. (2011) 'Endurance factors improve hippocampal neurogenesis and spatial memory in mice', *Learn Mem*, 18(2), pp. 103-7.
- Lambert, J. C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M. J., Tavernier, B., Letenneur, L., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F., Fievet, N., Barberger-Gateau, P., Engelborghs, S., De Deyn, P., Mateo, I., Franck, A., Helisalmi, S., Porcellini, E., Hanon, O., European Alzheimer's Disease Initiative, I., de Pancorbo, M. M., Lendon, C., Dufouil, C., Jaillard, C., Leveillard, T., Alvarez, V., Bosco, P., Mancuso, M., Panza, F., Nacmias, B., Bossu, P., Piccardi, P., Annoni, G., Seripa, D., Galimberti, D., Hannequin, D., Licastro, F., Soininen, H., Ritchie, K., Blanche, H., Dartigues, J. F., Tzourio, C., Gut, I., Van Broeckhoven, C., Alperovitch, A., Lathrop, M. and Amouyel, P. (2009) 'Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease', *Nat Genet*, 41(10), pp. 1094-9.
- Leuner, K., Schutt, T., Kurz, C., Eckert, S. H., Schiller, C., Occhipinti, A., Mai, S., Jendrach, M., Eckert, G. P., Kruse, S. E., Palmiter, R. D., Brandt, U., Drose, S., Wittig, I., Willem, M., Haass, C., Reichert, A. S. and Muller, W. E. (2012) 'Mitochondrion-derived reactive oxygen species lead to enhanced amyloid beta formation', *Antioxid Redox Signal*, 16(12), pp. 1421-33.
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M. M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J. Y., Gao, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., Shaw, R. J., Cohen, R. A. and Zang, M. (2011) 'AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice', *Cell Metab*, 13(4), pp. 376-88.
- Lim, M. A., Selak, M. A., Xiang, Z., Krainc, D., Neve, R. L., Kraemer, B. C., Watts, J. L. and Kalb, R. G. (2012) 'Reduced activity of AMP-activated protein kinase protects against genetic models of motor neuron disease', *J Neurosci*, 32(3), pp. 1123-41.
- Lin, Y. T., Cheng, J. T., Liang, L. C., Ko, C. Y., Lo, Y. K. and Lu, P. J. (2007) 'The binding and phosphorylation of Thr231 is critical for Tau's hyperphosphorylation and functional regulation by glycogen synthase kinase 3beta', *J Neurochem*, 103(2), pp. 802-13.
- Liu, Y. J., Ju, T. C., Chen, H. M., Jang, Y. S., Lee, L. M., Lai, H. L., Tai, H. C., Fang, J. M., Lin, Y. L., Tu, P. H. and Chern, Y. (2015a) 'Activation of AMP-activated protein kinase alpha1 mediates mislocalization of TDP-43 in amyotrophic lateral sclerosis', *Hum Mol Genet*, 24(3), pp. 787-801.
- Liu, Y. J., Lee, L. M., Lai, H. L. and Chern, Y. (2015b) 'Aberrant activation of AMP-activated protein kinase contributes to the abnormal distribution of HuR in amyotrophic lateral sclerosis', *FEBS Lett*, 589(4), pp. 432-9.
- Lu, L., Zheng, L., Si, Y., Luo, W., Dujardin, G., Kwan, T., Potochick, N. R., Thompson, S. R., Schneider, D. A. and King, P. H. (2014) 'Hu antigen R (HuR) is a positive regulator of the RNA-binding proteins TDP-43 and FUS/TLS: implications for amyotrophic lateral sclerosis', *J Biol Chem*, 289(46), pp. 31792-804.
- Ma, T., Chen, Y., Vingtdeux, V., Zhao, H., Viollet, B., Marambaud, P. and Klann, E. (2014) 'Inhibition of AMP-activated protein kinase signaling alleviates impairments in hippocampal synaptic plasticity induced by amyloid beta', *J Neurosci*, 34(36), pp. 12230-8.
- Ma, T. C., Buescher, J. L., Oatis, B., Funk, J. A., Nash, A. J., Carrier, R. L. and Hoyt, K. R. (2007) 'Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease', *Neurosci Lett*, 411(2), pp. 98-103.

- Mairet-Coello, G., Courchet, J., Pieraut, S., Courchet, V., Maximov, A. and Polleux, F. (2013) 'The CAMKK2-AMPK kinase pathway mediates the synaptotoxic effects of Abeta oligomers through Tau phosphorylation', *Neuron*, 78(1), pp. 94-108.
- Mancuso, R., del Valle, J., Modol, L., Martinez, A., Granado-Serrano, A. B., Ramirez-Nunez, O., Pallas, M., Portero-Otin, M., Osta, R. and Navarro, X. (2014) 'Resveratrol improves motoneuron function and extends survival in SOD1(G93A) ALS mice', *Neurotherapeutics*, 11(2), pp. 419-32.
- Manwani, B. and McCullough, L. D. (2013) 'Function of the master energy regulator adenosine monophosphate-activated protein kinase in stroke', *J Neurosci Res*, 91(8), pp. 1018-29.
- Marangos, P. J., Loftus, T., Wiesner, J., Lowe, T., Rossi, E., Browne, C. E. and Gruber, H. E. (1990) 'Adenosinergic modulation of homocysteine-induced seizures in mice', *Epilepsia*, 31(3), pp. 239-46.
- Marsin, A. S., Bertrand, L., Rider, M. H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M. F., Van den Berghe, G., Carling, D. and Hue, L. (2000) 'Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia', *Curr Biol*, 10(20), pp. 1247-55.
- Martin, L. J., Pan, Y., Price, A. C., Sterling, W., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L. and Lee, M. K. (2006) 'Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death', *J Neurosci*, 26(1), pp. 41-50.
- Mattson, M. P. (2007) 'Calcium and neurodegeneration', *Aging Cell*, 6(3), pp. 337-50.
- Mochel, F., Durant, B., Meng, X., O'Callaghan, J., Yu, H., Brouillet, E., Wheeler, V. C., Humbert, S., Schiffmann, R. and Durr, A. (2012) 'Early alterations of brain cellular energy homeostasis in Huntington disease models', *J Biol Chem*, 287(2), pp. 1361-70.
- Momcilovic, M., Hong, S. P. and Carlson, M. (2006) 'Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro', *J Biol Chem*, 281(35), pp. 25336-43.
- Mosconi, L. (2005) 'Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD', *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 32(4), pp. 486-510.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F. and Youle, R. J. (2008) 'Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy', *J Cell Biol*, 183(5), pp. 795-803.
- Narendra, D. P., Jin, S. M., Tanaka, A., Suen, D. F., Gautier, C. A., Shen, J., Cookson, M. R. and Youle, R. J. (2010) 'PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin', *PLoS Biol*, 8(1), pp. e1000298.
- Ng, C. H., Guan, M. S., Koh, C., Ouyang, X., Yu, F., Tan, E. K., O'Neill, S. P., Zhang, X., Chung, J. and Lim, K. L. (2012) 'AMP kinase activation mitigates dopaminergic dysfunction and mitochondrial abnormalities in Drosophila models of Parkinson's disease', *J Neurosci*, 32(41), pp. 14311-7.
- Nixon, R. A. and Yang, D. S. (2011) 'Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect', *Neurobiol Dis*, 43(1), pp. 38-45.
- 'A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group', (1993) *Cell*, 72(6), pp. 971-83.
- Olah, J., Klivenyi, P., Gardian, G., Vecsei, L., Orosz, F., Kovacs, G. G., Westerhoff, H. V. and Ovadi, J. (2008) 'Increased glucose metabolism and ATP level in brain tissue of Huntington's disease transgenic mice', *FEBS J*, 275(19), pp. 4740-55.
- Olanow, C. W. and Tatton, W. G. (1999) 'Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease', *Annu Rev Neurosci*, 22, pp. 123-44.
- Perera, N. D., Sheean, R. K., Scott, J. W., Kemp, B. E., Horne, M. K. and Turner, B. J. (2014) 'Mutant TDP-43 deregulates AMPK activation by PP2A in ALS models', *PLoS One*, 9(4), pp. e95549.

- Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P. A., Small, S., Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B. and Wyss-Coray, T. (2008) 'The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice', *J Clin Invest*, 118(6), pp. 2190-9.
- Potter, W. B., O'Riordan, K. J., Barnett, D., Osting, S. M., Wagoner, M., Burger, C. and Roopra, A. (2010) 'Metabolic regulation of neuronal plasticity by the energy sensor AMPK', *PLoS One*, 5(2), pp. e8996.
- Powers, W. J., Videen, T. O., Markham, J., McGee-Minnich, L., Antenor-Dorsey, J. V., Hershey, T. and Perlmutter, J. S. (2007) 'Selective defect of in vivo glycolysis in early Huntington's disease striatum', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(8), pp. 2945-9.
- Reddy, P. H. (2011) 'Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease', *Brain Res*, 1415, pp. 136-48.
- Renton, A. E., Chio, A. and Traynor, B. J. (2014) 'State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics', *Nat Neurosci*, 17(1), pp. 17-23.
- Rowland, L. P. and Shneider, N. A. (2001) 'Amyotrophic lateral sclerosis', *N Engl J Med*, 344(22), pp. 1688-700.
- Russell, R. R., 3rd, Bergeron, R., Shulman, G. I. and Young, L. H. (1999) 'Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR', *Am J Physiol*, 277(2 Pt 2), pp. H643-9.
- Sanders, M. J., Grondin, P. O., Hegarty, B. D., Snowden, M. A. and Carling, D. (2007) 'Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade', *Biochem J*, 403(1), pp. 139-48.
- Sato-Harada, R., Okabe, S., Umeyama, T., Kanai, Y. and Hirokawa, N. (1996) 'Microtubule-associated proteins regulate microtubule function as the track for intracellular membrane organelle transports', *Cell Struct Funct*, 21(5), pp. 283-95.
- Sayre, L. M., Perry, G. and Smith, M. A. (2008) 'Oxidative stress and neurotoxicity', *Chem Res Toxicol*, 21(1), pp. 172-88.
- Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P. and Marsden, C. D. (1990) 'Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease', *J Neurochem*, 54(3), pp. 823-7.
- Seshadri, S., Fitzpatrick, A. L., Ikram, M. A., DeStefano, A. L., Gudnason, V., Boada, M., Bis, J. C., Smith, A. V., Carassquillo, M. M., Lambert, J. C., Harold, D., Schrijvers, E. M., Ramirez-Lorca, R., Debette, S., Longstreth, W. T., Jr., Janssens, A. C., Pankratz, V. S., Dartigues, J. F., Hollingworth, P., Aspelund, T., Hernandez, I., Beiser, A., Kuller, L. H., Koudstaal, P. J., Dickson, D. W., Tzourio, C., Abraham, R., Antunez, C., Du, Y., Rotter, J. I., Aulchenko, Y. S., Harris, T. B., Petersen, R. C., Berr, C., Owen, M. J., Lopez-Arrieta, J., Varadarajan, B. N., Becker, J. T., Rivadeneira, F., Nalls, M. A., Graff-Radford, N. R., Campion, D., Auerbach, S., Rice, K., Hofman, A., Jonsson, P. V., Schmidt, H., Lathrop, M., Mosley, T. H., Au, R., Psaty, B. M., Uitterlinden, A. G., Farrer, L. A., Lumley, T., Ruiz, A., Williams, J., Amouyel, P., Younkin, S. G., Wolf, P. A., Launer, L. J., Lopez, O. L., van Duijn, C. M., Breteler, M. M., Consortium, C., Consortium, G. and Consortium, E. (2010) 'Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease', *JAMA*, 303(18), pp. 1832-40.
- Shaw, R. J. (2009) 'LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth', *Acta Physiol (Oxf)*, 196(1), pp. 65-80.
- Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., DePinho, R. A. and Cantley, L. C. (2004) 'The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10), pp. 3329-35.

- Sheng, Z. H. (2014) 'Mitochondrial trafficking and anchoring in neurons: New insight and implications', *J Cell Biol*, 204(7), pp. 1087-98.
- Sherer, T. B., Betarbet, R. and Greenamyre, J. T. (2002) 'Environment, mitochondria, and Parkinson's disease', *Neuroscientist*, 8(3), pp. 192-7.
- Shin, H., Kim, M. H., Lee, S. J., Lee, K. H., Kim, M. J., Kim, J. S. and Cho, J. W. (2013) 'Decreased Metabolism in the Cerebral Cortex in Early-Stage Huntington's Disease: A Possible Biomarker of Disease Progression?', *J Clin Neurol*, 9(1), pp. 21-5.
- Shirendeb, U., Reddy, A. P., Manczak, M., Calkins, M. J., Mao, P., Tagle, D. A. and Reddy, P. H. (2011) 'Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: implications for selective neuronal damage', *Hum Mol Genet*, 20(7), pp. 1438-55.
- Smith, R., Bacos, K., Fedele, V., Soulet, D., Walz, H. A., Obermuller, S., Lindqvist, A., Bjorkqvist, M., Klein, P., Onnerfjord, P., Brundin, P., Mulder, H. and Li, J. Y. (2009) 'Mutant huntingtin interacts with {beta}-tubulin and disrupts vesicular transport and insulin secretion', *Hum Mol Genet*, 18(20), pp. 3942-54.
- Son, S. M., Jung, E. S., Shin, H. J., Byun, J. and Mook-Jung, I. (2012) 'Abeta-induced formation of autophagosomes is mediated by RAGE-CaMKKbeta-AMPK signaling', *Neurobiol Aging*, 33(5), pp. 1006 e11-23.
- Song, L., Chen, L., Zhang, X., Li, J. and Le, W. (2014) 'Resveratrol ameliorates motor neuron degeneration and improves survival in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis', *Biomed Res Int*, 2014, pp. 483501.
- Song, W., Chen, J., Petrilli, A., Liot, G., Klinglmayr, E., Zhou, Y., Poquiz, P., Tjong, J., Pouladi, M. A., Hayden, M. R., Masliah, E., Ellisman, M., Rouiller, I., Schwarzenbacher, R., Bossy, B., Perkins, G. and Bossy-Wetzel, E. (2011) 'Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity', *Nat Med*, 17(3), pp. 377-82.
- Spasic, M. R., Callaerts, P. and Norga, K. K. (2008) 'Drosophila alicorn is a neuronal maintenance factor protecting against activity-induced retinal degeneration', *J Neurosci*, 28(25), pp. 6419-29.
- Sui, Y., Zhao, Z., Liu, R., Cai, B. and Fan, D. (2014) 'Adenosine monophosphate-activated protein kinase activation enhances embryonic neural stem cell apoptosis in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis', *Neural Regen Res*, 9(19), pp. 1770-8.
- Tabrizi, S. J., Cleeter, M. W., Xuereb, J., Taanman, J. W., Cooper, J. M. and Schapira, A. H. (1999) 'Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain', *Ann Neurol*, 45(1), pp. 25-32.
- Tenreiro, S., Reimao-Pinto, M. M., Antas, P., Rino, J., Wawrzycka, D., Macedo, D., Rosado-Ramos, R., Amen, T., Waiss, M., Magalhaes, F., Gomes, A., Santos, C. N., Kaganovich, D. and Outeiro, T. F. (2014) 'Phosphorylation modulates clearance of alpha-synuclein inclusions in a yeast model of Parkinson's disease', *PLoS Genet*, 10(5), pp. e1004302.
- Thornton, C., Bright, N. J., Sastre, M., Muckett, P. J. and Carling, D. (2011) 'AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid beta-peptide exposure', *Biochem J*, 434(3), pp. 503-12.
- Tian, J., Yan, Y. P., Zhou, R., Lou, H. F., Rong, Y. and Zhang, B. R. (2014) 'Soluble N-terminal fragment of mutant Huntingtin protein impairs mitochondrial axonal transport in cultured hippocampal neurons', *Neurosci Bull*, 30(1), pp. 74-80.
- Tschape, J. A., Hammerschmied, C., Muhlig-Versen, M., Athenstaedt, K., Daum, G. and Kretzschmar, D. (2002) 'The neurodegeneration mutant lochrig interferes with cholesterol homeostasis and Appl processing', *EMBO J*, 21(23), pp. 6367-76.

- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., Dallapiccola, B., Auburger, G. and Wood, N. W. (2004) 'Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1', *Science*, 304(5674), pp. 1158-60.
- Vergouts, M., Marinangeli, C., Ingelbrecht, C., Genard, G., Schakman, O., Sternotte, A., Calas, A. G. and Hermans, E. (2015) 'Early ALS-type gait abnormalities in AMP-dependent protein kinase-deficient mice suggest a role for this metabolic sensor in early stages of the disease', *Metab Brain Dis.*
- Verstraeten, A., Theuns, J. and Van Broeckhoven, C. (2015) 'Progress in unraveling the genetic etiology of Parkinson disease in a genomic era', *Trends Genet*, 31(3), pp. 140-9.
- Vingtdeux, V., Chandakkar, P., Zhao, H., d'Abramo, C., Davies, P. and Marambaud, P. (2011a) 'Novel synthetic small-molecule activators of AMPK as enhancers of autophagy and amyloid-beta peptide degradation', *FASEB J*, 25(1), pp. 219-31.
- Vingtdeux, V., Davies, P., Dickson, D. W. and Marambaud, P. (2011b) 'AMPK is abnormally activated in tangle- and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease and other tauopathies', *Acta Neuropathol*, 121(3), pp. 337-49.
- Vingtdeux, V., Giliberto, L., Zhao, H., Chandakkar, P., Wu, Q., Simon, J. E., Janle, E. M., Lobo, J., Ferruzzi, M. G., Davies, P. and Marambaud, P. (2010) 'AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism', *J Biol Chem*, 285(12), pp. 9100-13.
- Walker, F. O. (2007) 'Huntington's disease', *Lancet*, 369(9557), pp. 218-28.
- Wang, Y., Martinez-Vicente, M., Kruger, U., Kaushik, S., Wong, E., Mandelkow, E. M., Cuervo, A. M. and Mandelkow, E. (2010) 'Synergy and antagonism of macroautophagy and chaperone-mediated autophagy in a cell model of pathological tau aggregation', *Autophagy*, 6(1), pp. 182-3.
- Wang, Z. X., Tan, L. and Yu, J. T. (2015) 'Axonal transport defects in Alzheimer's disease', *Mol Neurobiol*, 51(3), pp. 1309-21.
- Weisova, P., Alvarez, S. P., Kilbride, S. M., Anilkumar, U., Baumann, B., Jordan, J., Bernas, T., Huber, H. J., Dussmann, H. and Prehn, J. H. (2013) 'Latrepirdine is a potent activator of AMP-activated protein kinase and reduces neuronal excitability', *Transl Psychiatry*, 3, pp. e317.
- Weisova, P., Concannon, C. G., Devocelle, M., Prehn, J. H. and Ward, M. W. (2009) 'Regulation of glucose transporter 3 surface expression by the AMP-activated protein kinase mediates tolerance to glutamate excitation in neurons', *J Neurosci*, 29(9), pp. 2997-3008.
- Weisova, P., Davila, D., Tuffy, L. P., Ward, M. W., Concannon, C. G. and Prehn, J. H. (2011) 'Role of 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase in cell survival and death responses in neurons', *Antioxid Redox Signal*, 14(10), pp. 1863-76.
- Won, J. S., Im, Y. B., Kim, J., Singh, A. K. and Singh, I. (2010) 'Involvement of AMP-activated-protein-kinase (AMPK) in neuronal amyloidogenesis', *Biochem Biophys Res Commun*, 399(4), pp. 487-91.
- Wong, Y. C. and Holzbaur, E. L. (2014) 'The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation', *J Neurosci*, 34(4), pp. 1293-305.
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M. and Carling, D. (2005) 'Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells', *Cell Metab*, 2(1), pp. 21-33.

- Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. and Carling, D. (2003) 'LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade', *Curr Biol*, 13(22), pp. 2004-8.
- Wu, C. A., Chao, Y., Shiah, S. G. and Lin, W. W. (2013) 'Nutrient deprivation induces the Warburg effect through ROS/AMPK-dependent activation of pyruvate dehydrogenase kinase', *Biochim Biophys Acta*, 1833(5), pp. 1147-56.
- Wu, Y., Li, X., Zhu, J. X., Xie, W., Le, W., Fan, Z., Jankovic, J. and Pan, T. (2011) 'Resveratrol-activated AMPK/SIRT1/autophagy in cellular models of Parkinson's disease', *Neurosignals*, 19(3), pp. 163-74.
- Xiao, B., Sanders, M. J., Underwood, E., Heath, R., Mayer, F. V., Carmena, D., Jing, C., Walker, P. A., Eccleston, J. F., Haire, L. F., Saiu, P., Howell, S. A., Aasland, R., Martin, S. R., Carling, D. and Gamblin, S. J. (2011) 'Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP', *Nature*, 472(7342), pp. 230-3.
- Xu, Y., Liu, C., Chen, S., Ye, Y., Guo, M., Ren, Q., Liu, L., Zhang, H., Xu, C., Zhou, Q., Huang, S. and Chen, L. (2014) 'Activation of AMPK and inactivation of Akt result in suppression of mTOR-mediated S6K1 and 4E-BP1 pathways leading to neuronal cell death in in vitro models of Parkinson's disease', *Cell Signal*, 26(8), pp. 1680-9.
- Yang, T. T., Shih, Y. S., Chen, Y. W., Kuo, Y. M. and Lee, C. W. (2015) 'Glucose regulates amyloid beta production via AMPK', *J Neural Transm.*
- Yoon, S. O., Park, D. J., Ryu, J. C., Ozer, H. G., Tep, C., Shin, Y. J., Lim, T. H., Pastorino, L., Kunwar, A. J., Walton, J. C., Nagahara, A. H., Lu, K. P., Nelson, R. J., Tuszynski, M. H. and Huang, K. (2012) 'JNK3 perpetuates metabolic stress induced by Aβ peptides', *Neuron*, 75(5), pp. 824-37.
- Youle, R. J. and Narendra, D. P. (2011) 'Mechanisms of mitophagy', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(1), pp. 9-14.
- Yu, W. H., Cuervo, A. M., Kumar, A., Peterhoff, C. M., Schmidt, S. D., Lee, J. H., Mohan, P. S., Mercken, M., Farmery, M. R., Tjernberg, L. O., Jiang, Y., Duff, K., Uchiyama, Y., Naslund, J., Mathews, P. M., Cataldo, A. M. and Nixon, R. A. (2005) 'Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease', *J Cell Biol*, 171(1), pp. 87-98.
- Zala, D., Hinckelmann, M. V., Yu, H., Lyra da Cunha, M. M., Liot, G., Cordelieres, F. P., Marco, S. and Saudou, F. (2013) 'Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport', *Cell*, 152(3), pp. 479-91.
- Zarei, S., Carr, K., Reiley, L., Diaz, K., Guerra, O., Altamirano, P. F., Pagani, W., Lodin, D., Orozco, G. and Chinae, A. (2015) 'A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis', *Surg Neurol Int*, 6, pp. 171.
- Zhao, Z., Sui, Y., Gao, W., Cai, B. and Fan, D. (2015) 'Effects of diet on adenosine monophosphate-activated protein kinase activity and disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model', *J Int Med Res*, 43(1), pp. 67-79.
- Zheng, D., MacLean, P. S., Pohnert, S. C., Knight, J. B., Olson, A. L., Winder, W. W. and Dohm, G. L. (2001) 'Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase', *J Appl Physiol (1985)*, 91(3), pp. 1073-83.
- Zuccato, C., Valenza, M. and Cattaneo, E. (2010) 'Molecular mechanisms and potential therapeutical targets in Huntington's disease', *Physiol Rev*, 90(3), pp. 905-81.



### **Annexe 3 : Article "AMP-activated protein kinase is essential for the maintenance of energy levels during synaptic activation"**

Cet article a été publié dans le journal iScience en 2018.

iScience. 2018 Oct 12;9:1-13. doi: 10.1016/j.isci.2018.10.006. [Epub ahead of print]

<https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.10.006>

#### **AMP-activated protein kinase is essential for the maintenance of energy levels during synaptic activation**

Marinangeli C, Didier S, Ahmed T, Caillerez R, Domise M, Laloux C, Bégard S, Carrier S, Colin M, Marchetti P, Ghesquière B, Balschun D, Buée L, Kluza J, Vingtdeux V.