



HAL
open science

Implications de la protéine DYRK1A dans la pathologie Alzheimer et développement de stratégies thérapeutiques

Benoit Souchet

► **To cite this version:**

Benoit Souchet. Implications de la protéine DYRK1A dans la pathologie Alzheimer et développement de stratégies thérapeutiques. Neurobiologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS346 . tel-02303038

HAL Id: tel-02303038

<https://theses.hal.science/tel-02303038>

Submitted on 2 Oct 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.

Implications de la protéine DYRK1A dans la pathologie Alzheimer et développement de stratégies thérapeutiques

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique :
du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité : Neurosciences

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 2 Octobre 2018, par

Benoît Souchet

Composition du Jury :

Mme le Professeur Nathalie Janel Professeur Universitaire, Université Paris Diderot (CNRS UMR8251, BFA)	Présidente
Mme le Docteur Sylvie Claeysen Chargé de Recherche, Université Montpellier (CNRS UMR5203, INSERM U1191)	Rapporteuse
M. le Docteur Benoit Delatour Chargé de Recherche, Université Pierre et Marie Curie (INSERM U1127, CNRS UMR7225)	Rapporteur
M. le Professeur Patrick Dallemagne Professeur Universitaire, Université Caen Normandie	Examineur
M. le Professeur Michel Simonneau Professeur des Universités, ENS Paris-Saclay	Examineur
M. le Docteur Stéphane Epelbaum Praticien Hospitalier, Université Paris Sorbonne (AP-HP, IM2A)	Examineur
Mme le Docteur Nathalie Cartier Directeur de Recherche, Université Paris-Saclay (INSERM UMR1169)	Directrice de thèse
M. le Docteur Jérôme Braudeau Chargé de Recherche, Université Paris-Saclay (INSERM UMR1169)	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le Docteur Sylvie Claeysen et le Docteur Benoit Delatour d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Un grand merci pour vos lectures attentives et vos retours sur mon manuscrit. Je remercie également le Professeur Nathalie Janel, le Professeur Michel Simonneau, le Professeur Patrick Dallemagne et le Docteur Stéphane Epelbaum d'avoir accepté de prendre place dans mon jury de thèse.

Je remercie le Professeur Patrick Aubourg de m'avoir accueillie au sein de l'unité INSERM UMR 1169.

Je remercie évidemment mes deux co-directeurs de thèse, le Docteur Nathalie Cartier et le Docteur Jérôme Braudeau. Je vous remercie pour la confiance dont vous avez su me témoigner et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse dans un environnement plus qu'idéal. Un équilibre efficace alliant grande autonomie et soutiens lors de moments cruciaux, m'a permis de travailler dans d'excellentes conditions. Jérôme, un grand merci pour tes nombreux conseils et ta grande disponibilité jusqu'à la fin de ce travail. Je souhaite sincèrement que ton projet aboutisse. J'y crois fort ! Merci aussi pour cet enrichissant congrès Londonien.

Je remercie l'Université Paris Saclay de m'avoir financé pendant ces trois années de thèse. Je remercie le ministère en charge de la politique des pôles de compétitivité via le projet TRIAD, ManRos Therapeutics, la Fondation France Alzheimer et Investissements d'avenir, pour avoir contribué financièrement au développement de ce projet de thèse.

Des remerciements chaleureux aux membres de l'équipe 1169 et associés. Je remercie tous les membres du « bureau » : Jérôme, Sandro, Satoru, Nicola, Micka, Romain, et Louis. Que l'atmosphère était propice à l'épanouissement d'un thésard ! Merci pour votre aide, les échanges pro et autres très bon moments ! Merci aux sportifs Micka et Romain pour nos nombreux fous rires (Cube Or , KFC, ...). Merci Satoru pour ta disponibilité auprès de ma « cousin in law » et merci pour le fameux « Japanese Iphone », le meilleur évidemment. Un grand merci Nicola pour ces quelques jours sur Naples et pour tout le reste ! Je remercie également Gaëlle, Emilie R pour leur gentillesse et leur aide. Merci également à Françoise, Emilie A., Béatrix, Aurélie, Yasemin et bien sûr Lea.

Merci aux nombreux membres de MIRCen, qui ont permis à ce que ce travail de thèse soit effectué dans d'excellentes conditions. Difficile pour moi de citer tout le monde mais je remercie en particulier Karine, Charlène, Noëlle, Gwenaëlle, Caroline, Fanny, Pauline, Carole, Kelly,

Laurenne ... Je pense également aux membres de l'équipe qui veille au bien-être de nos animaux : Julien, David, ...

J'en profite pour remercier les personnes avec lesquelles j'ai collaboré lors de cette thèse et qui, sans leurs travaux, ne serait évidemment pas ce qu'elle est aujourd'hui. Merci à Laurent Meijer pour nos discussions enrichissantes et pour m'avoir permis d'exposer mon travail lors du congrès « DYRK1A ». A ce titre, merci aux chimistes, en particulier à Jean Pierre Bazureau et à l'équipe de ManRos présente à St Malo et lors des réunions consortium FUI. Merci à Nathalie Janel pour ces nombreuses discussions et le travail fourni sur notre kinase favorite. Merci à Julien Dairou et à Yuchen à qui je souhaite une fin de thèse à succès. Je remercie également les électrophysiologistes de Saint Anne qui ont chacun fait un gros travail : Patrick Dutar, Brigitte Potier mais aussi Jean-Marie Billard. Merci Jean-Marie pour ton aide et ta disponibilité.

Je souhaiterai avant de terminer, remercier l'ensemble des personnes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler pendant près de 5 ans au sein de l'équipe 5 BFA, localisée à l'Université Paris Diderot. J'ai une pensée sincère pour Jean-Maurice Delabar, Nathalie Janel, Nicole Créau et surtout Jacqueline London qui ont soutenu mes choix de poursuite universitaire en parallèle de mon poste. Il est évidemment que sans leurs conseils et la confiance qu'ils m'ont accordé, ma vie professionnelle aurait été toute autre. Je remercie à cette occasion Fayçal, qui m'aura réellement mis « le pied à l'écuyer » mais aussi Sabiha, Julie, Christophe, Clémentine, Lynda, Vanessa, Feta ainsi que Fabrice, Sandrine, Nadim et Myriam.

Enfin, une pensée à mes parents et grands-parents, à mon frère, à Jessica pour son soutien et sa patience ces dernières années : riches et contraignantes sur le plan professionnel mais si précieuses sur le plan familial, à notre Lucia qui nous aura fait la joie de naître il y a maintenant quelques mois.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	3
LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES TABLEAUX	8
INTRODUCTION	9
CHAPITRE I : La maladie d'Alzheimer	10
I. Définition	10
1. Les démences et la maladie d'Alzheimer	10
2. La maladie d'Alzheimer	10
3. Les phases de la maladie d'Alzheimer	12
II. Impact social et économique de la MA	13
1. Epidémiologie	13
2. Coûts de la MA	14
III. Historique	15
IV. Neuropathologie de la MA	16
3. L'atrophie cérébrale	16
4. Le dépôt de plaques amyloïdes	18
5. L'angiopathie amyloïde cérébrale	21
6. Les dégénérescences neurofibrillaires	22
7. La perte neuronale et synaptique	26
8. La réactivité astrocytaire et microgliale	27
V. Etiologie de la maladie d'Alzheimer	29
1. Les formes familiales de la MA	29
2. Les formes sporadiques de la MA	30
VI. Clinique de la Maladie d'Alzheimer	35
1. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer	35
2. Traitements actuels	42
3. Essais cliniques conduisant à l'approbation de composés pharmacologiques	42
4. Essais cliniques actuels	43
CHAPITRE II : Progression et modélisation de la pathologie Alzheimer	50

VII. Progression de la pathologie Alzheimer	50
1. L'hypothèse historique de la cascade amyloïde (1990-2010)	50
2. La composante amyloïde	52
3. La composante Tau	60
4. L'hypothèse de la cascade amyloïde actuelle et revisitée	73
VIII. Modélisation de la pathologie Alzheimer	76
1. Les souris transgéniques	77
2. Autres modèles animaux de la MA	90
3. Un nouveau modèle propriétaire, développé par transfert de gènes	92
CHAPITRE III : Les protéines kinases et la maladie d'Alzheimer	96
I. Les protéines kinases	96
1. Définition et classification.	96
2. Structure et fonction du domaine catalytique	99
3. Mécanismes de spécificité des protéines kinases	105
4. Inhibiteurs des protéines kinases	111
II. DYRK1A	114
1. Du gène à son expression tissulaire	114
2. La protéine DYRK1A : de la structure à la fonction	117
3. Pathologies cérébrales liées à DYRK1A	126
4. DYRK1A : une protéine clé dans la MA ?	130
5. Stratégies thérapeutiques ciblant DYRK1A	137
TRAVAIL DE THESE	145
RESULTATS	147
I. Article 1 : Compréhension et modulation pharmacologique de l'homéostasie de DYRK1A lors de la phase clinique de la MA	147
II. Article 2 : Modélisation de la phase préclinique de la pathologie Alzheimer chez le rat.	176
III. Article 3 : Inhibition de l'activité kinase de DYRK1A lors de la phase préclinique de la MA (Ebauche)	207
DISCUSSION	225
I. Implications de la protéine DYRK1A et intérêts thérapeutiques dans la phase clinique de la MA	225
1. Physiologie de DYRK1A lors de la phase symptomatique de la MA	225
2. Inhibition de la protéolyse de DYRK1A comme stratégie thérapeutique pertinente dans la MA	227
3. Interrogations suite aux données obtenues dans l'Article 1	231

II. Modélisation de la phase préclinique de la MA chez l'animal	237
1. Induction d'un stress A β chez le rat AAV-AD	238
2. Exacerbation de la pathologie amyloïde liée à l'âge	239
3. Conséquences d'un stress amyloïde subtile dans le temps	241
4. Potentielles études combinant le rat AAV-AD à d'autres animaux modélisant un facteur de risque de la MA	247
5. Limites actuelles et espoirs futurs d'un diagnostic de la phase préclinique de la MA	247
III. Implications de DYRK1A dans la phase préclinique de la MA	248
1. Régulation de la protéine DYRK1A lors de la phase silencieuse de la MA	249
2. Conséquences de l'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A lors de la phase silencieuse de la MA.	250
3. Vers une application clinique ?	258
CONCLUSION	262
ANNEXES	264
I. Publications scientifiques	264
1. Publications au sein de l'équipe d'accueil	264
2. Autres publications	264
II. Communications orales	265
1. Présentations poster	265
2. Présentations orales	266
Bibliographie	267
Résumé	4^{ème} de couverture
Abstract	4^{ème} de couverture

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Visualisation de l'atrophie cérébrale par IRM	17
Figure 2 : Immunomarquage de plaques amyloïdes	19
Figure 3 : Progression spatio-temporelle des plaques amyloïdes dans le cerveau de patients avec MA	20
Figure 4 : Visualisation in vivo du dépôt de plaques amyloïdes	21
Figure 5 : Microhémorragies dans le cortex cérébral associées à l'AAC	22
Figure 6 : Illustrations des différents stades de DNFs	24
Figure 7 : Progression spatio-temporelle des lésions DNFs dans le cerveau de patients avec MA	24
Figure 8 : Visualisation in vivo de l'accumulation des DNFs	25
Figure 9 : Illustration de la gliose péri-plaques	27
Figure 10 : Visualisation in vivo de l'activation de la microglie dans le cerveau de patients avec MA	28
Figure 11 : Vue d'ensemble des gènes impliqués dans la MA	33
Figure 12 : Extrait d'une fiche de suivi du test MMSE	37
Figure 13 : Entité clinico-biologique de la MA utilisée par l'IWG2	40
Figure 14 : Hypothèse de progression de la MA selon le NAI-AA	41
Figure 15 : Essais cliniques sur la MA en cours dans le monde	43
Figure 16 : Illustration de la production de peptides amyloïdes	53
Figure 17 : Visualisation in vivo de la charge amyloïde dans le cerveau de patients porteurs de la mutation E693Δ	54
Figure 18 : Effets pathologiques de l'Aβ intraneuronal	59
Figure 19 : Les différentes isoformes de Tau	61
Figure 20 : Structure de la protéine Tau	62
Figure 21 : Interactions des protéines Tau.	64
Figure 22 : Protéine Tau et ses sites de phosphorylation	67
Figure 23 : La phosphorylation des protéines Tau conduit à la formation de DNFs	68
Figure 24 : L'activation des caspases pro-apoptotiques précède la DNF	71
Figure 25 : Transfert trans-cellulaire de Tau: mécanismes potentiels.	72
Figure 26 : L'hypothèse de la cascade amyloïde actuelle	75
Figure 27 : Age d'apparition de phénotypes chez quelques modèles murins transgéniques ciblant l'amyloïde	80
Figure 28 : Mesure électrophysiologique chez un modèle murin de la MA	83
Figure 29 : Evaluation de la mémoire chez la souris par le test de la piscine de Morris	85
Figure 30 : Caractérisation du modèle AAV-AD développé dans l'équipe	94
Figure 31 : Réaction de phospho-transfert par une protéine kinase.	97
Figure 32 : Structure d'un domaine catalytique type de protéine kinase.	100
Figure 33 : Conformations du domaine catalytique d'une kinase	102
Figure 34 : Disparité de profondeur de la fente catalytique entre une Tyr et une Ser/Thr kinase	106
Figure 35 : Spécificité d'interactions médiée par les résidus distaux au site de phosphorylation	106
Figure 36 : Spécificité de la kinase médiée par les domaines distaux	108
Figure 37 : Intérêts des protéines adaptatrices dans la spécificité d'une kinase	110

Figure 38 : Tendances et évolution dans le développement de petites molécules à activité inhibitrice de kinases ou SMKIs.	112
Figure 39 : Structure d'une kinase et classification des différents types d'inhibiteurs de kinases.	113
Figure 40 : Expression tissulaire de Dyrk1A	116
Figure 41 : Structure primaire de la protéine DYRK1A et comparaison aux autres DYRKs humaines	119
Figure 42 : Modèles expliquant les mécanismes d'autophosphorylation de DYRK1A	121
Figure 43 : Interactions de DYRK1A	123
Figure 44 : Localisation subcellulaire et cellulaire de DYRK1A dans le néocortex de rat	124
Figure 45 : Localisation cellulaire de DYRK1A dans le cerveau de souris	125
Figure 46 : Localisation cellulaire de DYRK1A dans le cerveau humain adulte.	126
Figure 47 : Neuropathologie associée à la MA dans le cerveau de personnes porteuses de T21.	128
Figure 48 : Localisation de DYRK1A dans un neurone en cours de dégénérescence	131
Figure 49 : Le circuit régulateur de NFAT incluant DYRK1A	134
Figure 50 : Identification du mécanisme de troncation de la kinase DYRK1A dans la MA.	136
Figure 51 : Exemples d'inhibiteurs de DYRK1A : structures et propriétés pharmacologiques	138
Figure 52 : Utilisation de l'EGCG pour traiter les déficits cognitifs de personnes porteuses de T21	140
Figure 53 : Modèle d'inhibition sélective de DYRK1A en ciblant son processus de repliement.	142
Figure 54 : Hypothèse formulée quant à la perte de spécificité de la kinase DYRK1A	226
Figure 55 : Hypothèse formulée quant au mécanisme d'action de la L41 chez la souris APP/PS1 âgée de 14 mois.	230
Figure 56 : Hypothèse formulée quant à la progression de la pathologie Alzheimer chez l'Homme comparée à celle de différents modèles animaux.	246
Figure 57: Hypothèse décrivant des effets doubles de la Leucettine L41, dépendants du contexte biologique dans lequel se trouve DYRK1A.	251
Figure 58 : Conséquences de l'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A sur la phosphorylation de Tau et la physiologie neuronale	257

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des kinases	98
Tableau 2 : Classification détaillée du domaine catalytique des ePKS	105
Tableau 3 : Exemples d'essais cliniques évaluant l'efficacité de thérapies ciblant la pathologie Tau.	259

INTRODUCTION

Mon projet de thèse s'est intéressé à identifier l'implication de la protéine kinase DYRK1A et l'intérêt thérapeutique de molécules modifiant sa fonction dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Pour introduire mes travaux, je discuterai d'abord des enjeux médicaux et sociétaux que représentent cette maladie, je décrirai son expression clinique et anatomique comme elle est historiquement décrite et j'aborderai le fait que depuis 2002, tous les essais cliniques conduits dans ce domaine sont considérés comme des échecs. Je m'attarderai ensuite sur des notions plus récentes, conceptualisant la maladie d'Alzheimer comme un *continuum* où son expression clinique représente l'étape finale d'une longue pathologie résultant de l'accumulation d'éléments pathologiques à l'intérieur du cerveau d'individus longtemps indemnes de symptômes cognitifs. Dans cette deuxième partie, j'exposerai les outils permettant au laboratoire de modéliser cette pathologie Alzheimer en soulignant les intérêts des modèles animaux actuels mais également leurs limites. Enfin, je discuterai de la fonction des protéines kinases dans le système nerveux central, en particulier, celle de la kinase DYRK1A et de son importance dans la progression de la pathologie Alzheimer. Je présenterai pour finir, un rapide état des lieux des stratégies thérapeutiques associées.

CHAPITRE I : La maladie d'Alzheimer

I. Définition

1. Les démences et la maladie d'Alzheimer

La démence est un syndrome caractérisé par un **déclin global des aptitudes mentales** réduisant les capacités des patients à exécuter leurs activités quotidiennes. Ainsi, l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) a défini en 1994 la démence comme une « altération progressive de la mémoire et de l'idéation, suffisamment marquée pour handicaper les activités de la vie de tous les jours. Cette altération doit être apparue depuis au moins six mois et être associée à un trouble d'au moins une des fonctions suivantes : le langage, le calcul, le jugement, la pensée abstraite, les praxies, les gnosies, ou modifications de la personnalité ». En 2000, l'Association Américaine de Psychiatrie (APA, American Psychiatric Association) a réactualisé cette définition par les termes suivants : « syndrome insidieux et progressif se caractérisant par des déficits multiples, à la tête desquels figurent nécessairement les troubles de la mémoire. Les troubles de la mémoire doivent s'accompagner d'au moins un autre type de déficit (langage, praxie, gnosie ou fonctions exécutives). Ces déficits cognitifs doivent constituer un déclin par comparaison aux capacités antérieures et ils doivent compromettre les activités professionnelles ou sociales de la personne. Enfin, ils ne doivent pas être liés à un délirium ou à une affection psychiatrique. ».

Globalement, nous distinguons deux types de démences. Les **démences dégénératives** conséquence d'une dégénérescence de cellules nerveuses et les démences non dégénératives, dues quant à elles à des pathologies d'ordre vasculaire, infectieux, traumatique, toxique ou tumoral. La maladie d'Alzheimer, la démence à corps de Lewy, la démence fronto-temporale mais aussi la maladie de Parkinson ou de Huntington rentrent dans la première catégorie. La démence par infarctus (vasculaire) est un exemple de démence non dégénérative.

La Maladie d'Alzheimer (MA) est la forme de démence la plus commune représentant de 60 à 80 % des cas selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

2. La maladie d'Alzheimer

La perte de mémoire est le principal symptôme de la MA. Contrairement au vieillissement physiologique, ces troubles ne sont pas occasionnels, mais persistants et graduels. Ils apparaissent précocement dans l'évolution de la maladie et sont le signe avant-coureur de la démence. Ils constituent le symptôme poussant la personne, ou plus souvent son entourage, à rechercher un diagnostic.

Nous considérerons ici deux types de mémoires : la mémoire à court terme (**MCT**) et la mémoire à long terme (**MLT**). La MCT correspond à la rétention temporaire d'informations : une capacité de stockage limitée dans le temps mais une vitesse de fonctionnement extrêmement rapide. Deux types de MCT sont à distinguer : la mémoire **sensorielle** (visuelle et olfactive) utilisée en permanence et la mémoire **de travail**, permettant d'accomplir des tâches à l'aspect transitoire et à capacité limitée comme par exemple : retenir une série de lettres. Elle est également appelée mémoire tampon avec un volume de stockage maximum propre à chacun. Par exemple, en restant sur la série de lettres à retenir, chaque personne aura la capacité de retenir plus ou moins de lettres : c'est **l'empan mnésique**. Cette mémoire de travail est particulièrement intéressante dans notre cas puisque des anomalies de celle-ci sont démontrées chez des sujets atteints de MA. La MLT est quant à elle constituée d'une mémoire non déclarative (implicite ou procédurale) et d'une **mémoire déclarative** (explicite). Cette dernière peut être subdivisée en deux : la **mémoire épisodique**, qui permet la rétention d'évènements autobiographiques et la **mémoire sémantique** relative aux connaissances apprises tout au long de la vie. Cette dernière peut, par exemple, être très bien évaluée par une tâche appelée « dénomination d'objets ». Il s'agira lors de ce test à ce que le sujet désigne un objet par son nom précis. Des erreurs caractéristiques d'une personne atteintes de MA pourraient être exemplifiées par une réponse à l'item par un mot appartenant à la même famille (ex : « chien » pour « chat »), ou bien, par un nom de la catégorie au lieu de la réponse attendue (ex : « animal » pour « chat ») ([Chainay 2005](#)). Globalement, les deux types de MLT sont atteintes et il a été démontré récemment que des déficits de la mémoire épisodique sont les premiers symptômes cognitifs détectables dans la MA ([Weston, Nicholas et al. 2018](#)).

En plus des troubles mnésiques, les patients atteints de la MA développeront également des troubles de la cognition.

Les troubles du langage, ou aphasie, sont les plus importants après la perte de mémoire. Nous noterons un développement, là encore progressif de ces troubles. D'abord, la personne perd son vocabulaire et cherche ses mots. Ensuite, la personne utilisera seulement quelques mots, ou sons, qu'elle déclinera en plusieurs tons. Enfin, elle sera dans l'incapacité totale de parler.

Des troubles de la **fonction gestuelle** apparaissent également. La personne perdra la capacité d'exécuter des tâches motrices complexes. Associé à l'aphasie, ce sont ces troubles gestuels qui seront à l'origine de **la perte d'autonomie** de la personne.

Les **troubles de la reconnaissance**, ou **agnosie**, sont également développés par les patients atteints de la MA. Leurs capacités à identifier les messages de l'environnement via leurs sens primaires : vue, olfaction et toucher, seront altérées. Au quotidien, des attitudes inadaptées liées par exemple à la non reconnaissance de proches aura lieu.

Cette liste de troubles associés à la MA n'est que succincte. Elle vise d'abord à mettre en lumière **la complexité que représente cette maladie** mais également le fait que ces anomalies conduisent *in fine* à **la perte progressive de toute autonomie** de la personne atteinte.

3. Les phases de la maladie d'Alzheimer

La progression des troubles cognitifs associée à la MA est sensible à une grande variabilité individuelle. Phaneuf et Bal-Craquin ([Phaneuf and Bal-Craquin 2007](#)) ont cependant théorisé en 2007, un profil général de l'évolution de ces troubles que l'on peut découper en quatre phases en fonction du test du MMSE (Mini Mental State Examination) que nous expliquerons plus tard dans cette introduction ([Folstein, Folstein et al. 1975](#)).

i. La phase pré-clinique (ou phase asymptomatique).

Ce concept est relativement nouveau et décrit la présence de biomarqueurs pathophysiologiques caractéristiques de la MA associés à l'absence de symptôme clinique spécifique détectable ([Epelbaum, Genthon et al. 2017](#)). La MA serait une continuité pouvant être diagnostiquée avant son expression clinique. Deux consortiums : The International Working Group-2 (IWG-2) et The National Institute on Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA) ont l'un après l'autre proposé une définition de ce stade. Cette phase peut s'étendre de 15 à 25 ans durant laquelle les lésions cérébrales apparaissent silencieusement. Progressivement quelques symptômes plus ou moins détectables surviennent comme l'égarement d'objets, le manque de mots, l'humeur changeante, le manque d'intérêt. Je reviendrai sur cette phase tout au long de cette thèse.

ii. La phase légère (MMSE>20).

Cette phase peut varier de 2 à 4 ans. Les lésions cérébrales sont alors trop importantes et le seuil symptomatique est atteint. Les manifestations cliniques de la démence apparaissent comme les anomalies de la mémoire à court terme et de la mémoire épisodique. Les troubles psychologiques : l'anxiété, le stress, la dépression et le désintérêt, résultant de la prise de

conscience des perturbations, s'accroissent. Les troubles de l'attention et de la concentration, associés au manque de mots, perturbent le sujet à suivre une conversation.

iii. La phase modérée (MMSE compris entre 10 et 20).

La durée est comprise entre 2 à 6 ans. L'ensemble des précédents symptômes s'aggravent. Les changements de personnalité et du comportement sont observables. Les troubles de l'orientation spatiale et temporelle influencent grandement la vie au quotidien : à partir de ce stade, l'autonomie des personnes est remise en cause.

iv. La phase sévère (MMSE <10).

Le stade sévère peut durer de 2 à 4 ans, il est marqué par une détérioration grave de tous les symptômes listés précédemment. Ici, la personne ne reconnaît plus ses proches ni les soignants et ne répond plus aux stimulations extérieures. La communication est quasiment nulle. La dépendance est totale.

II. Impact social et économique de la MA

1. Epidémiologie

La recherche épidémiologique sur la maladie d'Alzheimer est à elle seule un vaste champ de recherche. Avant toute chose, il est impératif de rappeler **la difficulté rencontrée dans ce type d'étude** malgré l'évolution des connaissances. Depuis une dizaine d'années, on observe en effet un apport bénéfique d'études longitudinales des populations et une meilleure standardisation des procédures de diagnostic.

D'abord, la difficulté principale pour un épidémiologiste est d'identifier des cas de démences relatifs à la MA dans une population définie. Cette identification est souvent réalisée après une démarche active de sa part. Il est amené à poser lui-même un diagnostic compte tenu par exemple du fait que la maladie est soit non reconnue par la personne sondée, non reconnue par ses proches ou non diagnostiquée par son médecin traitant. L'épidémiologiste est alors contraint à se poser une question essentielle : où se situe la limite entre un trouble de la mémoire isolé et un véritable début de MA ? Sachant que le processus pathologique de la maladie d'Alzheimer est probablement actif de nombreuses années avant l'apparition des premiers signes cliniques, une difficulté supplémentaire s'ajoute à ce diagnostic et donc à l'étude épidémiologique. Compte tenu de toutes ces problématiques, plusieurs études réalisées en France ([Helmer, Peres](#)

[et al. 2008](#)) ou dans d'autres pays ([Tyas, Tate et al. 2006](#)) tenteraient à affirmer que **seulement un cas sur trois**, tous stades de la maladie confondus, **serait véritablement identifié**.

Par conséquent et à la vue des difficultés listées précédemment, des méta-analyses regroupant plusieurs données sont à privilégier. Ainsi au niveau européen, un groupe de recherche, intitulé EURODEM, a rassemblé les données obtenues entre 1980 et 1990 dans douze lieux d'enquêtes, incluant les résultats recueillis auprès de la population française ainsi que de six autres pays (Danemark, Espagne, Finlande, Grande-Bretagne, Suède, Pays-Bas). Les chiffres de prévalence des démences issus de cette étude nous montrent que leur fréquence augmente avec l'âge : ils atteignent moins de 2 % d'Européens entre 65 et 69 ans, plus de 30 % après 90 ans. Le taux d'incidence obtenu est ainsi de 2 pour 1 000 personnes/années entre 65 et 69 ans à 70 pour 1 000 personnes/années après 90 ans. Or, 70 % de ces démences sont à mettre sur le compte de la maladie d'Alzheimer (10% démences « vasculaire » et 20% démences mixtes).

En parallèle, du fait de la baisse de la fécondité et de l'allongement de l'espérance de vie, **la pyramide des âges dans les pays développés est largement bouleversée**. Aujourd'hui, ces deux phénomènes conjugués entraînent un vieillissement marqué de la population, allant de pair avec une augmentation considérable des pathologies liées à l'âge notamment les démences et en particulier la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, les prévisions rendues publiques par certains groupes se révèlent alarmistes. Dans le monde, **50 millions de personnes vivent actuellement avec une démence** alors que 75 et 130 millions de personnes en seront atteintes en 2030 et 2050 respectivement (World Alzheimer Report 2015). **En France**, alors que 860 000 personnes étaient touchées par la maladie d'Alzheimer en 2004, **1,3 million** pourraient être atteintes en 2020 et 2,1 millions en 2040 selon une évaluation ministérielle.

2. Coûts de la MA

Les conséquences sociales et humaines sont évidemment à mettre au premier plan mais des répercussions économiques sont également à prendre en compte. Une étude conduite par l'association France Alzheimer a estimé à plus de 1000€ par mois, le coût de la prise en charge d'une personne atteinte de la MA. Au niveau mondial, le coût global de la démence a augmenté de 35% entre 2010 et 2015 pour atteindre **818 milliards de dollars**, une somme équivalente au PIB de la Suisse ou la première valorisation boursière mondiale (dépassant Apple et ses 742 milliards de dollars en 2015).

III. Historique

Dès l'antiquité, philosophes, médecins et même juristes associèrent déjà l'augmentation de l'âge avec l'augmentation de démences. Solon parlait d'altération de jugement lié à l'âge de certaines personnes et pouvait dans ce cas permettre d'invalidier un « testament ». Platon quant à lui, reconnaissait qu'un état de folie ou de maladie pouvait excuser certains crimes comme les sacrilèges, la perfidie ou la haute trahison.

A Rome, aux I^{er} et II^{ème} siècles de notre ère, **Juvenal** écrivait dans son œuvre poétique Les Satires : « **De toutes les blessures corporelles, la démence est de loin la pire.** Celui qui en est atteint ne sait plus le nom de ses esclaves, ne reconnaît plus l'ami avec qui il a dîné la veille, ni ceux qu'il a engendrés et élevés ; et par un cruel testament, il déshérite les siens et fait don de toutes ses propriétés. ». Alors que Galien (II^{ème} siècle), est le premier à introduire le terme de « dementia » qu'il distingue bien de « delirium » compte tenu de l'évolution qualifiée respectivement de chronique ou d'aiguë.

Plus tard, Pinel en 1797, définit un nouveau terme du vocabulaire médical français : « démens », dérivé du latin : « de » (hors de) et « mens » (esprit). Le médecin, précurseur de la psychiatrie, caractérise la situation de ces démens par la disparition des qualités intellectuelles spécifiques de l'être humain ou « abolition de la pensée ». Les démences sont catégorisées à l'époque d'aliénation mentale comme les schizophrénies. Son élève, Esquirol, dissocie les démences des psychoses fonctionnelles. Il décrit justement que : « La démence est une affection cérébrale caractérisée par l'affaiblissement de l'intelligence, de la volonté, de la sensibilité ». Ainsi, « L'homme en démence est privé des biens dont il jouissait autrefois. C'est un riche devenu pauvre ; l'idiot a toujours été dans l'infortune et la misère ». Les notions de chronicité mais aussi d'incurabilité sont dès lors indispensables au diagnostic de démence.

En novembre **1901**, un médecin psychiatre, neurologue et neuropathologiste allemand du nom d'**Alois Alzheimer** examine pour la première fois **Auguste Deter**, une femme de 51 ans souffrant de troubles de mémoire, du langage et d'autres troubles psychologiques (désorientation, hallucinations, etc). Son état correspondait à ce que l'on appelait alors une démence. Particulièrement jeune pour présenter ces symptômes, le terme de « démence présénile » fût initialement diagnostiqué.

Auguste Deter décède le 8 avril 1906 et le Dr. Alzheimer obtient de la famille la permission de pratiquer une autopsie sur sa patiente. Il constate d'abord une **grande atrophie cérébrale**, particulièrement au niveau du cortex. Puis, au microscope, il observe grâce à une technique

d'imprégnation argentine deux types de dépôts anormaux **les plaques amyloïdes** et les **dégénérescences neurofibrillaires**, respectivement à l'extérieur et à l'intérieur de cellules nerveuses.

Le 4 novembre 1906, lors de la 37ème Conférence des psychiatres allemands à Tübingen, en Allemagne, Alois Alzheimer décrit pour la première fois cette « maladie particulière du cortex cérébral ». Deux articles très concis, écrits suite à cette présentation sont publiés en 1907 et en 1910, dans le Manuel de psychiatrie dirigé par **Emile Kraepelin**, alors directeur d'Alois Alzheimer. Le cas d'Auguste D. est pour la première fois nommé : maladie d'Alzheimer (ou démence pré-sénile). Alois Alzheimer évaluera en tout 5 cas de patients atteints de MA au cours du début du XX^{ème} siècle. En 1911, il publiera un article bien plus complet, interprétant minutieusement d'un point de vue clinique et neuropsychologique, l'un de ces cas : le patient Johann F. âgé de 54 ans. Bien plus tard, à l'analyse des sections neurohistologiques de ce patient retrouvées parmi les archives de l'Institut de neuropathologie de l'Université de Munich et à l'apport de méthodes modernes, Möller et Graeber, conclurent en 1998 à un cas de type « plaque-only » ([Moller and Graeber 1998](#)). A cela s'ajoute des informations sur la généalogie de Johann F, retrouvées par Klunemann et al, en 2002, qui notèrent des causes de décès plus ou moins semblables à partir de 1830 et concluant ainsi à une **prédisposition familiale** ([Klunemann, Fronhofer et al. 2002](#)). Alois Alzheimer aura donc détaillé les grands concepts de la maladie mais mourra prématurément le 19 décembre 1915 à l'âge de 51 ans. Ce qui est particulièrement marquant est que ces observations restent encore aujourd'hui les seules preuves utilisées pour **le diagnostic post-mortem de certitude** de la MA.

IV. Neuropathologie de la MA

Comme précédemment décrit, les premières observations réalisées par le Dr Alois Alzheimer au début du XX^{ème} siècle faisaient déjà état de trois caractéristiques neuropathologiques majeures : l'atrophie cérébrale, les dégénérescences neurofibrillaires et les plaques amyloïdes. D'autres éléments importants sont néanmoins manquants comme l'angiopathie amyloïde cérébrale, les pertes synaptiques ainsi que la réactivité astrocytaire et microgliale.

3. L'atrophie cérébrale

Il est d'abord à noter que, d'après des études post mortem, le volume du cerveau d'individus cognitivement sains diminue avec l'âge. Entre 30 et 50 ans, le volume cérébral diminue de 0,1 à 0,2% par an alors qu'après 70 ans, des diminutions allant de 0,3 à 0,5% par an sont à

noter ([Esiri 2007](#)). Ces variations apparaissent de façon uniforme dans la substance blanche mais présente plus de différences au niveau de la substance grise. Par exemple, les aires frontales et pariétales du cortex sont plus touchées que les aires temporales et occipitales. Par conséquent, le système ventriculaire s'élargit en réponse à ses modifications.

Dans la plupart des cas de patients atteints de MA, l'atrophie corticale est modeste mais globale, pas exclusive à certaines régions. Comme par diffusion, elle touche aussi bien les aires motrices primaires, sensorielles que visuelles. Là aussi, la perte de tissus cérébraux est finement corrélée avec une dilatation symétrique des ventricules latéraux. Pour ces patients examinés à un âge supérieur à 80 ans et comparés avec des patients non déments appariés en âge, les variations à l'intérieur des groupes sont telles qu'il est difficile, voire impossible de déterminer si la personne développe une MA ou non. Cependant, une atrophie significative de l'hippocampe associé à la dilatation sélective de la corne temporale adjacente du ventricule latéral peut représenter un indice relativement fiable et orientera le neuropathologiste vers un possible diagnostic futur de MA ([Perl 2010](#)).

A *contrario*, pour les cas les moins fréquents de MA précoce (habituellement examinés après décès à l'âge moyen de 65 ans), les différences de volume et d'épaisseur corticale avec celles d'individus appariés en âge apparaissent alors très clairement. L'atrophie cérébrale est très variable, elle résulte en une perte de poids cérébral de 200 à 500 g (sur un poids moyen d'environ 1,3 kg) et touche principalement les régions médio-temporales. En plus de l'examen *post-mortem*, l'atrophie peut également être mise en évidence *in vivo* par des techniques d'imagerie, notamment l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (**Figure 1**).

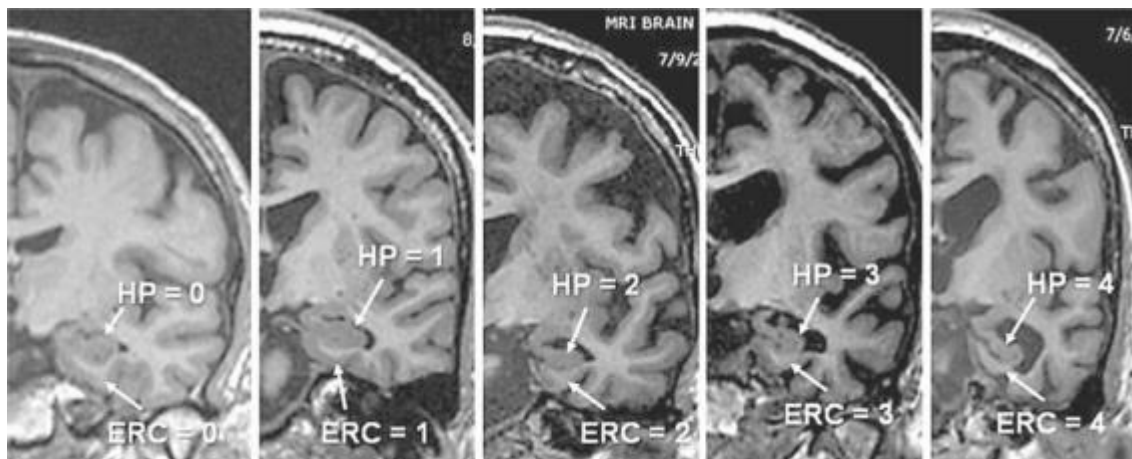


Figure 1 : Visualisation de l'atrophie cérébrale par IRM

Evaluation visuelle semi-quantitative de l'atrophie tempore médiane par IRM. Quatre degrés d'atrophie de l'hippocampe [HP] et du cortex entorhinal [ERC] y sont décrits. 0 = Pas d'atrophie ; 1 = atrophie minimale ; 2 = atrophie légère ; 3 = atrophie modérée ; 4 = atrophie sévère ([Varon, Loewenstein et al. 2011](#))

Ces cas sévères, mais rares, ont eu pour effet de profondément marquer l'esprit des médecins et chercheurs, de telle sorte que l'atrophie cérébrale est encore aujourd'hui considérée comme une altération majeure dans la MA. En 2011, l'agence européenne de médecine proposait même d'utiliser l'atrophie hippocampique comme marqueur acceptable d'entrée en essais clinique. Mais l'atrophie n'est en réalité jamais spécifique et elle ne touche pas uniquement les maladies neurodégénératives. Nous donnerons l'exemple des cas d'ischémies qui touchent alors une région cérébrale bien particulière. Nous l'avons vu, la perte de volume ou de poids n'est pas toujours significative dans les cas de MA les plus majoritaires ce qui fait de l'atrophie un marqueur plus que perfectible quant au diagnostic de la MA. En 2013, ([Erten-Lyons, Dodge et al. 2013](#)) ont d'ailleurs réussi à montrer que l'expansion ventriculaire était bien mieux corrélée à la pathologie que le volume hippocampique lui-même. Le diagnostic final de la MA ne peut donc se faire uniquement sur cette simple analyse et nécessite un examen microscopique supplémentaire.

4. Le dépôt de plaques amyloïdes

Dans son rapport original, Alois Alzheimer décrit en premier lieu la présence de lésions cérébrales appelées par la suite plaques séniles ou plaques neuritiques. Elles sont **extracellulaires** et d'aspect fibrillaire sous observation par microscopie électronique. Ces plaques séniles sont des structures complexes définies par la présence de peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ (pour 40 et 42 acides aminés) de 4 kDa, repliés en configuration de type feuillets β -plissés et s'accumulant autour d'un noyau dense ([Kang, Lemaire et al. 1987](#)). Il est à noter que l' $A\beta_{1-42}$ se retrouve en plus grande quantité dans les plaques que l' $A\beta_{1-40}$ en raison de son fort taux de fibrillation et d'insolubilité ([Serrano-Pozo, Frosch et al. 2011](#)). Ces peptides $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$ dérivent du clivage de la protéine APP (protéine précurseur de l'amyloïde) que nous détaillerons un peu plus loin dans cette introduction (Chapitre II, I, 2).

La configuration particulière de ces plaques, fait qu'elles vont pouvoir fixer certains colorants chimiques comme le Rouge Congo ou la thioflavine S. En particulier, la production de biréfringence après stimulation sous lumière polarisée, fait qu'elles répondent à la définition physique de « composés amyloïdes » et explique pourquoi ces plaques sont plus usuellement appelées : plaques amyloïdes. D'autres plaques sont plus diffuses. Elles ne présentent pas de feuillets β -plissés et sont donc non détectables par ces deux colorants. Celles-ci sont alors immunomarquées à l'aide d'anticorps dont les clones 4G8 et 6E10 sont les plus utilisés. Nous pouvons également citer le clone BAM10 pour sa capacité à détecter les oligomères d' $A\beta$ (**Figure 2**).

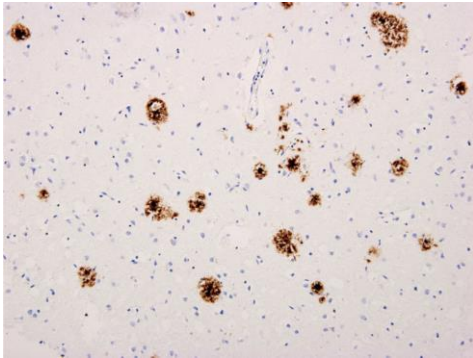


Figure 2 : Immunomarquage de plaques amyloïdes

Cortex temporal de patient atteint de la MA à un stade terminal et présentant une accumulation importante de plaques séniles immunomarquées à l'aide de l'anticorps 4G8 et observées sous microscope (magnification 100X) ([Perl 2010](#)).

En 2002, Thal décrit une corrélation entre la présence de plaques amyloïdes et la progression de la maladie. Celle-ci se divise alors en cinq phases caractéristiques de séquences spatiales distinctes, et dans lesquelles la plupart des régions cérébrales sont hiérarchiquement impliquées (**Figure 3**) ([Thal, Rub et al. 2002](#)).

La phase I de Thal est caractérisée par le dépôt de plaques amyloïdes exclusivement dans les régions du néocortex représentées en rouges (frontal, pariétal, temporal et occipital).

Une progression centripète s'initie alors, le cortex insulaire, le cortex entorhinal et la région du CA1 de l'hippocampe développent alors des dépôts et définit ainsi la phase II de Thal.

Lors de la phase III de Thal, d'autres structures comme l'amygdale, le thalamus, le striatum et la substance blanche sont touchées.

La phase IV de Thal est caractérisée par une atteinte au niveau du noyau olivaire inférieur, la formation réticulée, le CA4 et la substance noire.

Enfin, des dépôts d'A β sont visibles y compris dans le cervelet et notamment au niveau de sa couche granulaire qui semble être l'une des dernières régions touchées par ces lésions.

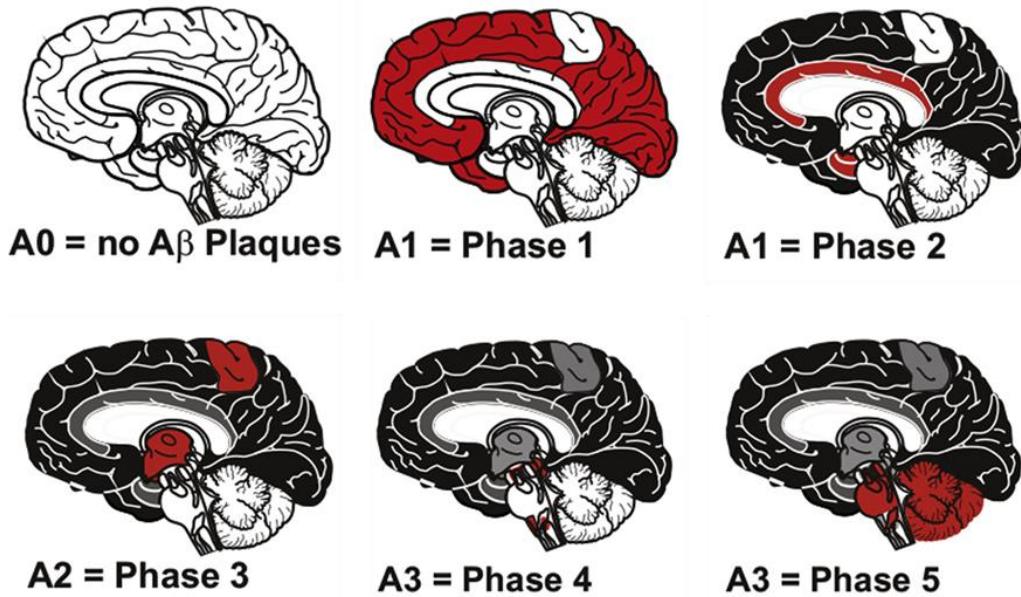


Figure 3 : Progression spatio-temporelle des plaques amyloïdes dans le cerveau de patients avec MA

Classification des différentes phases de dépôt d'A β après l'analyse de 47 cerveaux de patients atteints de MA et 4 cerveaux de patients non déments. Les lésions amyloïdes ont été observées par coloration Campbell-Switzer et par immunohistochimie ([Thal, Rub et al. 2002](#)).

L'examen *in vivo* du dépôt d'A β est d'ores et déjà effectué par imagerie, en particulier par tomographie par émission de positons (TEP). L'utilisation de traceurs radioactifs comme le PIB (Pittsburg Compound-B), le SB-13 ou le BF-227 permettent en effet de visualiser les dépôts amyloïdes en se fixant sur les feuillets β -plissés. En particulier, la fixation du PIB est augmentée de 50% chez des patients avec MA légère par rapport aux patients non déments appariés en âge. Cette hyperfixation est localisée principalement au niveau du cortex frontal et tempora-pariétal et permet selon les auteurs de discriminer 90 % des patients atteints à un stade léger (**Figure 4**) ([Edison, Archer et al. 2007](#)).

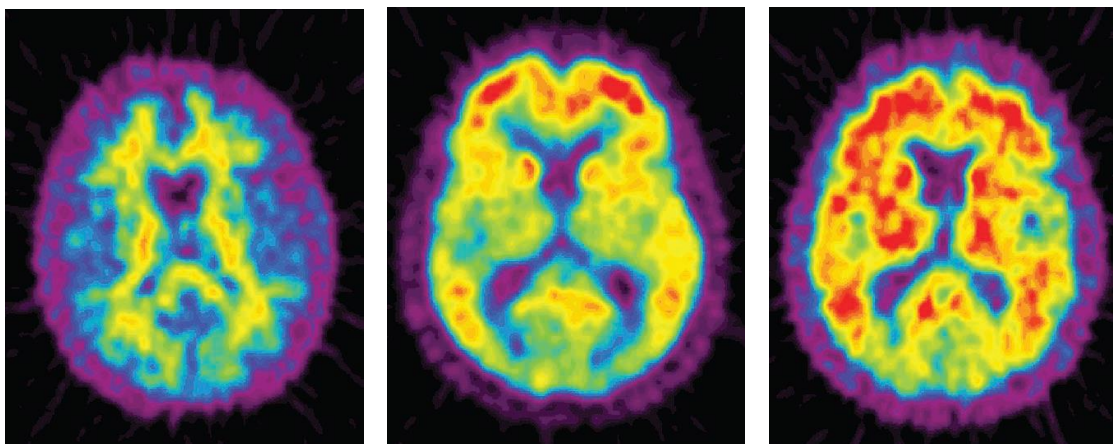


Figure 4 : Visualisation in vivo du dépôt de plaques amyloïdes

TEP avec PIB décrivant une hyperfixation cérébrale des dépôts amyloïdes au stade prodromal (image du centre) et au stade de démence légère (image de droite) comparé à un patient sain apparié en âge (image de gauche) ([Krolak-Salmon 2010](#)).

Par ailleurs des études clinicopathologiques ont montré que la charge amyloïde (incluant tout autant les plaques à noyaux denses que les plaques diffuses) ne corrèle ni avec la sévérité, ni à la durée de la démence ([Arriagada, Growdon et al. 1992](#), [Giannakopoulos, Herrmann et al. 2003](#)). Par conséquent, le rôle délétère des plaques dans l'évolution de la maladie est actuellement très débattu. Par exemple, l'absence de celles-ci a été rapportée chez des patients atteints d'une forme familiale de la MA ([Tomiyama, Matsuyama et al. 2010](#)). Parallèlement, de nombreuses plaques sont retrouvées chez des patients non déments ([Mackenzie, McLachlan et al. 1996](#)). Enfin, certaines études suggèrent même une fonction protectrice ([DaRocha-Souto, Scotton et al. 2011](#)). Finalement, le rôle des plaques, l'une des deux lésions caractéristiques de la MA depuis le rapport princeps d'Alois Alzheimer, n'est toujours pas totalement compris.

5. L'angiopathie amyloïde cérébrale

En plus de l'accumulation d'A β en plaques séniles dans le parenchyme, ces peptides ont également tendance à se déposer au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins cérébraux, en commençant d'abord dans les régions du néocortex. Le principal composant de l'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC) est le peptide A β ₁₋₄₀, plus soluble que l'A β ₁₋₄₂ ([Yamada 2015](#)). L'AAC est souvent appelée angiopathie congophile, du fait qu'elle fixe le rouge Congo. Les peptides A β vont s'accumuler surtout dans l'espace extracellulaire des cellules musculaires lisses de la média (**Figure 5**). Lorsque le degré de sévérité est trop important, des ruptures vasculaires spontanées vont conduire à des accumulations de sang à l'intérieur du parenchyme (hémorragies cérébrales), visibles à l'IRM (**Figure 5**). Près de 90 % des patients atteints de MA présentent une AAC à

l'autopsie. Mais de même que pour les plaques amyloïdes, le taux d'AAC s'élève de 20 à 40 % chez des sujets non-déments appariés en âge ([Miller-Thomas, Sipe et al. 2016](#)).

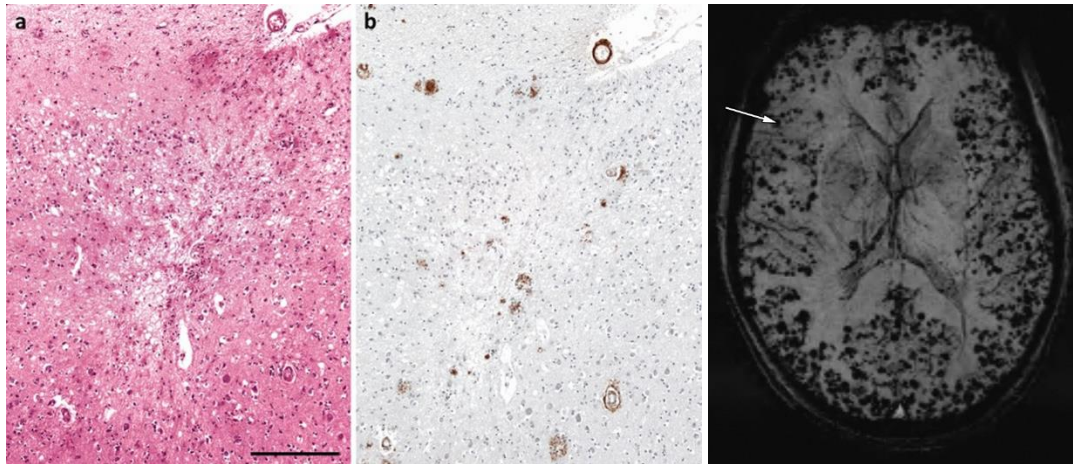


Figure 5 : Microhémorragies dans le cortex cérébral associées à l'AAC

(a) Microhémorragies dans le cortex cérébral où les lésions apparaissent gliotiques et incluent des macrophages. (b) Immunohistochimie contre l'Aβ sur une coupe adjacente et révélant une CAA à un stade modérément sévère ([Love and Miners 2016](#)). Image de droite : imagerie IRM montrant de très nombreuses microhémorragies corticales et sous corticales ([Miller-Thomas, Sipe et al. 2016](#)).

6. Les dégénérescences neurofibrillaires

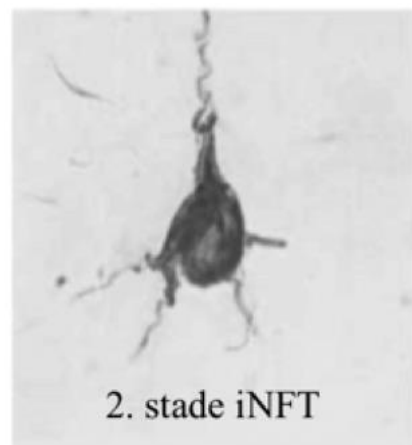
La seconde lésion pathologique que nota Alois Alzheimer fût la présence d'inclusions fibreuses anormales à l'intérieur du cytoplasme de neurones pyramidaux. Ces inclusions sont toujours appelées dégénérescences neurofibrillaires (DNFs ou encore NFT en anglais) et constituent aujourd'hui la seconde lésion cérébrale typique, devant être associée aux plaques séniles pour le diagnostic définitif d'un cas supposé de MA.

Des études d'ultrastructure par microscopie électronique révèlent que les DNFs sont composées de filaments appariés en hélice (ou Paired Helical Filaments (PHF) en anglais) ou enchevêtrements neurofibrillaires de 10 μm de diamètre et dont le pas de l'hélice n'excède pas 80 μm ([Kidd 1963](#)). Le composant majeur de ces enchevêtrements est la protéine Tau (pour Tubulin associated unit) faisant partie de la famille des protéines associées aux microtubules (MAP). Les protéines Tau jouent un rôle dans le maintien des microtubules, structures protéiques assurant au sein des neurones le transport de vésicules. Elles sont physiologiquement phosphorylées à raison de 2 à 3 moles de phosphates par mole de protéine Tau. Dans le cas de la MA, les protéines Tau sont hyper-phosphorylées ou anormalement phosphorylées, 5 à 9 moles de phosphates par mole de protéine Tau y sont alors retrouvés ([Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986](#), [Greenberg, Davies et al. 1992](#)). Ces changements post-traductionnels pathologiques sont alors à

l'origine de leurs séparations avec les microtubules et conduisent *in fine* à l'apparition de DNFs (nous en discuterons plus précisément dans le Chapitre II, I, 3 de cette introduction).

Les DNFs sont très difficiles à visualiser avec les marquages morphologiques traditionnels comme l'hématoxyline et l'éosine. Quelques techniques par imprégnation argentique (Gallyas ou Bielschowski) ou par fluorescence (thioflavine S) peuvent cependant très bien les marquer. De plus, des techniques basées sur l'utilisation d'anticorps ont l'avantage d'être dirigées spécifiquement contre différentes formes hyper-phosphorylées de protéine Tau. En particulier, des sites de phosphorylation pathologiques plus ou moins précoces vont ainsi être détectés, permettant de définir trois grands types majeurs de DNF en fonction de l'avancé dans la pathologie (**Figure 6**) ([Augustinack, Schneider et al. 2002](#)).

- Le stade pre-tangle (ou pré-dégénérescence) correspond à un stade de dégénérescence diffuse. Le signal Tau est diffus et parfois punctiforme dans le cytoplasme de neurones. La morphologie du neurone est encore épargnée : avec des dendrites et noyaux intacts.
- Le stade iDNF (pour intra- dégénérescence) est quant à lui caractérisé par des agrégats filamenteux de protéine Tau dans le cytoplasme conduisant à un déplacement du noyau en périphérie. Les dendrites et le segment proximal de l'axone semblent déformés.



- Le stade eDNF (pour extra-dégénérescence) est finalement facilement identifiable : le neurone est atrophique, sans noyau et sans réelle limite cytoplasmique. On parle de « dégénérescence fantôme ».

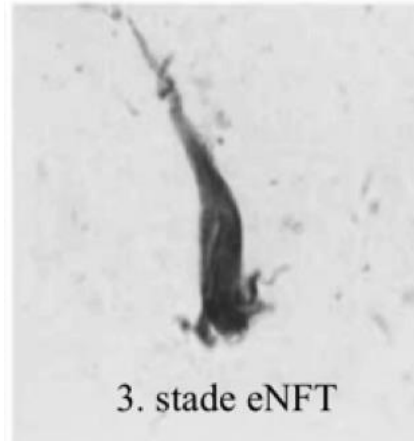


Figure 6 : Illustrations des différents stades de DNFs

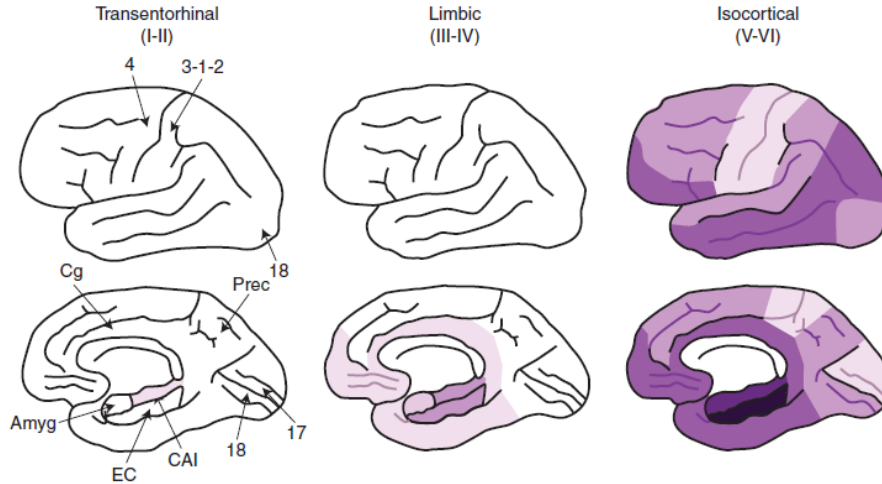
Exemples de DNF marquées avec l'anticorps TG3. Trois stades distincts sont ici présentés : 1 : « pré-dégénérescence » ; 2 : « intra-dégénérescence » ; 3 : « extra-dégénérescence » ([Augustinack, Schneider et al. 2002](#)).

Il est à noter que tous les neurones ne sont pas touchés de la même manière par cette pathologie ciblant les protéines Tau. Les neurones étoilés de la couche II, ceux de la partie superficielle de la couche III, les grands neurones multipolaires de la couche IV du cortex entorhinal, les neurones de la couche pyramidale du CA1 de l'hippocampe, ceux du subiculum et les neurones pyramidaux des couches III et V des aires du néocortex sont préférentiellement atteints ([Hyman, Van Hoesen et al. 1984](#), [Arnold, Hyman et al. 1991](#), [Braak and Braak 1991](#)).

De manière similaire aux plaques séniles, la progression spatio-temporelle de la DNF a été étudiée. Elle apparaît comme stéréotypée et prévisible selon une étude clinicopathologique. Braak et Braak ont été capables de différencier 6 stades distincts que l'on résume en 3 étapes clés : transentorhinal, limbique et néocortex. Les DNFs apparaissent d'abord dans l'allocortex de la partie médiale du lobe temporal (cortex entorhinal puis hippocampe) pour s'étendre jusqu'au néocortex associatif. Il est important de noter que les aires primaires sensorielles, motrices et visuelles sont relativement épargnées (**Figure 7**).

Figure 7 : Progression spatio-temporelle des lésions DNFs dans le cerveau de patients avec MA

Le violet indique ici la distribution des lésions. Les tons foncés représentent quant à eux une densité élevée de DNF. Amyg : Amygdale ; EC : Cortex entorhinal ; CA1 : aire CA1 de l'hippocampe ; Cg : Cortex cingulaire ; Prec : Précuneus ; 4 : Cortex primaire moteur ; 3-1-2 : Cortex primaire sensoriel ; 17 : Cortex primaire visuel ; 18 : Cortex associatif visuel ([Serrano-Pozo, Frosch et al. 2011](#)).



Les DNFs peuvent être visualisées par imagerie *in vivo* à l'aide de la TEP. Quelques radiotraceurs sélectionnés pour leurs qualités de quantification, reproductibilité et de liaison spécifique aux dépôts de Tau agrégés dans le cerveau ont été produits. La plupart d'entre eux s'accumulent sur les feuillets β -plissés des fibrilles de Tau et sont insensibles aux oligomères Tau. Le [18F] FDDNP est le premier radiotraceur décrit ([Shoghi-Jadid, Small et al. 2002](#)). Du fait de sa limitation à différencier les DNFs des lésions neuronales observés chez des patients atteints de paralysie supranucléaire progressive, de nouvelles petites molécules de la famille des quinoline, démontrant une haute sélectivité vis-à-vis des agrégats de Tau ont pris le relais. Ainsi, le radiotraceur [18F] THK-5117, permet la visualisation de différents stades de la MA (léger, modéré et sévère). La rétention du traceur est en effet associée à la sévérité de la démence et de l'atrophie, validé par observation post mortem des cerveaux (**Figure 8**) ([Okamura, Furumoto et al. 2014](#)).

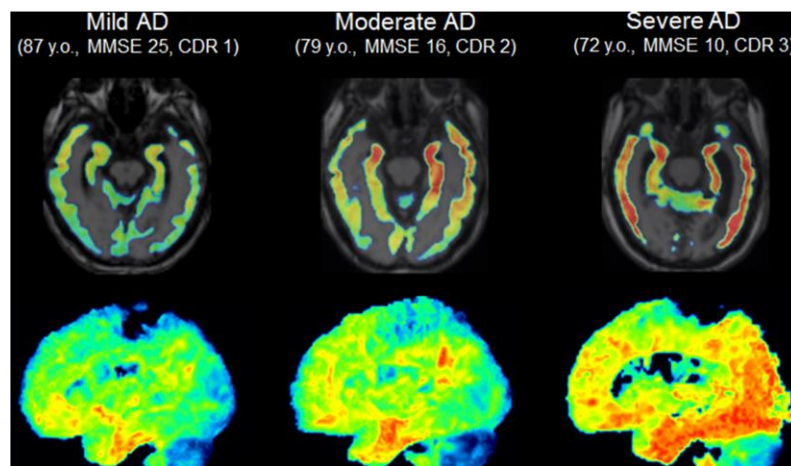


Figure 8 : Visualisation *in vivo* de l'accumulation des DNFs

Images TEP de cerveaux de patients atteints de MA au stade léger, modéré et sévère obtenues avec le radiotracer [18F]THK-5117. Le traceur s'accumule dans des régions spécifiques en accord avec les stades de progression de la pathologie Tau décrits par Braak et Braak ([Okamura, Furumoto et al. 2014](#)).

La répartition spatio-temporelle des DNFs est initialement restreinte à certaines aires cérébrales profondes/centrales pour ensuite se propager graduellement vers le néocortex. Elle est ainsi dite « centrifuge » à l'inverse du motif de diffusion des plaques séniles. Des études ont par ailleurs montré que la progression des DNFs corrélait bien mieux que celles des plaques amyloïdes avec le degré de sévérité de la maladie.

7. La perte neuronale et synaptique

La MA étant une maladie neurodégénérative, la mort neuronale a longtemps été considérée comme l'un des signes principaux de cette maladie. Elle explique en grande partie l'atrophie cérébrale observée dans les cas les plus précoces et est le résultat de l'engagement de la pathologie ciblant les protéines Tau. Elle apparaît d'ailleurs après le stade d'extradégénérescence. Par ailleurs, le processus d'apoptose, ou mort cellulaire programmée, serait également impliqué puisqu'il a été retrouvé des signes caractéristiques de cellules rentrant en apoptose au cours de la MA ([Selznick, Holtzman et al. 1999](#)).

On peut aisément imaginer que la mort neuronale entraîne une perte synaptique. Mais en réalité, la mort neuronale suit une perte synaptique plus précoce. Il a effectivement été montré par Masliah puis par Scheff qu'une perte substantielle du profil synaptique apparaît dans le cerveau de patients atteints de la MA ([Masliah 1995](#)). Cela a été observé par quantification après immunomarquage à l'aide d'anticorps dirigés contre des protéines synaptiques comme la synaptophysine, dont une perte moyenne de 50 % de la densité en boutons pré-synaptiques a été observée ([DeKosky and Scheff 1990](#)). Mais également par microscopie électronique quantitative avec laquelle un déclin significatif du nombre de synapse dans la couche moléculaire interne du gyrus denté de l'hippocampe a été décrit ([Scheff and Price 1998](#)). En plus des observations morphologiques, il est admis qu'un déficit de neurotransmetteurs, en particulier l'acétylcholine, s'accroît avec la progression de la maladie ([Mufson, Counts et al. 2008](#)). Ces auteurs supportent l'idée que la perte de cet élément critique dans la communication neurone-neurone joue un rôle majeur dans le déclin cognitif dans la MA. A ce titre, elle pourrait être qualifiée de maladie synaptique lors des phases précoces, avant même d'être une maladie neurodégénérative.

8. La réactivité astrocytaire et microgliale

L'activation de cellules gliales, astrocytes et microglie, est une composante essentielle associée aux lésions cérébrales caractéristiques de la MA. Dès son rapport original, Alois Alzheimer relata la présence de ce type de cellules. En réponse à la pathologie, ces deux populations cellulaires participent activement à la neuroinflammation. Les astrocytes réactifs peuvent être détectés par la GFAP ou la vimentine alors que les cellules microgliales sont quant à elles mises en évidence notamment grâce aux marqueurs IBA1, CD68 ou encore CD11b (**Figure 9**).

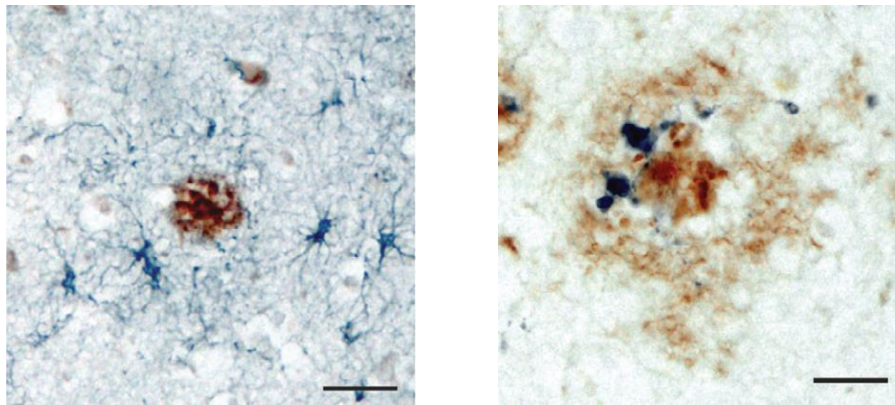


Figure 9 : Illustration de la gliose péri-plaques

Astrocytes et cellules microgliales sont des acteurs clés dans la réponse inflammatoire associée aux lésions de la MA. Cellules GFAP positives (astrocytes) en bleu autour d'une plaque sénile (marron) dans le cortex pariétal de cas atteint de la MA (image gauche). Cellules CD-11b positives (microglie) en bleu proches d'une plaque sénile en marron dans le cortex pariétal d'un patient atteint de MA (image de droite) ([Heneka, Carson et al. 2015](#)).

D'abord considéré comme un épiphénomène accompagnant les plaques séniles et les DNFs, de plus en plus de preuves démontrent l'importance des astrocytes dans la progression de la MA. Bien que leurs apports soient considérés par certains spécialistes comme délétères ou par d'autres comme bénéfiques ([Heneka, Kummer et al. 2014](#), [Heppner, Ransohoff et al. 2015](#)) nous savons que ces cellules possèdent des récepteurs capables de reconnaître les motifs de protéines agrégées ou mal repliées. Ainsi, cette reconnaissance suffit à induire une réponse inflammatoire innée de la part de ces cellules, incluant la libération de médiateurs inflammatoires et l'augmentation de leurs capacités de clairance (phagocytose) ([Heneka, Carson et al. 2015](#)).

In vivo, l'inflammation cérébrale résultant de l'activation des cellules microgliales peut être détecté par imagerie TEP et l'utilisation de plusieurs radiotraceurs se liant à la protéine TSPO (une protéine translocatrice de la membrane mitochondriale externe). Récemment, le [18F] DPA-714, l'une des toutes dernières générations, a permis de montrer que la fixation de ce radiotraceur

était retrouvée élevée dans le cortex temporo-pariétal de sujets atteints de MA comparés à des sujets sains. Cette hyperfixation se trouve corrélée au degré d'atteinte mnésique, à la quantité d'amyloïde agrégé (évalué par PIB) et au volume de la substance grise ([Hamelin, Lagarde et al. 2016](#)).

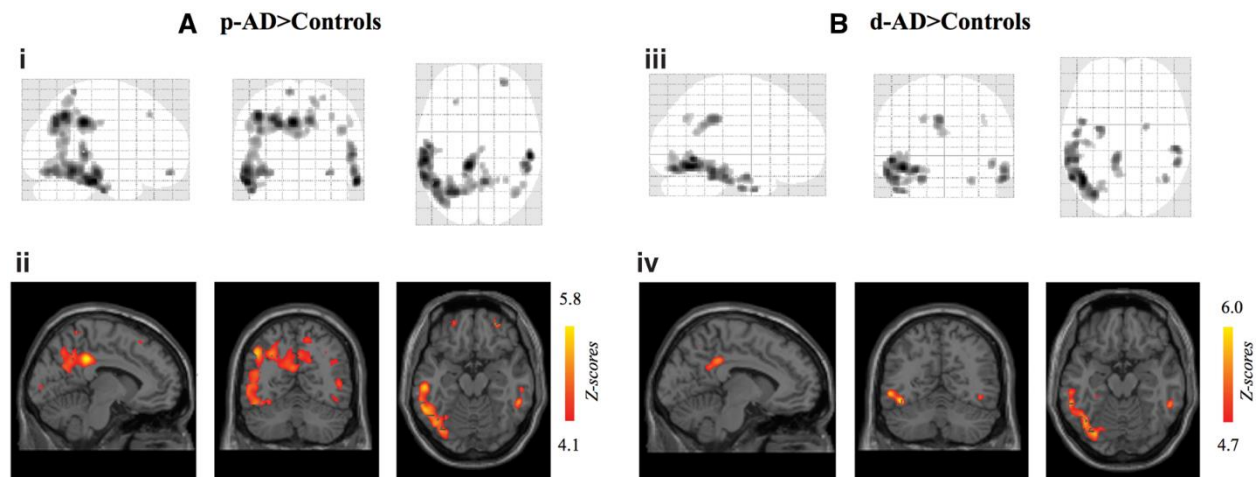


Figure 10 : Visualisation in vivo de l'activation de la microglie dans le cerveau de patients avec MA

Analyse cartographique de la fixation de [18F]DPA-714 entre patients avec une MA au stade prodromal comparé aux patients non atteints (A) et entre patients avec une MA au stade de démence comparé aux patients non atteints (B) ([Hamelin, Lagarde et al. 2016](#)).

Il y a maintenant plus de 100 ans qu'Alois Alzheimer a décrit pour la première fois les deux lésions cérébrales de la MA. Celles-ci sont ainsi enseignées, connues et acceptées de tous depuis des années. Pour preuve, elles sont la plupart du temps citées dès les premières phrases d'une publication scientifique ou d'un article de presse généraliste. Il est vrai que pour quelques rares cas de MA précoce et sévère, le diagnostic neuropathologique basé sur celles-ci peut être établi avec une précision importante. Il en résulte que ce sont principalement ces seuls éléments de la maladie qui ont été utilisés pour la création de modèles animaux, la pose de diagnostic ou encore la recherche de thérapies contre la MA. Nous l'avons pourtant décrit dans cette partie, pour la très grande majorité de patients

souffrant de la MA, la distinction avec un vieillissement normal est plus difficile. Le développement de ces deux lésions est alors plus progressif. Cette notion suggère qu'il existe des éléments plus subtils intervenant bien en amont de la formation de plaques séniles ou des dégénérescences neurofibrillaires et qui doivent aujourd'hui représenter la pierre angulaire des recherches sur la MA.

V. Etiologie de la maladie d'Alzheimer

Nous l'avons déjà quelque peu évoqué plus haut, la maladie d'Alzheimer peut être divisée en deux formes assez distinctes. Dans ces prochains paragraphes, nous décrirons d'abord la forme familiale ou génétique et les différentes formes de mutations génétiques qui y sont associées. La forme sporadique sera ensuite décrite. Dans les deux cas, **l'âge est le principal facteur de risque** mais nous discuterons des autres éléments associés à la forme sporadique de la maladie. Cet exposé d'épidémiologie permettra surtout d'illustrer notre faible connaissance à propos de cette dernière forme.

1. Les formes familiales de la MA

Les patients atteints de formes familiales de la MA (**FAD**) **sont très minoritaires** puisqu'ils représentent moins de 1 % des cas. Le caractère héréditaire et le fait que les symptômes apparaissent de façon prématuré chez l'adulte (entre 30 et 50 ans) définissent ces formes bien particulières de la MA. Elles sont dues à des mutations à pénétrance complète de trois gènes différents : **APP**, **PSEN1** et **PSEN2**.

Le gène *APP* est situé sur le **chromosome 21 humain** et a été le premier des trois gènes précédemment cités à être identifié en 1987 ([Goldgaber, Lerman et al. 1987](#), [Kang, Lemaire et al. 1987](#), [Tanzi, Gusella et al. 1987](#)). Une première mutation du gène *APP*, héréditaire et de type hollandais, fût identifiée en 1990 ([Levy, Carman et al. 1990](#)) mais associée à uniquement à des hémorragies cérébrales. C'est en 1991 que la première mutation du gène *APP* conduisant à une forme familiale de MA fut découverte. Nommée depuis cette date « mutation londonienne », elle représente une mutation faux-sens (V717I) ([Goate, Chartier-Harlin et al. 1991](#)). Peu après 1991, le lien de causalité entre la mutation de l'*APP* et l'augmentation du peptide A β a été démontré

([Citron, Oltersdorf et al. 1992](#), [Cai, Golde et al. 1993](#)). Depuis, en incluant les duplications, plus de 50 mutations de ce gène ont été mises en évidence (Alzforum).

Le gène *PSEN1*, ou *PS1*, est situé sur le chromosome 14 humain. Les premières mutations associées aux FAD furent identifiées en 1995 ([Sherrington, Rogaev et al. 1995](#)). Aujourd'hui, plus de 240 mutations ont été répertoriées sur ce gène et elles représentent jusqu'à **70 % des causes de FAD**.

Enfin, le gène *PSEN2*, ou *PS2*, est localisé sur le chromosome 1. La première mutation conduisant à une FAD fût décrite très peu de temps après celle de son homologue *PSEN1* ([Levy-Lahad, Wasco et al. 1995](#)) et 45 mutations (Alzforum) sur ce gène ont été découvertes depuis. Trois ans après la découverte des mutations liées aux *PSEN 1* et *2*, leurs rôles ont été précisés. Les présénilines font parties d'un complexe oligomérique appelée γ -sécrétase. Elles constituent les sites catalytiques de cette protéase qui est impliquée dans le clivage notamment de l'APP.

Globalement, les mutations des gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2* entraînent une modification des protéines conduisant à augmenter le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ([Tanzi and Bertram 2005](#)). Nous noterons tout de même que la mutation Suédoise de l'*APP* (K595N/M596L) augmente indépendamment toutes les espèces d' $A\beta$. D'autres entraînent la substitution d'acides aminés dans la région codant pour l' $A\beta$ et favorisent ensuite leur agrégation. Enfin, les mutations touchant les *PSEN* entraînent une augmentation de leurs activités protéolytiques expliquant ainsi une production accrue de peptides $A\beta$.

Bien que ne représentant moins de 1 % des patients atteints de MA, **ces formes familiales impliquant les mutations de ces trois gènes sont encore aujourd'hui l'un des seuls moyens d'études** permettant une meilleure compréhension des formes sporadiques plus communes. Pour preuve, c'est en étudiant des patients atteints de Trisomie 21 âgés exprimant *de facto* 3 copies du gène *APP*, que John Hardy et Gerald Higgins ont déduit que l'APP, son clivage en $A\beta$ et le dépôt de peptides amyloïdes constituaient certainement un événement majeur et initial dans la maladie. Cet élément leur a permis de formuler l'hypothèse de la cascade amyloïde, que je détaillerai plus tard compte tenu de son importance dans mon travail de thèse ([Hardy and Higgins 1992](#)).

2. Les formes sporadiques de la MA

Les formes sporadiques de la MA sont très largement majoritaires puisqu'elles représentent 99 % des cas. La grande différence avec les formes familiales est l'absence de facteur héréditaire identifié. Il serait faux de parler de formes non-génétiques puisque les facteurs de risque

généétiques et environnementaux interagissent ensemble. Il est par contre vrai qu'aucunes mutations sur les trois gènes cités plus haut ne sont retrouvées chez ces patients.

Les formes sporadiques peuvent être différenciées au moins en deux types, en fonction de l'âge d'apparition des symptômes : **les formes précoces** (Early-onset Alzheimer's) et **les formes tardives** (Late-onset Alzheimer's). Les formes précoces sont minoritaires (10 %), les troubles mnésiques et comportementaux apparaissent avant 65 ans. Les formes tardives sont finalement représentatives de la MA comme on l'entend au quotidien et sont définies par une atteinte comportementale bien après 65 ans. Dans ce cas, la complexité est très importante. Comme nous le savons maintenant, l'âge est le facteur le plus important, mais nous citerons ci-après des facteurs de risque qui ont été identifiés ces dernières années.

i. Facteurs de risques génétiques

Puisque les facteurs de risques génétiques et environnementaux interagissent ensemble dans le développement de la maladie, il est très difficile d'identifier de manière certaine de nouveaux *loci* d'intérêts. D'ailleurs, le seul variant génétique considéré comme un facteur de risque établi des formes sporadiques de la MA est **l'allèle $\epsilon 4$ du gène *APOE*** qui code pour l'apolipoprotéine E (ApoE) une glycoprotéine de 35 kDA ([Amouyel, Brousseau et al. 1993](#), [Strittmatter, Saunders et al. 1993](#)). Dans le système nerveux central, l'ApoE s'exprime principalement dans les astrocytes, mais aussi dans la microglie et les oligodendrocytes, où elle joue un rôle essentiel dans le transport du cholestérol et des phospholipides de ces cellules gliales vers les sites de régénération et de remyélinisation des membranes neuronales ([Poirier 2005](#)). Il existe trois allèles du gène *APOE* : *APOE* $\epsilon 2$ (7 à 8 % de la population), *APOE* $\epsilon 3$ (75 à 80 % de la population), *APOE* $\epsilon 4$ (15 % de la population). Alors qu'une copie de l'allèle $\epsilon 4$ augmente d'environ quatre fois le risque de développer une MA, **la présence de deux allèles augmentent ce risque de dix à douze fois**. Contrairement aux mutations rencontrées dans les formes familiales qui sont suffisantes pour causer la MA, **la présence d'allèle $\epsilon 4$ n'est ni nécessaire, ni suffisante pour induire la maladie**. La présence de cet allèle avance l'âge d'apparition de la MA de manière dose dépendante ([Corder, Saunders et al. 1993](#)). Il a été démontré que 62 % des patients atteints d'une forme sporadique de la MA possèdent l'allèle $\epsilon 4$. Enfin, les patients homozygotes pour $\epsilon 4$ présentent plus de dépôts amyloïdes que les patients homozygotes pour $\epsilon 3$. De façon intéressante, ces *loci* sont liés à une hypothèse émise par Finch, voulant que l'évolution des allèles $\epsilon 2$ et $\epsilon 3$ humains d'un gène $\epsilon 4$ ancestral (le seul isotype ApoE retrouvé chez les primates non humains) aurait facilité la croissance dramatique du cortex cérébral humain ([Finch 2003](#)). Potentiellement lié à cette hypothèse, l'expression exclusive (homozygotie) ou

même partielle (hétérozygotie) de l'allèle $\epsilon 4$ apporte des désavantages avérés, en particulier dans le cadre de la MA. Ainsi, d'après plusieurs études, (i) $\epsilon 4$ serait plus sensible que les autres isoformes à une dégradation pathologique diminuant donc la mobilisation lipidique et leur intérêt dans la réparation neuronale, la plasticité synaptique et leur pouvoir protecteur dans les processus neurodégénératifs ([Finch and Sapolsky 1999](#), [Acharya, Segall et al. 2002](#)) ; (ii) la formation accrue de fragments tronqués de l'isoforme $\epsilon 4$ favoriserait la formation de DNFs ([Shi, Yamada et al. 2017](#)) ; (iii) le dépôt de peptides A β serait plus prononcé dans les cerveaux des porteurs $\epsilon 4$ vieillissants ([Schmechel, Saunders et al. 1993](#), [Bennett, Wilson et al. 2003](#)) et (iv) les lésions cérébrales ischémiques et les lésions de la substance blanche liées à l'hypertension, facteurs de risques non génétiques développés plus bas, seraient favorisés chez ces patients $\epsilon 4$ positifs ([Laskowitz, Sheng et al. 1997](#), [de Leeuw, Richard et al. 2004](#)).

Ces dernières années ont vu l'avènement d'études d'associations pangénomiques ou **GWAS** en anglais (Genome-Wide Association Study) qui visent à corrélérer les variations génétiques d'une population humaine importante à leurs traits phénotypiques. Regroupant actuellement des dizaines de milliers de participants, elles comparent des sujets sains à des patients pour déterminer la fréquence des altérations alléliques associées aux pathologies ([Tosto and Reitz 2013](#)). Dans le cadre de la MA, ces GWAS ont mis en évidence de nombreux *loci*. Outre le métabolisme de l'APP, lié aux formes familiales de la MA, plus de 20 gènes associés aux formes sporadiques ont pût être identifiés et regroupés en trois grandes familles relatives à leurs fonctions physiologique (**Figure 11**).

- **Le métabolisme du cholestérol et le transport lipidique** : *APOE*, *SORL1*, *CLU*, *SLC24A4* et *ABCA7*. Comme évoqué plus haut, l'identification d'ApoE $\epsilon 4$ a permis de souligner l'importance du métabolisme du cholestérol. Les GWAS ont quant à elles mises en évidence d'autres gènes de la même voie confirmant ainsi cette piste.
- **L'immunité et la neuroinflammation** : *TREM2*, *CR1*, *CD33*, *INPP5D*, *CLU*, *EPHA1* et *MS4A*. Ici, je discuterais en particulier de *TREM2*, puisque des variants hétérozygotes rares ont été associés à un risque accru de développer la MA ([Guerreiro, Wojtas et al. 2013](#), [Jonsson, Stefansson et al. 2013](#)). *TREM2* code pour un récepteur exprimé notamment par la microglie et étant capable de phagocyter l'A β mais aussi moduler l'inflammation ([Frank, Burbach et al. 2008](#), [Wang, Cella et al. 2015](#)).

- **La transmission synaptique et l'endocytose** : *CLU*, *PICALM*, ***BIN1***, *SORL1*, *RIN3*, *PTK2B*, *MEF2C*, *EPHA1* et *CD2AP*. La perturbation de l'activité synaptique est l'un des symptômes de la MA. *BIN1* code pour une protéine adaptatrice impliquée dans l'endocytose dépendante de la clathrine et le recyclage des vésicules synaptiques. Alors qu'il a été identifié comme facteur de risque de la forme tardive de la MA, son mécanisme pathologique n'est pas encore connu, il a malgré tout été proposé comme modulateur de la pathologie Tau ou affectant le transport de BACE et son action sur le métabolisme de l'APP.

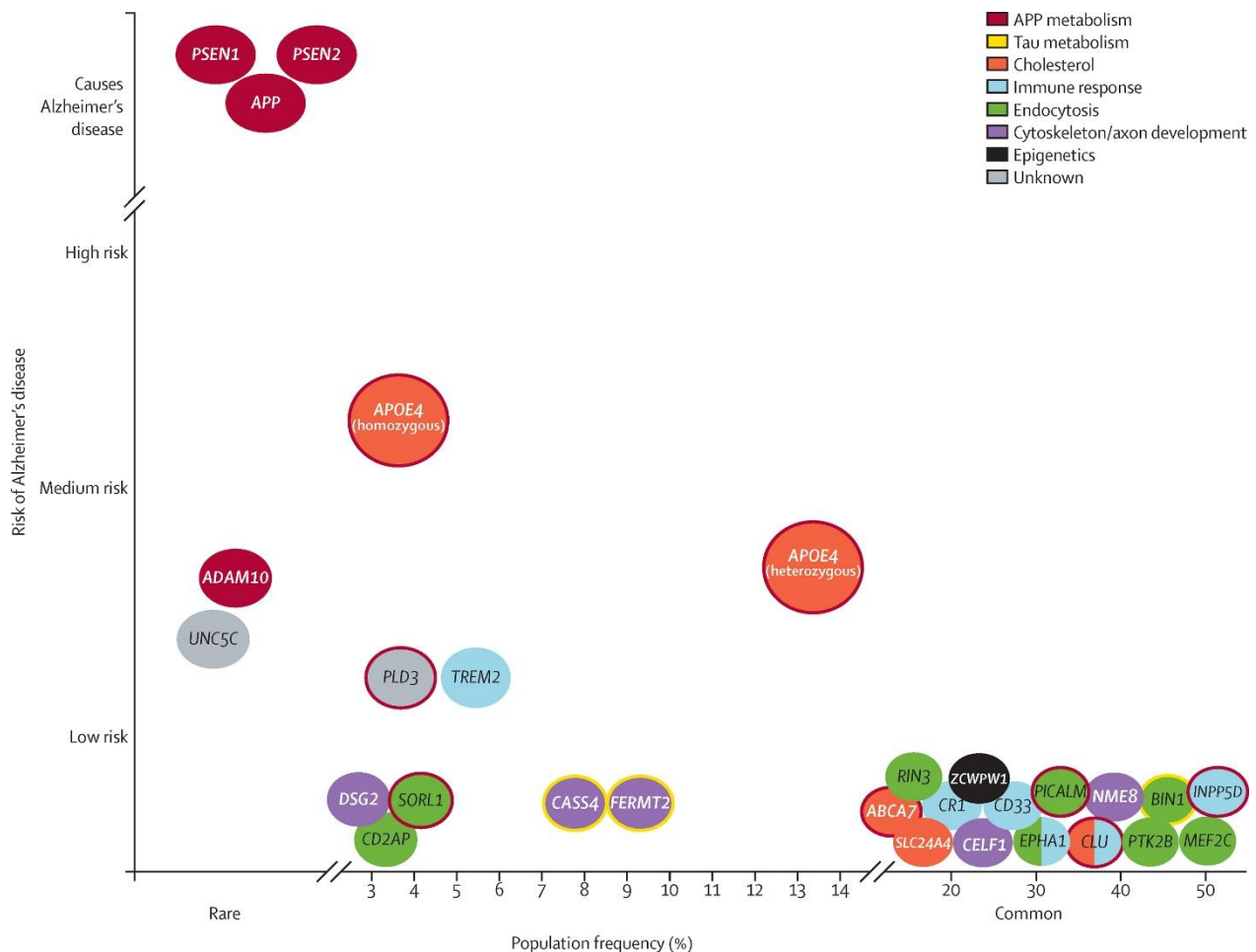


Figure 11 : Vue d'ensemble des gènes impliqués dans la MA

Graphique représentant le poids du facteur de risque en fonction de sa fréquence dans la population. Les couleurs indiquées en légende (coin supérieur droit) font état de l'appartenance du gène à l'une des huit grandes fonctions physiologiques (Scheltens, Blennow et al. 2016).

Il est intéressant de noter ici que ces variants génétiques sont liés de manière plus ou moins forte à la MA et n'ont pas la même fréquence dans la population. Par exemple, *ApoE* est le gène le plus étroitement lié à la pathologie mais est présent chez une partie de la population relativement faible. *A contrario*, les variants de *BIN1* retrouvés dans près de 50 % de la population ne représentent qu'un risque modéré de développement de la MA.

ii. Facteurs de risques non génétiques

Comme nous l'avons vu précédemment, le principal facteur de risque des formes sporadiques (mais aussi des formes familiales) de la MA est l'âge. D'importance moindre mais réelle, d'autres facteurs dissociés des mutations génétiques peuvent être évoqués.

Le **sexe** est ainsi considéré comme un tel facteur puisque les femmes sont plus touchées que les hommes. La première raison est une nouvelle fois liée à l'âge étant donné que l'espérance de vie des femmes est plus importante que celle des hommes. La seconde raison est d'ordre hormonal. Ainsi, l'arrêt brutal de la sécrétion d'hormones stéroïdes sexuelles féminines à la ménopause serait d'autant plus délétère qu'il est connu que certaines d'entre elles montrent des effets neuroprotecteurs, notamment l'estradiol ([Dubal and Wise 2002](#)). Cette notion serait confirmée par l'étude de cas de ménopauses chirurgicales ([Pines 2014](#)). La pathologie serait plus sévère chez la femme. Par ailleurs, l'allèle $\epsilon 4$ du gène APOE est davantage associé à la MA chez les femmes que chez les hommes ([Farrer, Cupples et al. 1997](#), [Altmann, Tian et al. 2014](#)).

Le **diabète de type 2** (non insulino-dépendant), représentant la grande majorité des diabètes, est également corrélé à une vulnérabilité accrue au développement de la maladie ([Leibson, Rocca et al. 1997](#), [Luchsinger, Tang et al. 2001](#)). En outre, l'hyperinsulinémie cérébrale augmenterait la charge en plaques séniles et induirait une augmentation de la phosphorylation des protéines Tau ([Moreira, Campos et al. 2013](#)).

iii. Facteurs protecteurs non génétiques

De nombreux facteurs influençant positivement le vieillissement cérébral et de fait, considéré comme « protecteurs contre la MA », la maladie cérébrale la plus fréquente associée à l'âge sont connus du grand public. Ils sont cependant très souvent remis en question. Parmi eux revient souvent le régime alimentaire et en particulier le régime méditerranéen. Il est caractérisé par la consommation importante de fruits et légumes, de poissons, et d'huile d'olive riche en acide gras mono-insaturés, d'une consommation modérée en vin rouge, riche en polyphénols et d'une consommation faible de viande rouge. On explique souvent ces effets protecteurs à la présence d'antioxydants, acides gras tels que les omégas 3, les vitamines E et C ainsi que les carotènes.

De même, l'activité physique pourrait promouvoir la bonne santé cérébrale. On l'explique par une augmentation du débit sanguin cérébral activant des facteurs de croissance mais aussi en diminuant les maladies cérébrovasculaires. Enfin **une activité intellectuelle riche et diversifiée** comme la lecture, les jeux de réflexion et l'apprentissage mais également une vie sociale variée permettraient de **prévenir l'apparition de démence**.

L'un des défis actuel est de confirmer fonctionnellement et mécaniquement, par des études in vitro et in vivo, l'implication de ces facteurs de risque dans la pathologie. La création de nouveaux modèles animaux permettant l'étude et l'implication de ceux-ci dans la pathogénèse de la MA semble être une approche intéressante.

VI. Clinique de la Maladie d'Alzheimer

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la MA se manifeste cliniquement par des troubles mnésiques, moteurs et gestuels. Dans cette partie **nous discuterons du parcours typique** que suit un **patient suspecté** de développer la **MA** en évoquant les **outils diagnostics** et les **traitements actuels** utilisés par les cliniciens. Ces traitements étant initialement destinés à être curatifs, des stratégies thérapeutiques préventives et/ou curatives dans le but de contrecarrer le plus précocement possible les conséquences de cette maladie sont actuellement testées. Nous listerons donc les éventuels biomarqueurs « prédictifs » de la maladie et le résultat de quelques **essais cliniques** récents.

1. Diagnostic de la maladie d'Alzheimer

D'abord, il est bon de rappeler que ces outils conduisent à un diagnostic de probabilité et non de certitude. Ce dernier n'est en effet obtenu qu'après analyse post-mortem identifiant la présence des lésions anatomo-pathologiques caractéristiques de la maladie. Il faut également savoir que du fait qu'aucun traitement curatif est disponible aujourd'hui, la Haute Autorité de Santé (**HAS**) ne recommande pas le dépistage systématique de la MA ou maladies apparentées dans la population générale. Ceci a peut-être pour conséquence de sous-estimer le nombre réel de patients atteints de MA.

Malgré tout, si l'on s'en tient à la HAS, un diagnostic de la MA doit être proposé sous certaines conditions et en priorité en cas de troubles de la mémoire :

- Aux personnes se plaignant de ressentir un changement récent dans leur capacité cognitive ou leur état psychique
- Aux **personnes** chez lesquelles **l'entourage remarque l'apparition** ou l'aggravation de **troubles cognitifs** ou un changement psycho-comportemental non expliqué par une pathologie psychiatrique identifiée
- Aux patients venant consulter ou étant hospitalisés pour un symptôme pouvant accompagner, révéler ou provoquer un déclin cognitif : chutes, syndrome confusionnel, accident vasculaire cérébral, ...
- A l'entrée et en cours de séjour en structure d'hébergement.

Au stade auquel le patient consulte pour une **plainte mnésique**, le médecin doit effectuer un diagnostic différentiel des syndromes démentiels permettant d'identifier les 1,5% de cas curables et d'aider les patients développant une probable MA à gérer au mieux leur situation (activation des mesures d'aide sociale, médicale, financière).

i. Démarches diagnostiques suivant une plainte mnésique

Une évaluation initiale est réalisée le plus souvent par le médecin traitant puis un neuropsychologue, ou dans d'autre cas par un neurologue, un gériatre ou un psychiatre. La première étape doit pouvoir distinguer la « vraie » maladie de la mémoire de la « fausse ». D'après le Dr Epelbaum, neurologue à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière à Paris, la « vraie » maladie est souvent caractérisée par **l'anosognosie** ou « l'oubli des oublis ». Le patient ne se rend pas compte qu'il est en situation de difficulté et c'est d'ailleurs souvent l'entourage qui est à l'origine de la consultation. Cette évaluation initiale est ainsi divisée en plusieurs examens :

Un entretien avec le patient (et son entourage) permet d'identifier l'origine de la plainte mnésique, d'établir un historique pour connaître le début et envisagé une progression.

Un examen clinique doit ensuite établir (i) l'état général du patient, son état cardiovasculaire, son état de vigilance et (ii) l'état neurologique du patient. Le premier a pour but d'écarter des causes entraînant un biais pour le deuxième examen. Il reste normal jusqu'à très tard dans la MA et permet donc d'identifier d'autres pathologies à l'origine de la plainte mnésique.

Une évaluation fonctionnelle est ensuite réalisée grâce à « l'échelle simplifiée d'activités instrumentales de la vie courante » (IADL). Elle évalue le niveau de dépendance de la personne consultée. Concrètement, on interroge le patient sur 4 points : l'utilisation de son téléphone, l'utilisation des transports en communs, la prise de médicaments et la gestion des finances.

Une **évaluation cognitive globale** est enfin réalisée grâce au « mini mental state examination » ou MMSE. Ce test de 30 questions, se déroule pendant une quinzaine de minutes. Il évalue les capacités cognitives globales du patient incluant : l'orientation, l'apprentissage, l'attention, le calcul, le rappel, le langage, le développement de praxies constructives. Il doit prendre en compte l'âge, le niveau socio-culturel, l'activité professionnelle et sociale du patient ainsi que son état affectif (anxiété et dépression) et de vigilance lors de l'examen (**Figure 12**).

MINI MENTAL STATE EXAMINATION (M.M.S.E)		Etiquette du patient
Date :		
Évalué(e) par :		
Niveau socio-culturel		

ORIENTATION
 Je vais vous poser quelques questions pour apprécier comment fonctionne votre mémoire. Les unes sont très simples, les autres un peu moins. Vous devez répondre du mieux que vous pouvez.
 Quelle est la date complète d'aujourd'hui ?

☞ Si la réponse est incorrecte ou incomplète, posez les questions restées sans réponse, dans l'ordre suivant :

1. en quelle année sommes-nous ?	!0ou1!	4. Quel jour du mois ?	!0ou1!
2. en quelle saison ?	!___!	5. Quel jour de la semaine ?	!___!
3. en quel mois ?	!___!		

☞ Je vais vous poser maintenant quelques questions sur l'endroit où nous nous trouvons.

6. Quel est le nom de l'Hôpital où nous sommes ?	!___!
7. Dans quelle ville se trouve-t-il ?	!___!
8. Quel est le nom du département dans lequel est située cette ville ?	!___!
9. Dans quelle province ou région est situé ce département ?	!___!
10. A quel étage sommes-nous ici ?	!___!

APPRENTISSAGE
 ☞ Je vais vous dire 3 mots ; je voudrais que vous me les répétiez et que vous essayiez de les retenir car je vous les demanderai tout à l'heure.

11. Cigare	[citron	ou	[fauteuil	!___!
12. fleur	[clé	ou	[tulipe	!___!
13. porte	[ballon		[canard	!___!

Répéter les 3 mots.

Figure 12 : Extrait d'une fiche de suivi du test MMSE

A la suite de cette évaluation, le médecin doit être capable, non pas d'affirmer un diagnostic, mais une hypothèse diagnostique. En fonction de celle-ci (classiquement un score inférieur à 10 bonnes réponses), il recommande au patient de suivre un examen paraclinique.

L'examen paraclinique inclue (i) un **examen biologique** et (ii) une **imagerie cérébrale**. L'examen biologique est souvent demandé pour doser la thyroïdostimuline hypophysaire ou réaliser un hémogramme ou une natrémie. En fonction du contexte, certains dosages comme celui de la vitamine B12 ou des bilans hépatiques, une sérologie syphilitique sont également prescrits. En parallèle, l'imagerie cérébrale systématique est recommandée pour tous troubles cognitifs avérés de découverte récente. L'**IRM** ou Imagerie à Résonance Magnétique est ainsi effectuée, d'abord, pour exclure certaines causes expliquant les troubles cognitifs comme des séquelles d'AVC (accidents vasculaires cérébraux) par exemple. L'IRM en coupes coronales va permettre d'identifier l'**atrophie** cérébrale au niveau de l'hippocampe, du cortex entorhinal et perirhinal

souvent affectés dans le cadre de la MA. La présence de lésions vasculaires est également observable.

Si cette évaluation est en faveur d'un déclin cognitif, le médecin traitant doit l'annoncer au patient et à l'un de ses proches s'il le désire. **Ce diagnostic de probabilité est essentiel pour les patients** puisqu'il initie le développement d'une aide et d'un accompagnement adapté tant sur le plan médical, social et financier. Le médecin doit également référer le patient auprès d'un spécialiste pour une démarche diagnostique plus poussée, s'il le souhaite.

ii. Démarches diagnostiques suivant une suspicion de MA

Compte tenu des traitements actuels, **une démarche plus poussée n'est généralement pas entreprise** mis à part lorsque le diagnostic est hésitant, atypique ou dans le cas de patients jeunes. Dans ces cas contraires, le diagnostic repose sur une collaboration multidisciplinaire et différentes évaluations pourront être effectuées dans un centre mémoire.

Une évaluation clinique qui suit un entretien préalable est réalisée par un neuropsychologue spécialisé ayant analysé les rapports précédents. Ces tests cliniques peuvent durer jusqu'à deux heures et sont bien plus précis que les simples tests de mémoire tels que le MMSE. Il s'agit ici d'une investigation approfondie des phénomènes de mémoire d'une personne. Le spécialiste utilise généralement les critères diagnostiques de la MA du **DSM-5** ou du **NINCDS-ADRDA** (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke – Alzheimer's Disease and Related Disorders Association). Le diagnostic de la MA peut ainsi être classé de possible (caractéristiques cliniques atypiques et absence de diagnostic alternatif apparent ; pas de confirmation histologique), probable (syndrome clinique typique sans confirmation histologique) ou certain (diagnostic clinique suivi d'une confirmation histologique).

Une évaluation fonctionnelle approfondie peut être effectuée. Elle se fait à l'aide de l'échelle IADL non simplifiée, toujours pour évaluer les activités instrumentales de la vie quotidienne.

Une évaluation psychique et comportementale est réalisée, puisque au fil de la progression de la MA, 80 % des patients développent des atteintes neuropsychiatriques. Le comportement du patient peut être évalué pendant l'examen mais également dans sa vie quotidienne. Lors de cette évaluation, un questionnaire (NPI pour NeuroPsychiatric Inventory ou inventaire neuropsychiatrique) sera destiné aux proches permettant d'évaluer si le patient souffre d'idées délirantes, d'hallucinations, d'agitation, d'agressivité, de dépression, d'anxiété, d'exaltation de l'humeur/euphorie, d'apathie/indifférence, de désinhibition, d'irritabilité/instabilité de l'humeur, de comportement moteur aberrant, de troubles du sommeil, de troubles de l'appétit. Pour chaque

trouble, le questionnaire évalue le degré de gravité ou la fréquence de celui-ci ainsi que la répercussion sur l'entourage.

Un examen paraclinique peut être réalisé en parallèle et mesure la présence de biomarqueurs caractéristiques de la MA suivant deux méthodes : la présence de molécules présentes dans le LCR (Liquide Céphalo Rachidien) et la présence de plaques amyloïdes ou de déficits métaboliques par imagerie TEP (Tomographie à Emission de Positons).

Les biomarqueurs sont des paramètres physiologiques, biochimiques (protéines) ou anatomiques qui peuvent être mesurés de façon objective et révélant un processus biologique normal ou pathologique ou encore répondant à une intervention thérapeutique. Les dosages basés sur les biomarqueurs doivent donc idéalement être reproductibles, précis, peu coûteux et leur récupération ne doivent pas nécessiter de gestes invasifs. Malheureusement, les biomarqueurs actuels de la MA, au nombre de 5, ne répondent pas complètement à cette définition. Ainsi, il est possible de doser deux marqueurs clés de la MA dans le LCR : l'**A β** et la protéine **Tau**. En particulier, il est observé que la concentration en A β ₁₋₄₂ diminue dans le LCR de patients atteints de MA. Au contraire, une augmentation de Tau totale et de Tau hyperphosphorylée est observée. De plus, l'imagerie par TEP permet grâce à l'utilisation de radiotraceurs spécifiques de doser la présence de plaques amyloïdes dans le cerveau ou encore de mettre en évidence des déficits métaboliques chez les patients atteints de MA.

L'évaluation fonctionnelle, psychique et comportementale, associée à la mesure de biomarqueurs sont à la base de critères de diagnostic de la MA comme l'**IWG2** ou **NAI-AA**.

Le premier a été proposé par un groupe de travail regroupant des chercheurs-cliniciens (International Working Group) et revisité en 2014 ([Dubois, Feldman et al. 2007](#), [Dubois, Feldman et al. 2014](#)) (**Figure 13**). Il différencie **une phase préclinique** qui précède **une phase clinique** interférant dans le fonctionnement quotidien du patient et divisée en une phase prodromale puis une phase démentielle. Ainsi, les notions de « Maladie d'Alzheimer » et « **Pathologie Alzheimer** » sont à distinguer : la dernière reflétant à la fois l'aspect clinique de la maladie mais également les changements neurologiques qui la précèdent. La phase préclinique est à distinguer en deux : « présymptomatique » correspondant aux personnes avec une mutation dominante autosomale sur les gènes *PSEN1*, *PSEN2* ou *APP* et « asymptotique à risque » correspondant aux personnes sans mutations mais avec une preuve d'amyloïdose cérébrale. **L'élément clé du critère IWG2 est l'identification du « syndrome amnésique typique de l'hippocampe »** synonyme d'une mémoire épisodique atteinte. En plus, le critère prend en compte des « marqueurs pathophysiologiques » qui sont globalement statiques (au moins lors de la phase démentielle), incluant les **variations de l'A β** et de **Tau** dans le **LCR** et l'augmentation du signal

de plaques amyloïdes par TEP ainsi que des « marqueurs topographique » bien plus plastiques, incluant l'atrophie cérébrale par IRM et l'hypométabolisme par TEP (**Figure 13**).

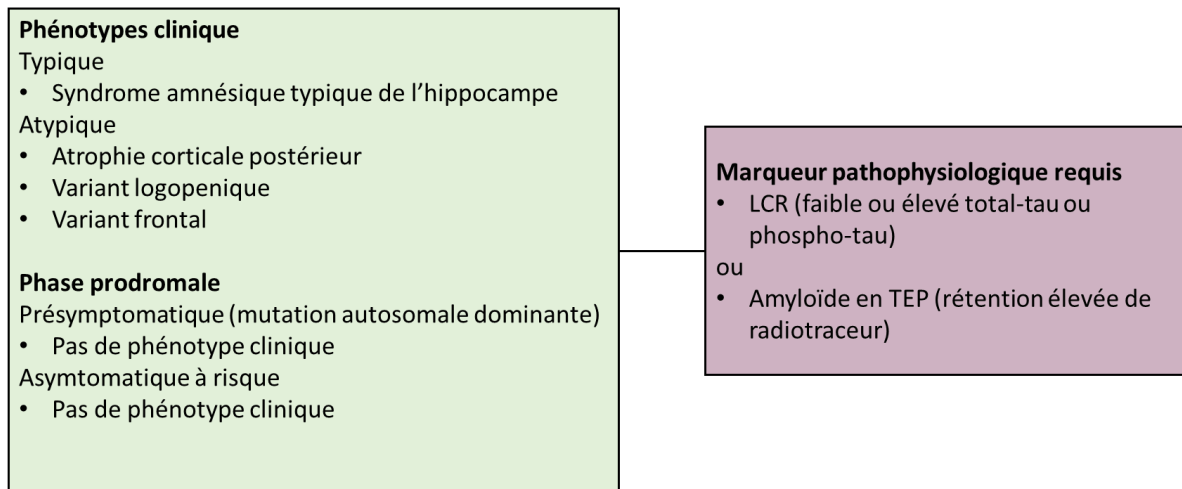


Figure 13 : Entité clinico-biologique de la MA utilisée par l'IWG2

Selon les critères de l'IWG2, la maladie d'Alzheimer est définie comme une entité clinico-biologique (Dubois, Feldman et al. 2014). Un algorithme simplifié propose que dans toutes les conditions et à tous les stades de la maladie, le diagnostic de la MA repose sur la présence de marqueurs pathophysiologiques.

Le second critère, NAI-AA (National Institute on Aging-Alzheimer's Association), propose en 2011 un diagnostic pour plusieurs stades de la maladie : phase préclinique (patients asymptomatiques), phase MCI (Mild Cognitive Impairment) et phase de démence. Par exemple, le diagnostic de patients asymptomatiques de stade 1 repose sur la présence de plaques amyloïdes par TEP sans augmentation de Tau total et phosphorylé dans le LCR, sans atrophie ni hypométabolisme cérébral et sans plainte mnésique. Les patients asymptomatiques de stade 3 présentent une accumulation de plaques amyloïdes par TEP avec soit augmentation de Tau total ou phosphorylé dans le LCR, soit avec atrophie ou hypométabolisme cérébral mais sans changement cognitif majeur (ou subtil).

Une étude approfondie des biomarqueurs cités ci-dessus ainsi que la corrélation avec les défauts cognitifs ont permis de mettre au point un modèle théorique de l'évolution de la MA (**Figure 14**).

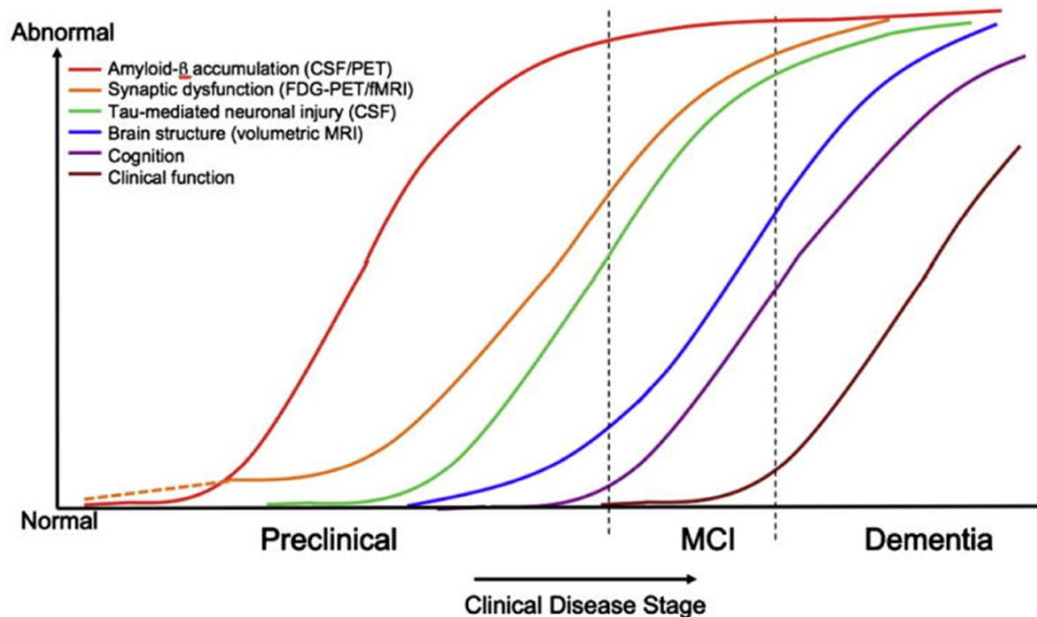


Figure 14 : Hypothèse de progression de la MA selon le NAI-AA

Modèle temporel hypothétique de la progression de la MA en fonction de l'anormalité du niveau de biomarqueurs ([Sperling, Aisen et al. 2011](#)). Les premiers éléments détectés sont liés à la pathologie amyloïde (diminution d' $A\beta_{1-42}$ dans le LCR et accumulation de plaques amyloïdes en TEP). Les perturbations métaboliques l'augmentation de Tau dans le LCR et la démence arrivent plus tardivement. MCI : Mild Cognitive Impairment.

Le prélèvement du LCR est réalisé par ponction lombaire : un acte médical engendrant un risque pour la santé du sujet non négligeable et une hospitalisation de plusieurs jours. En plus, le coût financier de ce dernier mais également de l'imagerie TEP et IRM sont aujourd'hui très importants. Tout récemment, deux études ont permis de montrer la **présence d'anomalies associées à l'amyloïde par simple prise de sang** ([Nabers, Perna et al. 2018](#), [Nakamura, Kaneko et al. 2018](#)). Dans la seconde, les ratios $APP_{total}/A\beta_{1-42}$ et $A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$, utilisés ici comme biomarqueurs, sont retrouvés corrélés à la charge en plaques amyloïdes et au niveau d' $A\beta_{1-42}$ dans le LCR. Pour faciliter le diagnostic, les auteurs envisagent ainsi de remplacer l'imagerie TEP ou le dosage de marqueurs du LCR par ce dosage réalisé après simple prise de sang. Le principal écueil que l'on peut relever ici serait que les différences observées entre le groupe contrôle et le groupe MA sont à l'échelle d'une population et non individuelle. Ainsi, plus de la moitié des personnes « contrôles » possèdent des valeurs comparables aux « MA », ce qui entraînerait en clinique **une part importante de « faux-positifs »**.

Pour finir, le diagnostic poussé comme décrit précédemment reste limité à certains cas : MA atypique, MA observée chez des patients jeunes. Il peut cependant être effectué lorsque le patient

souhaite rentrer dans **un essai clinique**. Dans ce cas, l'utilisation des biomarqueurs permet d'identifier du mieux possible le stade de la maladie dans lequel se trouve le patient (participant).

2. Traitements actuels

Aucun traitement curatif de la MA est actuellement disponible. Quatre molécules sont actuellement sur le marché. Trois d'entre elles sont identifiées comme des anti-cholinestérases et permettent de prévenir une baisse de l'acétylcholine : l'Aricept® ou donepezil (Eisai), le Reminyl® ou galantamine (Janssen Cilag) et l'Exelon® ou rivastigmine (Novartis Pharma). Le quatrième est un antagoniste des récepteurs NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique) du glutamate : l'Ebixa® ou mémantine (Lundbeck). Ces molécules ont été initialement développées comme traitement à visée symptomatique. Selon la Haute Autorité de Santé, une réévaluation datant de Septembre 2016 par la Commission de la Transparence révèle que ces traitements ne modifient pas l'évolution de la maladie. En plus, des effets indésirables potentiellement graves sont reportés. Par conséquent, et compte tenu que la prise en charge des personnes touchées doit être globale, cette commission a conclu à un service médical trop insuffisant pour justifier leur remboursement. **Ceci a tout récemment conduit à ce que la ministre de la santé, Agnès Buzyn, annonce la fin du remboursement des quatre médicaments disponibles à compter du 1^{er} Aout 2018 ([Godeluck 2018](#)).**

3. Essais cliniques conduisant à l'approbation de composés pharmacologiques

Globalement, nous pouvons classer les stratégies thérapeutiques entreprises dans le traitement de la MA en trois catégories : les stratégies « modifiant la maladie », les traitements pour les symptômes neuropsychiatriques et les traitements symptomatiques globaux ([Ballard, Gauthier et al. 2011](#)). La première catégorie inclue des produits naturels comme la vitamine E, le ginkgo biloba et l'acide gras omega-3, des modulateurs de cuivre et de zinc, des inhibiteurs de la γ - et β -sécrétase, des inhibiteurs de l'agrégation d'A β et de Tau, et des immunothérapies. La seconde catégorie inclue des anticonvulsants, des antidépresseurs et des antipsychotiques atypiques comme la risperidone. La troisième et dernière catégorie comprend des molécules, ayant dans le passé, reçues l'approbation d'autorités responsables pour le traitement de la MA. Ces essais cliniques furent développés à partir des hypothèses de travail voulant que la mémoire soit liée au système cholinergique. En 1976, la MA fût associée à une perte sévère de neurones cholinergiques du noyau basal de Meynert. Entre 1980 et 1990, plusieurs drogues ont ainsi été développées pour contrer l'effet de cette baisse d'Acétylcholine (ACh). Elles modulent les récepteurs nicotiniques et muscariniques soit par activation directe, soit par inhibition de

l'acétylcholinestérase (enzyme de recapture de l'ACh). Ces essais ont permis la mise sur le marché des 3 composés précédemment cités. Le quatrième composé : **la mémantine** est plus récent. Sa mise sur le marché a été approuvée en 2002 pour l'Europe et 2003 pour les Etats-Unis. Elle a été testée pour son affinité faible à modérée d'antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA au glutamate. A l'heure actuelle, aucune autre molécule a reçu d'approbation de mise sur le marché pour le traitement de la MA.

4. Essais cliniques actuels

Un nombre relativement important d'essais cliniques sur la MA est recensé. Selon, le site (clinicaltrials.gov), 1109 essais ont été initiés entre le 1^{er} Janvier 2010 et le printemps 2018 (sur un total de 1834). Ce chiffre est cependant à relativiser par rapport à d'autres pathologies comme le VIH, le cancer du sein ou même le syndrome dépressif comptant respectivement 5453, 4576 et 3201 essais clinique dans le monde depuis 2010. La complexité de la MA, un taux d'échec incomparable avec d'autres maladies refroidissent très certainement un investissement plus important de la part des grandes sociétés pharmaceutiques. Aujourd'hui, 620 essais cliniques sur la MA sont en cours, dont plus des deux tiers sont localisés aux Etats Unis et en Europe (**Figure 15**).

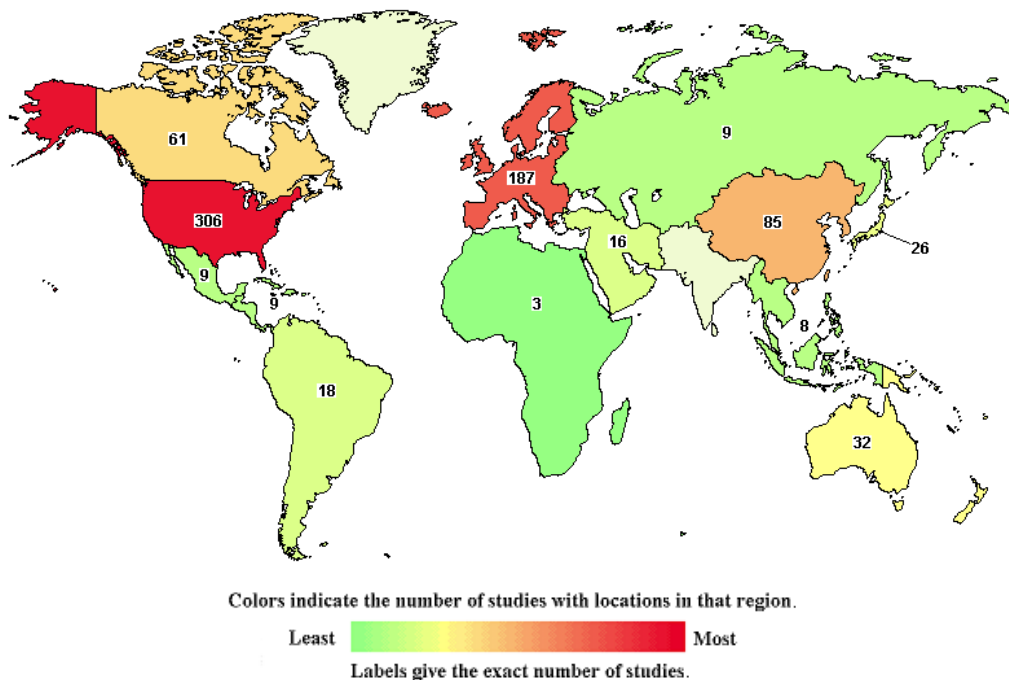


Figure 15 : Essais cliniques sur la MA en cours dans le monde

(<https://clinicaltrials.gov>)

Le marché des traitements pharmaceutiques pour la MA est actuellement estimé à 6,5 milliards de dollars ou 5% du marché des pathologies du système nerveux (bien en dessous des 20 % pour les désordres et symptômes dépressifs par exemple). Ce marché devrait cependant progresser de plus de 200% d'ici à 2023 et l'introduction potentielle de nouvelles thérapies ([Qian, Hamad et al. 2015](#)). Par conséquent, il représente un enjeu économique majeur pour les grandes sociétés pharmaceutiques.

Sans lister, ni développer l'ensemble des essais cliniques actuels, je présenterai dans cette partie quelques molécules regroupées en fonction de leurs cibles thérapeutiques illustrant les pistes thérapeutiques actuelles et leurs premiers résultats.

i. Molécules ciblant l'amyloïde

Depuis le début des années 2000 et les drogues ciblant l'acétylcholine, **la composante amyloïde** est devenue la cible de choix pour de nombreuses sociétés pharmaceutiques. En particulier, l'immunothérapie active puis passive contre l'amyloïde s'est largement développée. La première basée sur l'injection de vaccins est peu convaincante. Par exemple, le CAD106 de Novartis ou l'ACC001 de Pfizer montrent malheureusement des effets secondaires majeurs incluant des méningo-encéphalites chez certains patients. L'immunothérapie passive, basée sur l'injection chronique d'anticorps anti-A β , semble plus prometteuse.

Ainsi, la compagnie Roche développe la **Gantenerumab** un anticorps humanisé IgG1 ciblant un épitope conformationnel du peptide A β sous sa forme **fibrillaire** (non soluble). En conséquence, il prévient très bien l'apparition de nouvelles plaques et réduit la taille des plaques amyloïdes par le recrutement de microglie chez la souris modèle de la MA. Malheureusement, son effet chez l'homme est décevant. La compagnie stoppe l'essai « SCarlet RoAD » dans sa phase 2/3 incluant 799 participants diagnostiqués pour la première fois dans un essai clinique en utilisant les critères IWG2 (MMSE < à 24 ; positif pour t-Tau et p-Tau dans le LCR (CDR = 0,5) ; positif pour l'amyloïde en TEP). (www.alzforum.org/therapeutics/gantenerumab). D'autres compagnies utilisent une stratégie similaire. La compagnie Eli Lilly & CO., par exemple, développe un anticorps monoclonal IgG1 contre un épitope situé sur un domaine médian du peptide A β : le **Solanezumab**. Cet anticorps reconnaît les **formes solubles monomériques** (non fibrillaires et non oligomériques). Cette stratégie prometteuse a conduit la compagnie à tester ce composé en étude de phase 2 où des résultats mitigés montrent un bénéfice peu marqué, généralement plus faible que les composés inhibiteurs d'acétylcholinestérase, chez des patients avec une MA légère à modérée. Malgré ces résultats, le **Solanezumab** a été testé dans une étude de phase 3 appelée « ExpeditionPRO » mais la compagnie a annoncé fin 2016 l'échec de celui-ci dans le traitement

de patients atteints de MA à un stade prodromal (www.alzforum.org/therapeutics/solanezumab). Enfin, l'**Aducanumab** est un anticorps monoclonal humain IgG1 à haute affinité dirigé contre un épitope de l'A β . Originellement développé par une biotech suisse : Neurimmune, il est dérivé d'un donneur sain âgé cognitivement normal. L'idée était que le système immunitaire de ce donneur avait répondu avec succès à la MA et développé certains anticorps potentiellement efficaces pour la population atteinte de MA. Cette idée originale de « médecine translationnelle inverse » a ainsi permis de développer l'anticorps BIIB037 ciblant **les formes agrégées oligomériques d'A β** (sans effet sur les formes monomériques et fibrillaires). Aujourd'hui développé par Biogen, un essai appelé PRIME a été initié lors de l'été 2012 réunissant 166 personnes (seulement) avec une MA à un stade prodromal selon les critères IWG2 (MMSE>20, TEP amyloïde positif, allèle APOE ϵ 4 pour les 2/3 des participants). Des effets très encourageants ont été reportés dans divers congrès notamment lors de l'AD/PD 2015 de Nice où Biogen montre une baisse de plaques amyloïdes et un effet positif sur le plan cognitif observé par MMSE. Malgré l'annonce d'effets cognitifs bien moins marqués dans d'autres tests, certains analystes n'ont pas hésité à estimer l'Aducanumab à une valeur potentielle de 90 milliards de dollars. Au CTAD (Clinical Trials Alzheimer's Disease) de Boston en novembre 2017, la continuité de l'étude PRIME a permis de montrer que chez les personnes ayant reçues la dose la plus élevée (10 mg/kg) le niveau de plaque amyloïde restait à un niveau plus faible que le seuil exigé et détectable entre 80 et 166 semaines de traitement. En 2015, Biogen annonce le lancement d'une étude de phase 3 : « 221AD301 ENGAGE » enrôlant 1350 personnes au stade MCI et MA léger et un second essai : « 221AD301 EMERGE » identique au précédent dont les résultats devraient être connus pour 2022. L'Aducanumab est actuellement considéré, par les scientifiques, médecins et investisseurs comme l'anticorps anti-A β le plus prometteur (www.alzforum.org/therapeutics/aducanumab).

En plus de l'immunothérapie passive, la composante amyloïde est ciblée par l'utilisation de petites molécules dont des **inhibiteurs de BACE1 et BACE2**, β -sécrétases participant au métabolisme de l'A β . Des études de phase 1 puis de phase 1/2 incluant respectivement 68 puis 88 participants sains, avec une MA à un stade léger / modéré ou souffrants d'insuffisance rénale ont reporté que le **Verubecestat** ou **MK-8931** développé par Merck ne montre aucun effet secondaire et réduit la concentration en A β dans le LCR de personnes avec une MA. Une étude de phase 3 débute en Octobre 2016 avec des premiers résultats prévus pour l'été 2017. Malheureusement, Merck annonce le 14 février 2017 un arrêt prématuré de l'étude. D'autres études de phase 1 ont été initiées par la suite pour évaluer une nouvelle fois la toxicité hépatique du Verubecestat. Il est donc probable que l'effet dose et les effets secondaires que développent ce composé soit des éléments incompatibles avec la clinique humaine. Ces résultats rappellent

ceux d'autres inhibiteurs de BACE1 comme l'Avagacestat (Bristol-Myers Squib) ou encore SCH1682496 et LY2811376 produisant des effets secondaires majeurs chez la souris.

ii. Molécules ciblant la protéine Tau

En plus de s'intéresser à la composante amyloïde, les sociétés pharmaceutiques se sont lancées sur la composante Tau. Suivant le principe de l'immunothérapie passive, deux composés sont actuellement en cours d'essai : l'**ACI-35** et l'**AADvac-1** licenciés par Jansen et Axon Neuroscience SE respectivement. Ces vaccins ciblent certains états conformationnels de Tau hyperphosphorylés ou tronqués respectivement. Le premier montre une diminution de Tau soluble et insoluble « pathologique » associés à des effets bénéfiques sur le poids, le comportement moteur et la durée de vie de souris transgéniques Tau mutées. Il est testé actuellement en phase 1b sur des patients MA modérée depuis mai 2015. Le second vaccin : l'**AADvac-1** est bien toléré par différentes espèces animales et réduit la pathologie Tau tout en améliorant la fonction sensorimotrice de rats transgéniques Tau ([Kontsekova, Zilka et al. 2014](#)). Dans une étude de phase 1, il est annoncé lors de l'AAIC 2015 que le traitement est bien toléré. En mars 2016, une étude de phase 2 sur 24 mois incluant 185 participants avec une MA légère à modérée consiste à administrer 8 injections subcutanées de 40 microgrammes de vaccin et observer : (i) la tolérance et (ii) le statut cognitif, le métabolisme cérébral par TEP, l'atrophie cérébrale par IRM et les protéines Tau dans le LCR. Les résultats sont attendus pour février 2019. Ainsi, il semble que l'immunothérapie active ciblant Tau est bien tolérée contrairement à celle ciblant l'amyloïde.

L'immunothérapie passive est utilisée également : cinq molécules sont actuellement en phase 1, 1B ou 2. Par exemple, l'anticorps monoclonal **BIIB092** humanisé IgG4 licencié par Biogen, Bristol-Myers Squibb, est particulièrement intéressant puisqu'il a été développé contre les formes extracellulaires tronquées de Tau (eTau). La stratégie étant de limiter la diffusion de ces formes pathologiques dans tout le cerveau. Dans une étude de phase 1 : « BMS-986168 » incluant 48 participants avec une tauopathie (aplasié supranuléaire progressive), l'anticorps est infusé une fois par mois sur 12 mois à 2,1 mg. Comme présenté lors du CTAD de 2017, la tolérance est bonne et surtout eTAU est réduit de plus de 90 % dans le LCR après 39 jours de traitement ou après 85 jours.

En février 2018, Biogen débute un essai de phase 2 avec pour objectif de recruter 528 participants avec une MCI ou une MA modérée et évaluer la tolérance de 3 doses différentes ainsi que le statut cognitif des patients. Les résultats ne sont pas prévus avant 2020 (www.alzforum.org/therapeutics/biib092).

Les stratégies visant à inhiber la phosphorylation ou l'agrégation de Tau sont également développées. En particulier, le composé TRx 0237 (**LMTX™**) est un **inhibiteur de l'agrégation de Tau** de seconde génération licencié par TauRx Therapeutics Ltd. Le gros avantage de cette drogue, dérivée du bleu de méthylène, est qu'elle est d'ores et déjà approuvée par la FDA et couramment utilisé dans le traitement de la malaria. Trois études de phase 3 ont été conduites. L'une d'entre elle débute en 2013 et inclus 891 participants avec une MA légère à modérée (MMSE > 14). Des résultats négatifs ont été présentés à l'AAIC de Toronto de 2016. Les deux autres essais ont débuté en 2012 et 2013 mais n'ont pas été poursuivis.

Enfin, une molécule distribuée oralement de la classe des thiazolidinone nommée **Tideglusib** licencié par Zeltia Group à l'originalité d'inhiber la GSK3 β , l'une des protéines phosphorylant les protéines Tau. Son effet préclinique est intéressant puisqu'elle réduit de larges conséquences pathologiques incluant : la phosphorylation de Tau, l'agrégation amyloïde, la perte neuronale, la gliose, le déficit de la mémoire spatiale chez des souris double transgéniques (APP et TAU) ([Sereno, Coma et al. 2009](#)). Des effets neuroprotecteurs, anti-inflammatoires et activant la neurogenèse ont été reportés chez le rat adulte ([Morales-Garcia, Luna-Medina et al. 2012](#)). Une étude de phase 2a incluant 30 participants atteints de MA légère à modérée a évalué sur 5 mois la tolérance et les effets sur l'humeur et la cognition de 400 à 1000 mg de Tideglusib par jour. Une bonne tolérance est décrite et une tendance à un effet bénéfique sur la cognition est reporté suivant les tests MMSE et ADAS-Cog ([del Ser, Steinwachs et al. 2013](#)). Une étude 2B « ARGO » regroupant plus de participants (308) a débuté en avril 2011 mais a été stoppée en juillet 2012 faute d'effet bénéfique sur la cognition (test ADAS-Cog) (www.alzforum.org/therapeutics/tideglusib). En plus, l'essai TAURO conduit sur des patients atteints d'aplasie supranucléaire progressive s'est révélé globalement négatif.

iii. Autres cibles

Pour finir, je citerai une thérapie développée par Avanir Pharmaceuticas : le **Nuedexta** (ou Zenvia). Il s'agit d'un traitement combinatoire composé de dextrométhorphan et de quinidine. Le premier est un antagoniste des récepteurs NMDA à l'image de la mémantine mais aussi des récepteurs sigma 1 (participant comme protéines d'échafaudage sur la membrane du réticulum endoplasmique). Le second est déjà prescrit pour l'irrégularité cardiaque et va permettre de favoriser la disponibilité du premier dans le cerveau (favorisant le passage de la barrière hémato-encéphalique). La stratégie est similaire à celle de la mémantine : réduire l'excitotoxicité médiée par le glutamate. Une étude de phase 2 dont les résultats ont été présentés en octobre 2014, révèle des effets bénéfiques qui font sens mais uniquement sur l'agitation et l'agressivité

excessive de patients atteints de MA après 5 semaines de traitements. Des effets secondaires sont également observés.

Une personne de plus de 70 ans développant aujourd'hui des problèmes de mémoire perturbant sa vie quotidienne se voit prescrire par son médecin généraliste une série d'examens incluant un test de mémoire d'une quinzaine de minutes (le test MMSE) associé à un examen d'imagerie cérébrale. Les personnes dont l'examen de mémoire montre un score faible et une atrophie de la région hippocampique sont diagnostiquées comme probablement atteint de MA. Une démarche d'aide sociale est alors lancée, mais dans la plupart des cas, aucun traitement médicamenteux n'est prescrit.

Pour contrer cette maladie d'impact socio-économique majeur, 30 ans d'investissements de la part de l'industrie R&D n'ont jusqu'alors pas été suffisant puisque près de 100% des composés évalués lors d'essais cliniques se sont révélés être des échecs.

Plusieurs raisons sont évoquées pour expliquer cela : (i) une mauvaise compréhension du long et complet décours de la pathologie Alzheimer (ii) une stratégie de traitement établie trop tardivement (iii) des critères de diagnostic n'utilisant que des signes trop tardifs de la pathologie et (iv) l'utilisation en étude de phase préclinique de modèles animaux trop éloignés de la pathologie humaine.

Tout récemment, les résultats de plusieurs essais cliniques soulignent l'intérêt d'approches ciblant l'amyloïde ou la protéine Tau sous leurs formes oligomériques solubles. Dans un futur, ce type de thérapie devra être capable d'être utilisée en combinatoire selon le stade de progression de la maladie. A titre d'exemple, je citerai Paul Aisen (University of Southern California) qui imagine un « plan de jeu » pour le futur : "Pour une prévention primaire, nous utiliserons les inhibiteurs de

BACE. Pour une prévention secondaire, nous ajouterons à ces premiers, un anticorps ciblant l'A β . Pour le stade prodromal, nous aurons besoin d'une troisième drogue ciblant probablement Tau. » La question de comment prendre en charge les patients au stade clinique de la MA : le doute persiste encore. Plusieurs questions éthiques méritent ici d'être posées : un médecin devra-t-il prendre la responsabilité de traiter, d'un point de vue préventif, certainement à très long terme, une personne sans plainte mnésique ? Comment pourra-il identifier précisément le stade de la pathologie dans lequel son patient se trouve ? Dans ce contexte, le développement d'outils technologiques permettant d'identifier des biomarqueurs prédictifs et des thérapies répondant à un régime préventif semble être de nature prioritaire.

CHAPITRE II : Progression et modélisation de la pathologie Alzheimer

Dans le Chapitre I de cette introduction, je me suis consacré à décrire la MA telle qu'elle est historiquement définie : une maladie neurodégénérative progressive conduisant au syndrome de démence. Deux lésions histologiques : les plaques séniles et les DNFs sont issues respectivement de deux métabolismes biochimiques distincts : la **composante amyloïde** et la **composante Tau**. Elles caractérisent la MA et permettent un diagnostic de certitude seulement après examen post-mortem. Depuis, les nouveaux critères de diagnostic de la MA proposés par l'IWG en 2007 et reformulés en 2014 par l'IWG2, expriment un nouveau concept permettant, non plus d'évoquer une **maladie d'Alzheimer** mais une **pathologie Alzheimer**. Il est alors à distinguer **une phase préclinique**, où des évènements pathologiques s'accumulent progressivement dans le cerveau sans altérer les fonctions cognitives, et **une phase clinique**, plus traditionnelle où la démence représente le stade finale de la pathologie.

Dans un souci d'identification des stades précoces, plus facilement traitables, je développerai dans ce chapitre comment chacune des deux lésions histologiques se développent et quelle sont leurs conséquences fonctionnelles. **Le lien entre la pathologie amyloïde et la pathologie Tau** sera évoqué permettant de répondre à la question majeure de quelles composante est la cause de l'autre. Les données permettant de répondre à celles-ci y seront résumées. Elles proviennent majoritairement d'une série d'études supportant **l'hypothèse de la cascade amyloïde**. Cette hypothèse décrite pour la première fois par John Hardy est extrêmement influente dans la recherche sur la MA. Majoritairement reconnue mais également très débattue encore à l'heure actuelle, elle est la base du développement de nombreuses stratégies thérapeutiques et de modèles animaux utilisés dans l'évaluation de candidats-médicaments. Dans une seconde partie de ce chapitre, j'exposerai justement ces différents modèles animaux utilisés dans les études « pré-cliniques ». Nous aborderons leurs avantages et leurs limites, en mettant en exergue l'actuel verrou technologique qui empêche l'évaluation pertinente de traitements ciblant les phases précoces de la MA.

VII. Progression de la pathologie Alzheimer

1. L'hypothèse historique de la cascade amyloïde (1990-2010)

Alors que de nombreux processus cellulaires anormaux apparaissaient dans le cerveau de personnes diagnostiquées atteintes de la MA, leurs initiations devaient aux yeux de nombreux spécialistes de l'époque être causées par plusieurs éléments différents. Par conséquence, toutes

les hypothèses expliquant l'apparition de la MA reposaient sur une idée de multiple lésions primaires comme mode possible de genèse de la maladie.

John Hardy et David Allsop proposent en 1991 **l'hypothèse de la cascade amyloïde** ([Hardy and Allsop 1991](#)). Ce concept repose sur des observations publiées quelques années plus tôt ([Glenner and Wong 1984](#), [Masters and Beyreuther 1987](#), [Selkoe 1991](#)) et sur des données génétiques obtenues chez des patients atteints de la MA familiale et des patients porteurs de trisomie 21, montrant que :

- Les mutations du gène *APP* aux abords de la séquence codant pour le peptide A β causent les formes de MA familiales précoces les plus agressives.
- Les patients avec trisomie 21 arborant une copie surnuméraire du gène *APP*, développent invariablement une neuropathologie typique de la MA. L'observation *post mortem* de cerveau de ces patients montre une concentration importante de plaques amyloïdes sans DNFs à l'âge de 10 ans. Ces dernières apparaissent graduellement bien plus tard chez des sujets plus âgés.
- Les mutations des gènes préséniline 1 ou 2 sont la cause la plus commune de MA de type familiale.
- L'existence d'une mutation sur l'*APP* diminuant l'apparition de dépôts amyloïdes est considéré comme un facteur protecteur de la MA.
- Les patients possédant des mutations sur la protéine Tau développent des DNFs et pertes neuronales sans plaques amyloïdes suggérant que la pathologie Tau est une conséquence de la composante amyloïde.

Ainsi, au contraire des hypothèses de l'époque, Hardy suggère qu'un seul et unique événement initie la genèse de la maladie : « Our hypothesis is that deposition of amyloid- β protein (A β P), the main component of the plaques, is the causative agent of Alzheimer's pathology and that the neurofibrillary tangles, cell loss, vascular damage, and dementia follow as a direct result of this deposition » ([Hardy and Higgins 1992](#)). Pour lui, **le dépôt de peptide A β** : composant majeur de l'un des signes histologiques de la MA, à savoir les plaques séniles, est la cause de la MA et que les autres lésions cérébrales en sont le résultat direct. Le développement de la maladie pourrait être résumé par une série d'effets en cascade :

Dépôt d'amyloïde- β --> phosphorylation de Tau et formation de DNFs --> mort neuronale
--

Cette hypothèse va rapidement devenir une philosophie dominante, orientant par la suite la recherche sur cette maladie. Elle souligne l'importance majeure du dépôt d'amyloïde en plaques

séniles dans le développement de la MA. La suite de cette partie rendra compte des études qui ont amené John Hardy et d'autres à reformuler peu à peu cette hypothèse.

2. La composante amyloïde

i. Le métabolisme de l'APP

Les dépôts amyloïdes sont majoritairement constitués de peptides A β produits par endoprotéolyse de la protéine APP (Amyloid Precursor Protein). L'APP, dans sa forme entière, est une protéine transmembranaire plutôt mal connue. On la soupçonne d'avoir un rôle dans l'adhésion et le mouvement cellulaire lorsqu'elle est située sur la membrane cellulaire. Mais elle est également localisée à l'intérieur de la cellule et en particulier sur le réseau trans-Golgi, le réticulum endoplasmique et les membranes endosomales, lysosomales et mitochondriales. Dans tous les cas, cette protéine est sensible à une série de clivages séquentiels réalisés par un groupe d'enzymes ou complexes enzymatiques dénommés α -, β -, ou γ -sécrétases. Trois membres de la famille protéique ADAM ont été identifiés comme des protéines à **activité α -sécrétase** : ADAM-9, ADAM-10 et ADAM-17. La protéine BACE-1 pour β -site APP-cleaving enzyme 1 est une protéine membranaire intégrale de type I, membre de la famille des pepsines à activité à aspartyl protéase. Elle a été identifiée comme une enzyme à **activité β -sécrétase**. Enfin, la γ -sécrétase a été identifiée comme un complexe d'enzymes regroupant la préséniline 1 ou 2 associée à la nicastrine, l'APH1 (Anterior Pharynx Defective) et la PEN2 (Presenilin enhancer 2). Le métabolisme de l'APP est usuellement divisé en deux voies : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique (**Figure 16**).

La voie non-amyloïdogénique est une voie de clivage préférentielle et est observée dans des conditions physiologiques. Ici, l'APP est clivée par l' α -sécrétase à une distance de 83 acides aminés de l'extrémité C-terminal de l'APP produisant un long ectodomaine N-terminal appelé **sAPP α** et sécrété dans le milieu extracellulaire. Ce fragment est connu pour son effet neurotrophique *in vitro* et *in vivo* ([Fol, Braudeau et al. 2015](#)). Le fragment C-ter résultant est retenu à la membrane et clivé par la γ -sécrétase produisant un fragment court appelé p3. Il est à noter que le clivage de l' α -sécrétase est situé dans la région de l'A β , empêchant donc sa formation.

La voie amyloïdogénique est une voie de clivage clairement alternative et conduit à la production du peptide toxique A β . La protéolyse initiale est, contrairement à la voie non-amyloïdogénique, assurée par la β -sécrétase et située à 99 acides aminés de distance de l'extrémité C-terminale de l'APP. Cette première coupure produit le sAPP β libéré dans l'espace extracellulaire laissant un fragment de 99 acides aminés (appelé C99) dans la membrane. Le clivage secondaire de ce fragment est réalisé par la γ -sécrétase sur deux sites différents

possibles. Le plus long peptide produit est le peptide $A\beta_{1-40}$. L'autre, diminué en longueur de 10 % est le peptide $A\beta_{1-42}$. Le variant $A\beta_{1-42}$ est plus hydrophobe que le premier et plus facilement sujet à la formation de fibrilles. Cette forme est d'ailleurs retrouvée prédominante dans les plaques amyloïdes. Le peptide $A\beta_{1-40}$ pourrait même inhiber l'agrégation d' $A\beta_{1-42}$ (**Figure 16**).

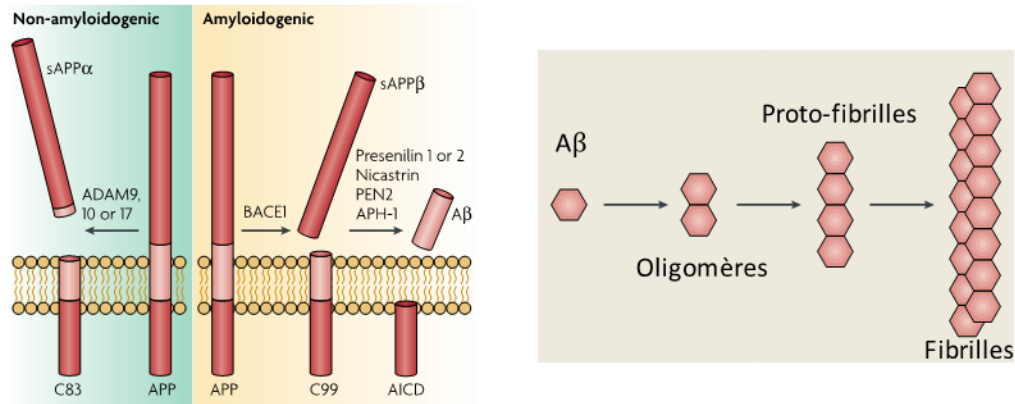


Figure 16 : Illustration de la production de peptides amyloïdes

Métabolisme de l'APP et oligomérisation de l' $A\beta$ (LaFerla, Green et al. 2007).

Les peptides $A\beta$ s'associent facilement et existent sous plusieurs états : monomères, dimères, **oligomères**, proto-fibrilles, fibrilles. Les fibrilles sont des complexes formés par un processus dépendant de nucléation. Mal compris, les mécanismes responsables de ce processus dans le tissu cérébral vieillissant seraient assimilés aux mécanismes rencontrés dans le « misfolding protein » ou mal-repliement protéique. Dans sa forme monomérique, l' $A\beta$ n'apparaît pas comme neurotoxique. Au contraire, les formes oligomériques et protofibrilles sont considérées comme de puissants neurotoxiques. Enfin, les fibrilles dans leurs états insolubles s'accumulent alors à l'extérieur de la cellule en formant les plaques séniles (**Figure 16**).

ii. Le peptide $A\beta$ soluble intracellulaire (LaFerla, Green et al. 2007)

L'une des principales critiques de l'hypothèse de John Hardy proposée en 1991 provenait de l'existence d'études cliniques soulignant que la charge en dépôts amyloïdes insolubles et leurs déploiements spatio-temporels ne corrélait que très peu avec les déficits cognitifs. Certains faits vont effectivement dans ce sens : (i) l'imagerie TEP via l'utilisation de ligands de type PiB montrent la présence significative de dépôts amyloïdes chez de nombreux individus âgés cognitivement sains (Villemagne, Burnham et al. 2013) ; (ii) une certaine population japonaise (mutation E693Δ sur l'APP) présente une démence de type Alzheimer associée à une charge en plaques amyloïdes similaire à celle retrouvée chez des patients contrôles. L'augmentation d'oligomères $A\beta$ explique alors leurs symptômes (Tomiyama, Matsuyama et al. 2010) (**Figure 17**) et (iii) chez l'Homme, la

suppression de plaques amyloïdes par l'intermédiaire d'anticorps anti-amyloïde n'est pas associée à une amélioration des capacités cognitives selon des essais cliniques ([Holmes, Boche et al. 2008](#), [Doody, Raman et al. 2013](#), [Salloway, Sperling et al. 2014](#)). Au contraire, plusieurs études indiquent que la charge amyloïde soluble corrèle bien mieux avec la sévérité de la maladie ([Lue, Kuo et al. 1999](#), [McLean, Cherny et al. 1999](#)). Collectivement, ces données suggèrent donc que **l'inducteur clé et initial de la MA serait l'A β dans sa forme soluble** et non l'A β dans son état agrégé formant des plaques amyloïdes extracellulaires.

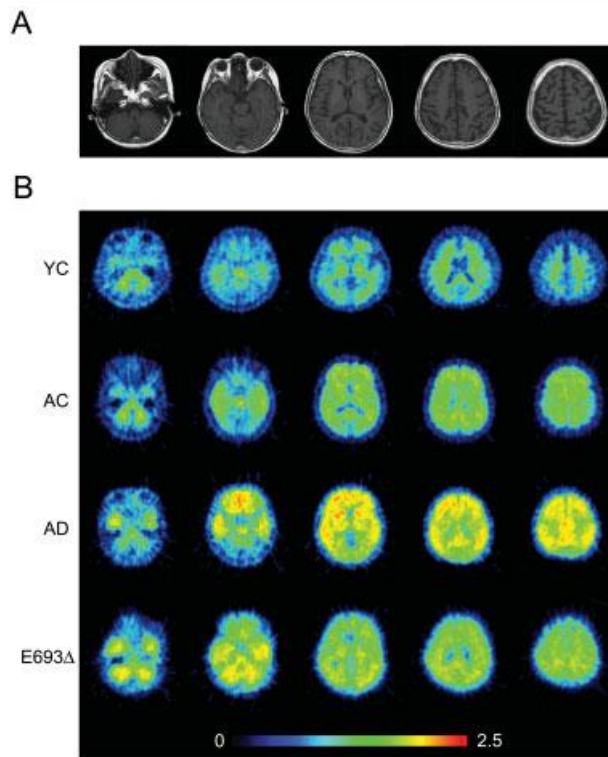


Figure 17 : Visualisation in vivo de la charge amyloïde dans le cerveau de patients porteurs de la mutation E693 Δ

La présence de plaques amyloïdes n'est pas observée chez certains patients MA (forme familiale) souffrant de démence ([Tomiyama, Matsuyama et al. 2010](#)). (A) Imagerie IRM. (B) Imagerie PET utilisant le radiotracteur PIB illustrant une charge en plaques amyloïdes similaire entre des patients cognitivement sains (femme de 81 ans)(AC) et des patients atteints de démence de type Alzheimer exprimant la mutation E693 Δ (délétion du glutamate 22 de l'A β) sur l'APP conduisant à la formation d'oligomère A β (femme de 62 ans)(E693 Δ). Au contraire, la charge en plaque amyloïdes observée chez les patients MA est bien plus élevée (femme de 71 ans)(AD).

Dans la moitié des années 1980, l'A β a d'abord été identifié comme composant principal des plaques amyloïdes présentes dans le milieu extracellulaire. Peu de temps après, un rapport décrit la présence de ces mêmes peptides à l'intérieur de la cellule chez des patients jeunes ou

âgés, avec ou sans neuropathologie de type MA. Les observations obtenues soulignent curieusement une prévalence accrue des peptides A β à l'intérieur de neurones avec une DNF suggérant ainsi un possible lien entre les deux pathologies ([Iqbal, Grundke-Iqbal et al. 1986](#)). L'acceptation de ce concept a été lente et controversée principalement pour des raisons techniques. L'utilisation conjointe de souris invalidant le gène *APP* et d'anticorps ciblant des « neo-epitopes » ont par la suite permis d'écartier toutes interrogations. Des études récentes ont ensuite suggéré que l'accumulation d'A β intracellulaire pourrait constituer un évènement précoce dans la progression de la MA. Chez des patients « MCI », les peptides A β intracellulaires sont préférentiellement observés dans les neurones de régions clés de la MA comme l'hippocampe et le cortex entorhinal ([Gouras, Tsai et al. 2000](#)). Dans la trisomie 21, l'accumulation intracellulaire est observée avant l'apparition de dépôts extracellulaires ([Gyure, Durham et al. 2001](#)). Plusieurs études, dont celle de Gouras précisent que l'A β_{1-42} est bien plus représenté que l'A β_{1-40} dans le compartiment intracellulaire.

L'APP et ses protéases sont majoritairement localisées sur la membrane plasmique de la cellule expliquant pourquoi la majorité de l'A β est sécrété vers l'extérieur de la cellule. Comment pouvons-nous alors expliquer la présence de ce peptide à l'intérieur de la cellule et son rôle délétère ?

Sites de production de l'A β intracellulaire. D'abord, le complexe associant l'APP à ses protéases peut, en partie, être localisé sur différentes membranes à l'intérieur de la cellule (réticulum endoplasmique, trans-Golgi, endosome et lysosome). L'une des voies de génération d'A β intracellulaire se situe au niveau de **l'endosome**. Elle s'explique par l'identification récente du gène *SORL1* (sortilin-related receptor 1) comme nouveau variant génétique associé à la forme sporadique de MA. La protéine SORL1 régule le trafic de l'APP entre la membrane plasmique cellulaire et l'endosome (retromer recycling endosome) permettant le rétro-transport de l'APP vers le réseau trans-Golgi. L'APP et BACE-1 sont conjointement présents sur les membranes endosomales. BACE-1, dont l'activité est favorisée dans le milieu acide de l'endosome, clive préférentiellement l'APP en A β . Certains variants génétiques de *SORL1* favorisent le trafic de l'APP vers les endosomes, augmentant d'A β intracellulaire et expliquant pourquoi ces variants génétiques sont considérés comme des facteurs de risque pour la forme sporadique de la MA ([Rogaeva, Meng et al. 2007](#)). Une seconde voie de production d'A β intracellulaire a été identifiée. En retenant l'APP au niveau du **réticulum endoplasmique**, une étude montre que la production d'A β_{1-40} est inhibée au contraire de celle de l'A β_{1-42} suggérant que ce peptide peut être produit au niveau du réticulum endoplasmique ([Busciglio, Gabuzda et al. 1993](#)). De façon intéressante, ces sites de production sont uniques aux cellules neuronales. En effet, dans les cellules non-

neuronales, l'A β est uniquement produit au niveau de la membrane plasmique ([Hartmann, Bieger et al. 1997](#)) (**Figure 18**).

Réinternalisation de l'A β extracellulaire. La part majoritaire d'A β sécrétée hors de la cellule peut être récupérée et internalisée à l'intérieur de cellules « réceptrices ». L'A β peut se lier à de nombreuses biomolécules incluant lipides, protéines et protéoglycanes. Pour preuve, après ouverture de la barrière hématoencéphalique, une étude démontre chez la souris que l'A β injecté dans la veine caudale est retrouvé à l'intérieur de neurones pyramidaux du cortex ([Clifford, Zarrabi et al. 2007](#)). De nombreux transporteurs et récepteurs de l'A β ont ainsi été identifiés signifiant qu'une part importante d'A β intracellulaire est ré-internalisée. L'A β se lie aux récepteurs nicotiques $\alpha 7$ de l'acétylcholine (**$\alpha 7nAChR$**) avec une très haute affinité ([Wang, Lee et al. 2000](#)). L'utilisation de la bungarotoxine, inhibant la liaison de l'acétylcholine à son récepteur, prévient *in vivo* l'accumulation d'A β dans certaines régions cérébrales ([Oddo, Caccamo et al. 2005](#)). Une seconde liaison peut être citée : l'A β se lie directement à la protéine **LRP**, membre de la famille des récepteurs lipoprotéine à faible densité (LDLR pour low-density lipoprotein receptor). Cette liaison est associée aux récepteurs de l'apolipoprotéine E (APOE) modulant l'endocytose rapide de l'A β et facilitant sa ré-internalisation ([Zerbinatti, Wahrle et al. 2006](#)). Cet effet est bien défini *in vivo* puisque la surexpression de LRP augmente l'internalisation d'A β_{1-42} tandis que l'invalidation d'APOE la diminue drastiquement chez un modèle murin de la MA (mutation sur l'*APP*). Une large part d'A β est ainsi internalisée via le complexe LRP / APOE. L'*APOE4* est le facteur de risque le plus fréquemment associé à la MA sporadique, son effet délétère s'expliquerait donc, au moins en partie, à son implication dans l'accumulation d'A β intracellulaire.

L'internalisation de l'A β est médiée également par le récepteur « collecteur de déchets protéique » **RAGE** (scavenger receptor for advanced glycation and ends products) ([Deane, Du Yan et al. 2003](#)). Dans les neurones, son internalisation induit du stress oxydatif neuronal et active NF κ B qui conduit *in fine* au recrutement accru de cellules microgliales. Dans les cellules astrocytaires de patients MA, le complexe A β -RAGE est internalisé et localisé dans les voies lysosomales. Les effets de l'internalisation d'A β sont donc vraisemblablement différents d'un type de cellule à l'autre.

L'internalisation d'A β par les cellules gliales semble être plutôt bénéfique, du moins dans un premier temps. Ces cellules contribuent en effet à la dégradation d'A β et par conséquent à la diminution de sa concentration dans le neurone et dans le milieu extracellulaire. L'internalisation d'A β soluble est réalisée par **macropinocytose** à phase fluide insaturable ([Mandrekar, Jiang et al. 2009](#)). Cette dernière est dépendante du dynamisme des protéines du cytosquelette : actine et tubuline. Au contraire, l'internalisation des fibrilles d'A β implique l'assemblage de clathrine,

vésicules « enrobées » et cholestérol membranaire base de l'endocytose. A l'image des plaques amyloïdes, l'A β est capable d'initier la réponse inflammatoire via l'activation de la microglie et des astrocytes. Oligomères et fibrilles auraient des effets différents sur les voies d'activation microgliale mais ces premiers pourraient stimuler la **production de cytokines/interleukines inflammatoires** et **réduire progressivement la capacité phagocytaire** des cellules microgliales en se liant au récepteur à protéine G : **FPRL1**. Son internalisation cytosolique est rapide dans les macrophages et peut être visualisée aisément par le marquage d'A β agrégés au rouge Congo ([Polanco, Li et al. 2018](#)).

Au contraire, l'internalisation d'A β neuronale est délétère.

Rôle pathologique de l'A β intracellulaire (Figure 18). A l'intérieur du neurone, l'A β est localisé dans les membranes de multiples vésicules (MVBs). Il a été montré que cette liaison perturbe le trafic cytosolique des MVBs. Le système ubiquitine-protéasome utilisant ces MVBs est donc atteint. Ce système regroupe diverses protéines et trouve son rôle dans la dégradation et le recyclage de protéines mal repliées ou superflues. L'ubiquitine est utilisée ici comme « marque » ou « tag » des protéines à recycler. De façon intéressante, l'une des fonctions délétères de l'A β intracellulaire est liée à la perturbation du **protéasome**. *In fine*, son activité perturbée, le protéasome ne peut assurer la prise en charge d'éléments nécessitant d'être recyclé comme par exemple les protéines Tau hyperphosphorylées. Un lien entre l'A β intracellulaire et la composante Tau peut alors en partie être expliqué par un protéasome défectueux ([Oddo, Caccamo et al. 2006](#)).

L'accumulation d'A β est observée également au niveau **mitochondrial**. L'organelle regroupe tous les enzymes du complexe γ -sécrétase. L'accumulation progressive d'A β à l'intérieur de celle-ci est associée à la diminution de l'activité enzymatique de la chaîne respiratoire III et IV et réduit le taux de consommation d'oxygène ([Caspersen, Wang et al. 2005](#)). Des observations identifiant la présence de multiple défauts mitochondriaux sont en effet décrites chez les patients MA.

Il est également largement reconnu que les peptides A β créent des puits à l'intérieur de la membrane plasmique produisant de véritables canaux cationiques non spécifiques et artificiels mais permettant l'influx majeur de Ca²⁺ extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. Les conséquences de cette **dérégulation calcique** peuvent être majeures puisque les voies de signalisation calciques contribuent largement au maintien de processus médiant l'apprentissage et la mémoire. Ainsi, de nombreuses preuves font état de l'effet de l'A β intracellulaire dans le **dysfonctionnement synaptique**. Chez la souris (3xTg-AD), l'accumulation intraneuronale d'A β entraîne dès 4 mois des déficits cognitifs. A cet âge, le dépôt extracellulaire insoluble d'A β n'est

pas observé tout comme l'apparition de protéines Tau hyper- ou anormalement phosphorylées. L'immunothérapie anti-A β supprimant l'A β intracellulaire rétablit les fonctions cognitives. L'A β perturbe donc la LTP (Potentialisation à long terme) mesurée par études électrophysiologiques et représentant un niveau de plasticité synaptique, base de la mémoire et de l'apprentissage ([Billings, Oddo et al. 2005](#)). Ceci peut s'expliquer du fait que l'A β se lie au récepteur **NMDA** (N-methyl-D-aspartate), récepteur clé dans le maintien de la plasticité synaptique. L'utilisation d'antagonistes NMDA comme la mémantine, prévient le déclin cognitif chez la souris suggérant que l'A β par sa liaison aux récepteurs NMDA perturbe l'activité synaptique.

La dérégulation calcique intracellulaire peut également activer certaines protéines kinases de la famille des CAMKs, modulant entre autre la kinase GSK3 β , également impliquées dans la phosphorylation des protéines Tau. En plus, certaines protéases, dépendantes du calcium comme les calpaïnes, sont dérégulées et protéolysent de façon pathologiques de nombreuses protéines (dont GSK3 β ou DYRK1A) exacerbant potentiellement leurs effets (ces protéines interviennent dans la phosphorylation de Tau). Ces données suggèrent donc que la dyshoméostasie calcique intracellulaire pourrait agir comme lien entre la composante amyloïde et la composante Tau.

L'ensemble des éléments cités plus haut n'est pas exhaustif. Il s'agit ici de démontrer que l'A β intracellulaire possède des cibles multiples et perturbe ainsi le fonctionnement neuronal à de très nombreux niveaux.

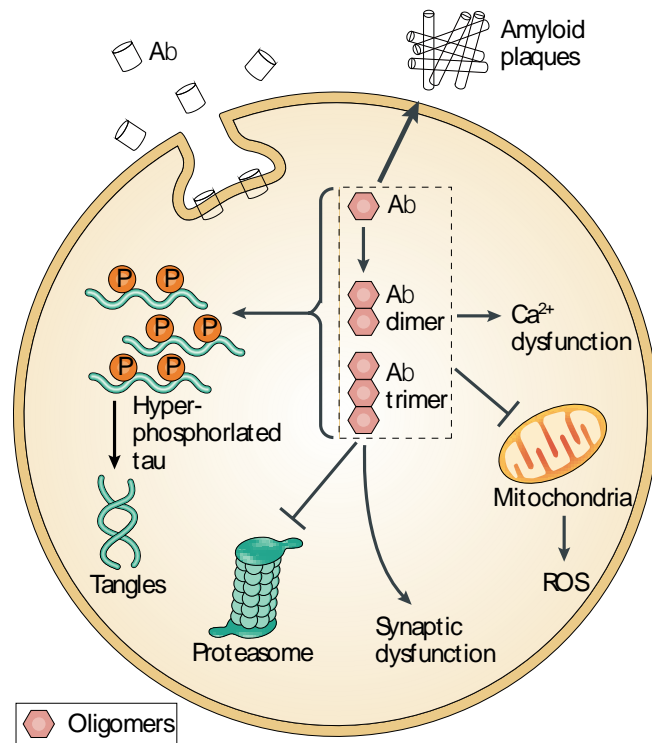


Figure 18 : Effets pathologiques de l'Aβ intraneuronal

Lien entre Aβ intracellulaire et extracellulaire. La dernière question que j'aborderai au sujet de la physiologie de l'Aβ intracellulaire est de savoir si cette part est corrélée en quantité ou non à l'Aβ extracellulaire. Les données d'étude chez l'Homme sont contradictoires. Par immunohistochimie, il a été démontré que les régions cérébrales avec une accumulation importante en Aβ intracellulaire montrent également la présence évidente de neurones lysés suggérant une dispersion d'Aβ intracellulaire issus de ces neurones dans l'espace extracellulaire. Chez des patients atteints de trisomie 21, l'inverse a été observé. Chez la souris, l'utilisation d'immunothérapie contre l'Aβ montre une diminution de charge amyloïde extracellulaire rapidement suivie d'une baisse de l'Aβ intracellulaire. A l'arrêt du traitement, l'Aβ intracellulaire réapparaît avant l'Aβ extracellulaire (Oddo, Billings et al. 2004). Ces données suggèrent donc que **l'Aβ extracellulaire prendrait son origine de la fraction présente dans la cellule** et qu'un équilibre dynamique existerait entre les deux « formes ». Lorsque la forme extracellulaire diminue, la forme intracellulaire pourrait être évacuée vers l'extérieur de la cellule.

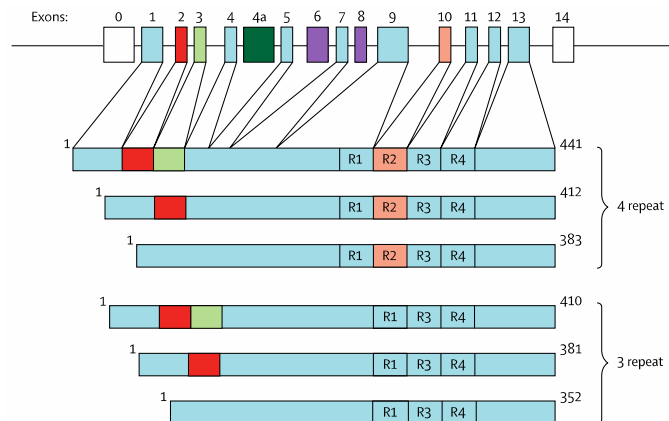
3. La composante Tau

i. Physiologie de Tau ([Morris, Maeda et al. 2011](#))

La protéine Tau a été découverte comme facteur assemblant les microtubules dans les années 1970 ([Weingarten, Lockwood et al. 1975](#)) alors qu'une dizaine d'années plus tard, sa forme hyperphosphorylée, insoluble a été identifiée comme le composant majeur de la seconde lésion histopathologique retrouvée dans le cerveau de patients atteints de la MA : la DNF ([Grundke-Iqbal, Iqbal et al. 1986](#)).

Tau est exprimé dans le système nerveux central dans sa grande majorité et en particulier dans les axones neuronaux mais aussi au niveau du compartiment somato-dendritique des neurones et oligodendrocytes. On la retrouve également dans le système nerveux périphérique et à moindre mesure dans les reins, les poumons et les testicules.

Six isoformes de Tau sont exprimées dans le cerveau humain adulte et sont produites par épissage alternatif du mRNA à partir du gène *MAPT* localisé sur le chromosome 17q21.31 (**Figure 19**).



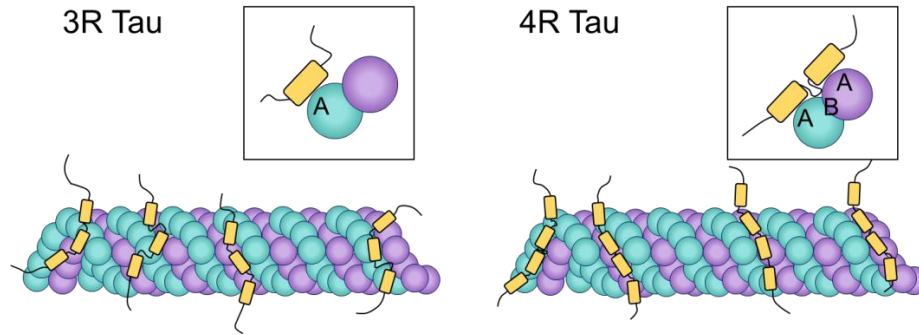
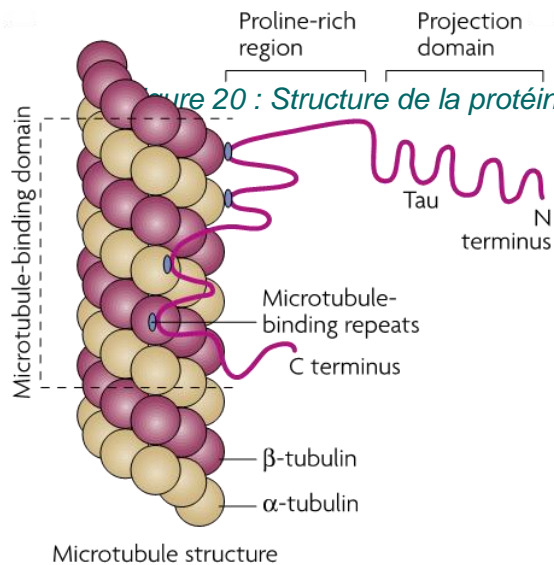


Figure 19 : Les différentes isoformes de Tau

Les 6 isoformes de Tau et distinction des Tau 3R et 4R ([Spillantini and Goedert 2013](#)); adapté de ([Goode and Feinstein 1994](#))). (haut) MAPT (gène codant la protéine Tau) possède 6 isoformes, de 3 ou 4 répétitions, exprimées dans le cerveau adulte humain et incluant 16 exons. (bas) Modèle illustrant comment les formes Tau à 3 répétitions (3R) et à 4 répétitions (4R) diffèrent dans leurs pouvoirs d'assemblage des microtubules. Les séquences répétées de Tau sont illustrées par des rectangles jaunes, les dimères de α - et β - tubuline en turquoise et violet regroupés pour former une fibre de microtubule. Deux sites de liaison entre la tubuline et Tau sont nommés A et B.

Les 6 isoformes de MAPT se différencient par la présence ou l'absence d'un insert de 29 acides aminés ou 58 acides aminés dans la moitié de la partie N-terminale de la protéine et par l'inclusion ou non de la séquence répétée de 31 acides aminés encodés par l'exon 10 du gène Tau localisé dans la moitié de la partie C-terminale de la protéine. L'inclusion de l'exon 10 produit 3 isoformes incluant chacune 4 répétitions (4R). Son exclusion produit 3 autres isoformes incluant 3 répétitions (3R). Cette différence est particulièrement importante puisque **la liaison entre le microtubule est plus stable avec une protéine Tau comprenant 4 répétitions (4R) qu'une protéine Tau incluant uniquement 3 répétitions (3R) (Figure 19)**. Chez l'Homme, on retrouve uniquement la forme 3R pendant le développement cérébral embryonnaire et post-natale précoce. A l'âge adulte, un équilibre entre protéines 3R et protéines 4R est observé dans le cortex cérébral d'adultes sains. A noter que les rongeurs adultes (souris et rats) expriment uniquement la forme 4R au niveau de leurs cerveaux.

La protéine Tau peut être sous-divisée en quatre régions distinctes en fonction de leurs séquences en acides aminés et leurs rôles dans la cellule. Deux régions positionnées en N- et C-terminale encadrent une région riche en proline et un domaine de liaison aux microtubules (MBD : microtubule-binding domain) (Figure 20).



Structure de la protéine Tau et illustration de son interaction aux microtubules. Constitué d' α -tubuline et β -tubuline, les microtubules sont associés aux protéines Tau favorisant le transport de protéines ([Mazanetz and Fischer 2007](#)).

Les modifications post-traductionnelles de la protéine Tau sont majoritairement effectuées par phosphorylation puisque sur 90 sites sensibles à un tel évènement, 85 d'entre eux sont

phosphorylés (alors que 11, 12 ou encore 8 sites sont sujets respectivement à une glycosylation, glycation ou une polyamination) ([Martin, Latypova et al. 2011](#)). Sous certaines conditions, sa protéolyse, son ubiquitination et son mauvais repliement sont également observés. Concernant sa phosphorylation, il est admis que 2 à 3 moles de phosphate sont présentes sur une protéine Tau exprimée dans le cerveau d'individus cognitivement sains. Parmi les 85 sites de phosphorylation, 45 (ou 53 %) sont des sérines, 35 (ou 41 %) sont des thréonines et seulement 5 (ou 6 %) sont des tyrosines. La majorité d'entre eux sont situés en dehors des domaines de liaison aux microtubules.

A l'heure actuelle, plus de 20 kinases ont été identifiées comme phosphorylant les protéines Tau. Elles peuvent être regroupées en quatre groupes distincts :

- **Les protéines kinases à activité sérine / thréonine précédée d'un résidu proline (PDPK) comprenant** la CDK (cyclin dependant kinase 1), CDK5 ou MAPK (mitogen activated protein kinase). Cette famille inclue également **DYRK1A une kinase à double spécificité** (auto-activable sur leurs résidus tyrosines et à activité serine / thréonine).
- Les protéines kinases à activité sérine / thréonine précédée ou non de proline comme les GSK (Glycogen synthase kinase) dont GSK3 α et **GSK3 β** . Cette dernière pourrait phosphoryler au moins 36 épitopes de Tau.
- Les protéines kinases à activité tyrosine comme les kinases de la famille des Src dont **Fyn**.

- Les protéines non PDPK incluant des kinases de Tau et des tubulines (TTBK1 et 2), les kinases caséines, les kinases régulant l'affinité pour les microtubules (MAPK), les protéines kinases A (PKA) et B (PKB, connue également sous le nom de AKT1), C (PKC), N (PKN) et la protéine Ca²⁺/calmoduline-dépendante II (CamkII).

Chaque site de phosphorylation peut être phosphorylé par une ou plusieurs protéines kinases. De ce fait, certaines protéines kinases peuvent phosphoryler Tau plusieurs fois l'une après l'autre dans un ordre précis ou rentrent en compétition.

L'état de phosphorylation de Tau est, en plus, régulé par l'activité de plusieurs phosphatases. En particulier, la protéine phosphatase PP2A est responsable de 70 % de l'activité de déphosphorylation des protéines Tau. Donc, un équilibre entre phosphorylation et déphosphorylation conduit par l'action des kinases et phosphatases régule le niveau de phosphorylation des protéines Tau. Ceci est particulièrement important si l'on se reporte au fait que plus la protéine Tau est phosphorylée, plus l'affinité à lier les microtubules diminue. En fait, plus que le niveau de phosphorylation globale, **il apparaît que certains sites**, notamment ceux situés sur les domaines de liaison aux microtubules, **affectent grandement l'interaction Tau-tubuline** conduisant à la déstabilisation du cytosquelette.

Les fonctions biologiques des protéines Tau ne semblent encore pas totalement connues bien que de nombreuses études se soient penchées sur cette question. Certaines de ces fonctions sont bien caractérisées d'un point de vue moléculaire mais restent incertaines à l'échelle *in vivo*. D'autres, au contraire, ont été révélées en utilisant des souris invalidant le gène *MAPT*, mais leurs conséquences moléculaires restent vagues. Par exemple, si nous invalidons le gène *MAPT* dans certaines souris modèle de la MA, les déficits de mémoire sont rétablis suggérant que l'unique fonction de Tau se trouve dans sa capacité à être toxique. Un second rôle potentiel peut être ici avancé. Compte tenu de son expression ultra majoritaire dans les neurones, l'utilisation de cellules neuronales pour étudier les fonctions de Tau semble être prioritaire. Malgré cela, il est à noter que des pathologies sont associées à la protéine Tau présente dans les cellules gliales ([Higuchi, Ishihara et al. 2002](#)). Ici, les protéines interagissant avec Tau sont identiques malgré la différence de lignée cellulaire.

Tau possède de nombreux interactants (**Figure 21**), dont des éléments du cytosquelette, des molécules de signalisation et des lipides ce qui suggère un rôle multitâche. Elle apparaît en plus comme une protéine d'échafaudage ou « scaffold » assemblant des complexes protéiques et jouant alors un rôle d'activateur ou d'inhibiteur d'enzymes.

Le rôle le plus connu de Tau provient de **son lien avec les microtubules**. Les microtubules sont des fibres constitutives du cytosquelette cellulaire au même titre que les

filaments d'actine ou les filaments intermédiaires. Ils sont ancrés au niveau du centrosome (noyau cellulaire) et irradiés l'ensemble du cytoplasme. Un équilibre polymérisation – dépolymérisation permet l'allongement ou le rétrécissement de la fibre. Les microtubules sont constitués de dimères de protéines α - et β - tubulines. La majorité des protéines Tau s'associent avec ces dernières via leurs domaines MBD. Une interaction se fait alors entre les charges nettes positives des séquences répétées du domaine MBD et les résidus chargés négativement de la tubuline (**Figure 21**). Si les premières études *in vitro* en condition « cell-free », identifiaient Tau comme une protéine permettant la stabilisation et l'assemblage des microtubules, d'autres études plus physiologiques apportent quelques subtilités. Par exemple, les protéines Tau sont capables de modifier leurs états de stabilisation plus que n'importe quelle autre population de protéines associées aux microtubules. En plus, l'utilisation de *siRNA* Tau, invalidant la production de la protéine, n'est pas toxique sur des cultures primaires de neurones et ne diminue pas le nombre de microtubule ou leur état de polymérisation. Donc, la stabilisation des microtubules par Tau n'est pas indispensable. En fait, sa fonction *in vivo* pourrait être semblable à une autre MAP (MAP1b) retrouvée dans les axones. Mais la délétion complète de *MAP1B* perturbe la plupart des fonctions cérébrales au contraire de celle de *Tau*. L'invalidation double de *MAPT* (Tau) et *MAP1B* résulte dans de grave dysgénésie du cerveau et dans la mortalité avant le premier mois chez la souris suggérant que *MAP1B* est plus important que Tau et que leurs fonctions se chevauchent particulièrement dans la période de maturation post natale.

Tau Binding Partners	Function of Binding Partner	References
ApoE3	Lipid carrier	Fleming et al., 1996; Strittmatter et al., 1994
Beta tubulin	Cytoskeleton	Kar et al., 2003
cSrc	Src-family kinase	Lee et al., 1998; Reynolds et al., 2008
F-actin	Cytoskeleton	Fulga et al., 2007
Fgr	Src-family kinase	Reynolds et al., 2008
Fyn	Src-family kinase	Lee et al., 1998; Reynolds et al., 2008
Growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2)	Adaptor protein for growth factor signaling	Reynolds et al., 2008
Lck	Src-family kinase	Lee et al., 1998
p85 α	Regulatory subunit of PI3K	Reynolds et al., 2008
Phosphatidylinositol	Signaling lipid	SurrIDGE and Burns, 1994
Phosphatidylinositol bisphosphate	Signaling lipid	Flanagan et al., 1997
PLC γ	Cleaves phospholipids into signaling molecules	Hwang et al., 1996; Jenkins and Johnson, 1998; Reynolds et al., 2008

Figure 21 : Interactions des protéines Tau.

Tau est donc associée également à la **régulation des transports axonaux** le long des microtubules ainsi qu'à la stabilisation de ces derniers. Tau interfère dans les liaisons entre microtubule et protéine motrices (dinéines et kinésines). Ceci est confirmé du fait qu'un gradient de Tau est observé le long de l'axone : avec une concentration plus importante au niveau des synapses. Cette distribution peut alors détacher les protéines motrices et assurer le trafic de vésicules au niveau des terminaux pré-synaptiques.

Tau peut se **lier également aux filaments d'actines** en les empaquetant par l'intermédiaire de son domaine MBD alors que son domaine riche en proline régule le mécanisme. Potentiellement, Tau connecterait donc les microtubules aux filaments d'actines. Cette fonction serait confirmée par le fait que les régions N- et C-terminales projettent largement vers l'extérieur du microtubule et pourrait se lier à des partenaires comme les filaments d'actine.

Tau peut agir comme **protéine « scaffold »** régulant l'assemblage de partenaires protéiques pour activer ou non une voie de signalisation. Un exemple : Tau module l'activité des kinases de la famille des Src via l'interaction entre son domaine riche en proline et le domaine SH3 des protéines kinases. Tau co-immunoprécipite avec la kinase Fyn et la protéine PSD-95 (protéine d'assemblage du compartiment post-synaptique). En absence de Tau, Fyn n'arrive pas jusqu'aux sites post-synaptiques de la dendrite. De la même façon, Tau agit comme protéine « scaffold » dans les oligodendrocytes connectant Fyn et les microtubules pour réduire les processus d'extension.

Tau s'associe aux **lipides** et en particulier à la **phospholipase C** (PLC- γ). La présence d'acide arachidonique facilite l'activation de la PLC- γ par Tau. En s'associant et inhibant l'histone deacetylase-6, qui déacétyle la tubuline et régule la stabilité des microtubules, Tau agit donc contre la stabilité de ces derniers suivant un mécanisme indépendant de sa liaison à la tubuline.

Enfin, **Tau est impliqué dans la neurogenèse adulte**. Certaines isoformes de Tau sont particulièrement exprimées au niveau des cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe lieu de neurogenèse adulte. Dans une souris invalidée pour le gène *Tau*, une baisse de la neurogenèse adulte est observée. Il est à noter que Tau n'est pas nécessaire à la neurogenèse embryonnaire. Ce rôle est ainsi également discuté sachant que l'invalidation conditionnelle de *Tau* à l'âge adulte n'induit pas de problème de mémoire ou d'apprentissage chez la souris.

ii. Pathologie Tau dans la maladie d'Alzheimer ([Sabbagh and Dickey 2016](#))

L'agrégation des protéines Tau est présente dans de nombreuses maladies neurodégénératives. Ces « **tauopathies** » regroupent la dégénérescence frontotemporal avec inclusion de Tau(ou maladie de Pick), la paralysie supranucléaire progressive, dégénérescence

cortico-basale, la maladie des grains argyrophiles, certaines maladies à prions, le syndrome de sclérose amyotrophique latérale – parkinsonisme – démence (ou maladie de Guam), l'encéphalopathie traumatique chronique, certaines formes génétiques de la maladie de Parkinson et bien sûr la Maladie d'Alzheimer. Ces maladies diffèrent dans leurs étiologies mais le dénominateur commun est la présence d'agrégats de protéines Tau hyperphosphorylées. Dans le contexte de la MA, bien que les observations cliniques ne montrent pas de relation de cause à effet, l'agrégation de protéines Tau contribue à la pathogenèse de la MA car elle se retrouve dans des régions cérébrales spécifiques dont les fonctions sont altérées. De plus, la formation de DNF corrèle avec la durée et la progression de la maladie.

Tau est une protéine intrinsèquement désordonnée si l'on se réfère au fait que sa structure tridimensionnelle manque cruellement de stabilité et d'ordre. Cette propriété lui confère une **tendance à s'auto-agréger** très facilement en structure de type feuillet- β , comme observé dans les DNFs. Cependant, plusieurs facteurs peuvent favoriser cette capacité dont des mutations du gène *MAPT* (non identifiées dans la MA) et surtout des **modifications post-traductionnelles** comme la **phosphorylation**, l'ubiquitination et la protéolyse.

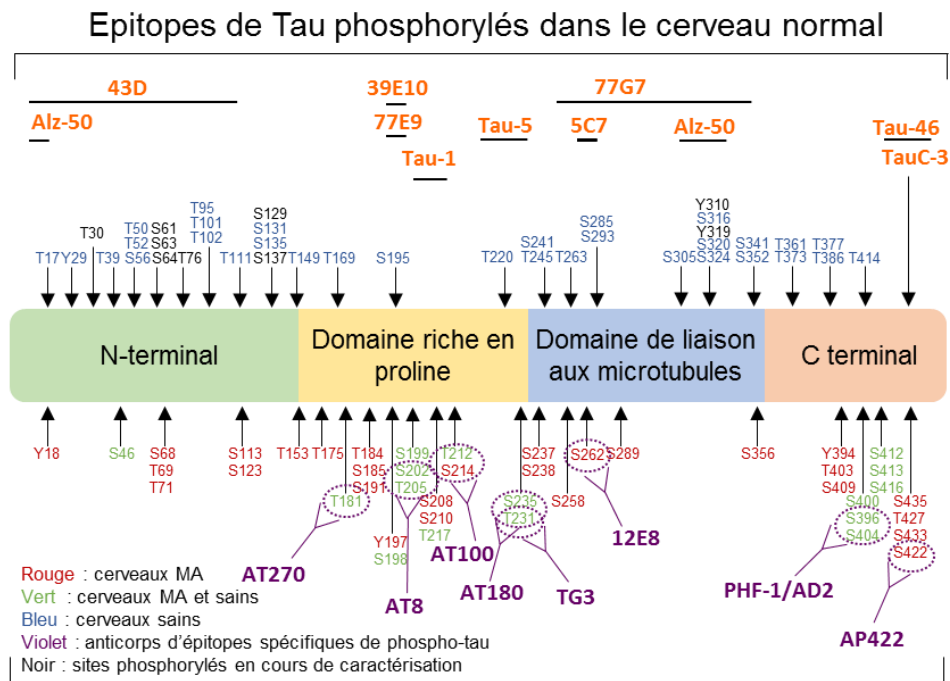
Phosphorylation pathologique de la protéine Tau. Nous l'avons vu, le niveau de phosphorylation de Tau est régulé par un équilibre dans l'activité de protéines kinases et phosphatases. Les protéines Tau contenues dans les DNFs observées dans le cerveau de patients atteints de MA contiennent 5 à 9 moles de phosphates par mole de protéines Tau contre 2 à 3 moles de phosphates chez des sujets sains ([Hashiguchi, Sobue et al. 2000](#)). Cette disparité s'explique par l'**hyper-phosphorylation d'épitopes physiologiques** et la **phosphorylation anormale de résidus pathologiques** des protéines Tau. Un tel déséquilibre a des conséquences importantes sur la fonction de Tau, en particulier sur sa capacité à s'associer aux microtubules, mais également sur sa structure. Cependant, tous les phospho-épitopes n'ont pas le même effet. Ainsi, lorsque Tau est phosphorylée sur les résidus Ser202 et Thr205 (site reconnu par l'anticorps **AT8**) ou sur le résidu Thr231 (anticorps AT180), elle perd sa capacité à assembler les microtubules mais reste capable de s'associer sur les microtubules en cours de polymérisation ([Amniai, Barbier et al. 2009](#)). Au contraire, la phosphorylation dépendante de la kinase MARK sur le résidu Ser262 induit un changement de conformation au niveau du site de phosphorylation, altérant la structure de Tau et atténuant sa capacité à se lier aux microtubules ([Fischer, Mukrasch et al. 2009](#)). Une étude récente montre que le résidu Thr231 peut former un pont salin avec Arg230, nécessaire à l'interaction Tau-tubuline. La phosphorylation sur la Thr231 n'affecte pas seulement la conformation locale mais favorise l'agrégation intramoléculaire de deux protéines Tau.

Globalement, les phospho-épitopes retrouvés sur les protéines Tau peuvent être classés en trois catégories (**Figure 22**).

- D'abord, les épitopes phosphorylés dans des conditions physiologiques sont majoritairement présents dans la partie N-terminale et pourraient réguler Tau dans sa capacité à se lier aux molécules présentes aux abords des microtubules comme les protéines motrices par exemple.

- La seconde catégorie regroupe les épitopes retrouvés phosphorylés à un niveau basal en condition physiologique et hyper-phosphorylés dans la maladie d'Alzheimer. Nous noterons par exemple la présence des résidus **Thr181**, Ser202, **Thr212**, Thr231, Ser235 ou encore Ser404. Ils sont curieusement plus présents dans le domaine riche en proline que les épitopes « physiologiques ».

- Enfin, des épitopes phosphorylés uniquement dans le cerveau de patients MA comme la Ser214, **Ser422**, représentent un changement de conformation de la protéine Tau.



Epitopes de Tau phosphorylés dans le cerveau MA

Figure 22 : Protéine Tau et ses sites de phosphorylation

Sites de phosphorylation de Tau et épitopes majeurs spécifiques des protéines Tau phosphorylées. Les acides aminés rouges illustrent les sites de phosphorylation spécifiquement retrouvés dans le cerveau de patients MA. Les acides aminés en vert représentent les sites de phosphorylation retrouvés à la fois en condition MA ou en condition physiologique, alors que les sites en bleu illustrent ceux en conditions physiologiques. Les anticorps notés en violet sont les

anticorps reconnaissant les formes phosphorylées pathologiques de Tau. Les anticorps notés en orange reconnaissent Tau non phosphorylé (adapté de (Simic, Babic Leko et al. 2016)).

La phosphorylation d'épitopes spécifiques apparait progressivement puisque certains sont retrouvés dans des neurones de type « pré-dégénérescences » comme Thr153, Ser262 ou Thr231 alors que d'autres sont retrouvés dans des neurones avec une dégénérescence avancée Ser202, Thr205 (AT8) ou Thr212, Ser214 (**AT100**). Ces deux derniers épitopes ciblent particulièrement des protéines Tau caractérisées par un changement conformationnel, suggérant que **l'hyperphosphorylation de Tau et son changement de conformation précèdent son agrégation** (Luna-Munoz, Chavez-Macias et al. 2007).

Enfin, la phosphorylation de Tau dans ses domaines riches en proline et C-terminal favoriserait son agrégation. En fait, sans épitope phosphorylé la partie C-terminale empêche l'agrégation de deux protéines Tau par encombrement stérique. L'hyper-phosphorylation entraîne une acidification de la protéine Tau, changeant la conformation de la protéine, en particulier au niveau de la partie C-terminale qui se recourbe et n'empêche plus l'agrégation (Iqbal, Alonso Adel et al. 2005) (**Figure 23**)

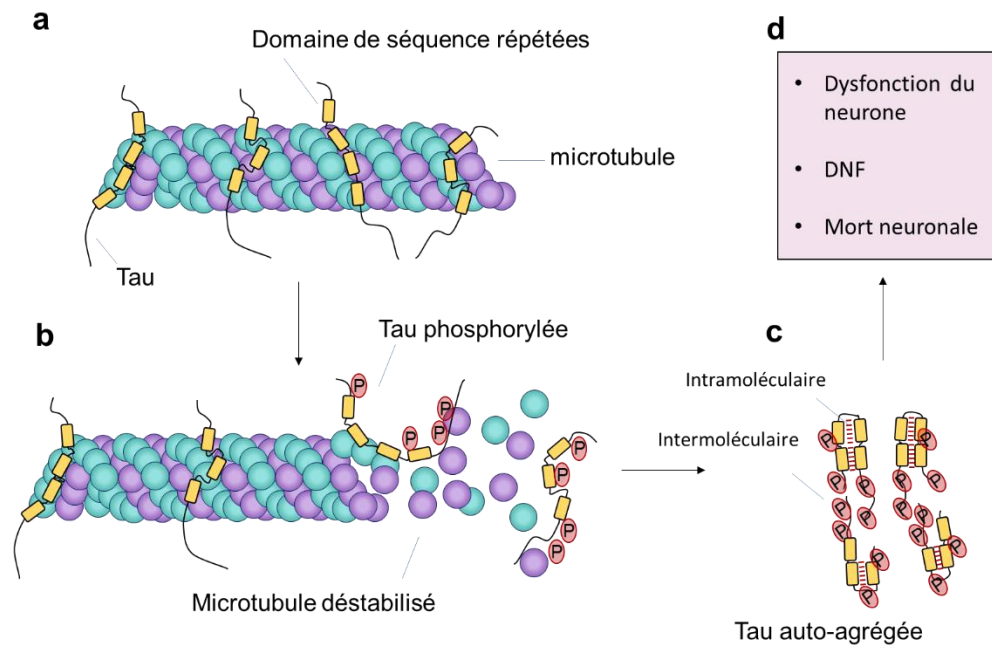


Figure 23 : La phosphorylation des protéines Tau conduit à la formation de DNFs

(a) Les protéines Tau sont associées aux microtubules et les stabilisent. (b) Un niveau élevé de phosphorylation et une phosphorylation anormale d'épitopes de Tau atténuent la liaison Tau-tubuline conduisant au désassemblage du microtubule. (c) Les protéines Tau anormalement phosphorylées se dissocient complètement des microtubules et s'auto-agrègent conduisant à

l'enchevêtrement neurofibrillaire des protéines Tau. Les liaisons intramoléculaires par l'intermédiaire des motifs VQIYK et les liaisons intermoléculaires par l'intermédiaire des résidus phosphorylé sur les domaines riches en proline assurent l'autoagrégation des protéines Tau(d) Les conséquences de cette voie résultent en une dysfonction neuronale, une DNF puis une mort du neurone (adapté de ([Mazanetz and Fischer 2007](#))).

Autres modifications post-traductionnelles de Tau: ubiquitination et protéolyse. Au cours de la progression de la pathologie Tau associée à la MA, Tau semble subir un clivage séquentiel. Ainsi, Tau est modifié par clivages protéolytiques altérant sa fonction biologique, sa structure et augmentant sa capacité à s'auto-agrégéer. La caspase-3 ou des protéases dépendantes de la concentration en calcium, comme la Calpaïne, conduisant à la formation de fragments de protéines Tau tronquées de leurs parties N ou C-terminale ont été identifiées comme impliquées dans ce clivage pathologique. Il a également été montré que l'ubiquitination des protéines Tau est requise pour son assemblage en feuillets β *in vivo*.

Cependant, il a été démontré que les formes de 17 kDa résultat du clivage des calpaïnes et les formes de Tau ubiquitinilées ne sont pas les formes les plus toxiques pour les neurones. Par exemple, en bloquant l'ubiquitination des protéines Tau, la part de formes solubles intermédiaires qui en résulte montre une toxicité bien plus importante que les formes agrégées suggérant que les formes oligomériques sont bien plus toxiques que ces dernières ([Dickey, Dunmore et al. 2006](#)).

Importance des formes oligomérisées solubles de Tau ([Spires-Jones, Stoothoff et al. 2009](#)). Comme nous l'avons vu, la phosphorylation anormale, la protéolyse et l'agrégation des protéines Tau sont des éléments importants dans la pathogenèse de la MA puisqu'ils contribuent à la formation d'enchevêtrements neurofibrillaires constituants majeurs des DNFs. Mais à l'image de la composante amyloïde, la question de savoir quelle est la variété de Tau la plus toxique entre ses formes oligomérisées solubles ou ses formes agrégées fait débat. De plus en plus de preuves montrent que les formes de Tau oligomériques solubles sont la variété de Tau la plus toxique pour le neurone et la fonction synaptique.

Pour certains, les DNFs seraient finalement des spectateurs silencieux de la composante Tau. Ainsi, il est noté que de nombreux individus cognitivement sains possèdent des DNFs. Des démences de types frontotemporale causées par des mutations du gène *MAPT* et des modèles de souris associés démontrent d'importants dysfonctionnements synaptiques et pertes neuronales sans lésions de type DNF ([Wittmann, Wszolek et al. 2001](#), [Polydoro, Dzhala et al. 2014](#)). De plus, une lignée de souris exprimant un mutant de *MAPT* humain (rTg4510) montre une dissociation régionale et temporelle entre la perte neuronale et l'accumulation de DNFs. En particulier, lorsque le transgène est supprimé, la perte neuronale s'estompe alors que

l'accumulation de DNFs persiste ([Spire, Orne et al. 2006](#)). D'autres études, montrent que la présence de DNFs n'altère pas la densité des épines dendritiques, les fonctions électrophysiologiques ou cognitives. En fait, les DNF apparaîtraient dans ces modèles de souris après l'activation de caspases et les voies de signalisation induisant l'apoptose. Selon ces études, les DNFs pourraient même illustrer un mécanisme protecteur en séquestrant les espèces de Tau soluble toxiques ([Spire-Jones, Stoothoff et al. 2009](#)).

Ces preuves indirectes ont été confirmées par une étude identifiant plus directement la toxicité des oligomères solubles de Tau. En effet l'injection d'oligomères de Tau, au contraire de monomères ou fibrilles, dans le cerveau de souris normale est suffisant pour induire une dysfonction mitochondriale, des déficits synaptiques et mnésiques ([Lasagna-Reeves, Castillo-Carranza et al. 2011](#)).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la toxicité des oligomères de Tau. Ils incluent évidemment la fonction primaire de Tau et son **lien avec le transport axonal** via sa liaison aux microtubules. Les neurones sont des cellules allongées nécessitant un apport d'énergie et de protéines nouvellement formées au niveau de leurs synapses. Ainsi le transport d'organelles et de matériel vital pour la fonction synaptique est très dépendant des microtubules et par conséquent des protéines Tau. Le gain et la perte de fonction de Tau interfèrent dans les deux cas avec le transport axonal. Sa surexpression dans des cellules en culture a montré une inhibition rapide du transport axonal sans formation de DNF. Ainsi, les oligomères de Tau seraient synonymes de « barrières » au transport axonal perturbant en particulier les kinésines, protéines motrices impliquées dans le transport antérograde (vers la synapse) ([Dixit, Ross et al. 2008](#)). Les conséquences seraient directes par exemple sur **le transport de récepteurs au glutamate (AMPA)** à la membrane post-synaptique ou sur les **mitochondries**, organelles indispensables au maintien énergétique du neurone. La fonction de ces dernières serait atteinte, surtout, les mitochondries seraient délocalisées dans le soma du neurone, loin de la fente synaptique où elles sont nécessaires. Ce mécanisme constitue un second effet toxique des oligomères solubles de Tau. Il est d'ailleurs de plus en plus proposé comme un événement précoce expliquant la dégénérescence neuronale observée dans les maladies neurodégénératives incluant la MA.

Une troisième hypothèse voudrait que les protéines Tau solubles provoquent une **dérégulation calcique**. Des preuves obtenues d'une étude réalisée par imagerie multiphotonique *in vivo* chez la souris rTg4510 suggèrent effectivement cela. L'intégrité membranaire est perturbée dans certains neurones causant probablement une modification de la concentration Ca^{2+} intracellulaire. Cette perturbation coïncide avec l'activation de caspases et précède la formation de DNF. De façon intéressante, la rupture membranaire et l'activation de caspases sont

rétablies une fois qu'apparaissent les DNFs ([de Calignon, Fox et al. 2010](#)). Ces données suggèrent donc que les formes solubles Tau sont impliquées dans la perméabilisation des membranes plasmiques vis-à-vis du Ca^{2+} causant une dérégulation de l'homéostasie calcique. Puisque la physiologie neuronale requiert une régulation fine de Ca^{2+} , sa dérégulation a des effets majeurs sur le transport, la signalisation cellulaire, la fonction mitochondriale, l'activité synaptique et même l'induction de l'apoptose (**Figure 24**).

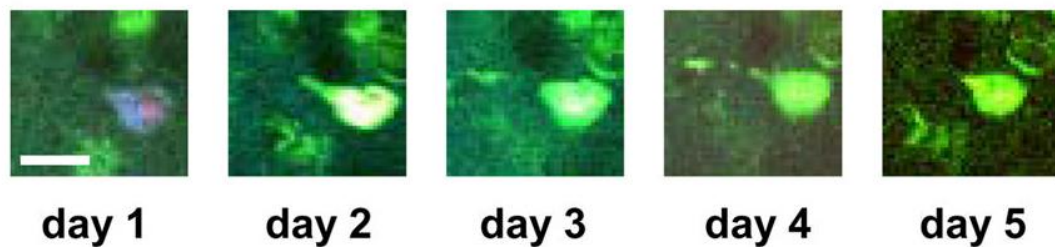


Figure 24 : L'activation des caspases pro-apoptotiques précède la DNF

Suivi in vivo d'un neurone de modèle murin de tauopathie (rTg4510) illustrant l'activation de caspases pro-apoptotiques suivie de l'apparition de DNF ([de Calignon, Fox et al. 2010](#)). Un neurone est suivi pendant 5 jours grâce à de l'imagerie multi-photonique in vivo. Les caspases sont immunomarquées en rouge. Les DNFs sont visualisées grâce au marquage thioflavine-S (vert).

Enfin, plusieurs études se sont intéressées à l'effet de Tau oligomérisée sur l'état de la microglie ([Polanco, Li et al. 2018](#)). **L'activation microgliale semble être observée avant l'apparition de DNF** dans plusieurs souris Tau transgéniques. Dans l'une d'entre elles, l'invalidation du gène CX_3CR_1 (CX3C chemokine receptor 1), connu comme le récepteur à la fractalkine ou le récepteur 13 couplé à la protéine-G, a permis de démontrer que les cellules microgliales réactives conduisent la pathologie Tau en contribuant à la diffusion des oligomères de Tau ([Maphis, Xu et al. 2015](#)). L'hyperphosphorylation de Tau soluble induit la dégénérescence de la microglie dans une lignée de souris transgénique. Cependant, la façon exacte dont les cellules microgliales répondent aux protéines Tau toxiques reste à découvrir.

Propagation des oligomères solubles Tau ([Mudher, Colin et al. 2017](#)). Plusieurs études suggèrent que les espèces solubles de Tau peuvent être transmises entre neurones et vont dans le sens de l'hypothèse des « prion-like ». Ces idées expliqueraient ainsi comment la pathologie Tau peut se propager aussi facilement dans de nombreuses régions cérébrales de patients atteints de MA ([Clavaquera, Bolmont et al. 2009](#), [de Calignon, Polydoro et al. 2012](#)).

Les mécanismes médiant la diffusion de Tau sont encore mal connus. En condition physiologique, de nombreuses voies cellulaires pourraient être impliquées. Alors que la sécrétion des protéines Tau se fait de façon libre à 90 %, des vésicules comme les **exosomes** ou les

ectosomes peuvent également intervenir dans ce transport intracellulaire (**Figure 25**). Les protéines Tau sont majoritairement sécrétées sous leurs formes monomériques et/ou tronquées et non-phosphorylées, posant la question du rôle de ces **sécrétions** dans les conditions pathologiques (MA en particulier). Un début de réponse a été apporté par une étude de culture neuronale surexprimant Tau muté. Les auteurs identifient des exosomes contenant des protéines Tau oligomérisées et capables, une fois localisés dans la cellule réceptrice, d'« **ensemencer** » l'agrégation de Tau ([Wang, Balaji et al. 2017](#)). En parallèle, des exosomes contenant des protéines Tau à activité d'ensemencement ont été isolés de cerveaux de souris Tau transgéniques renforçant l'idée d'une propagation de Tau par l'intermédiaire des exosomes. D'autres mécanismes ne requièrent pas de sécrétion, mais une connexion directe entre le cytoplasme de la cellule donneuse et de la cellule réceptrice. Les structures responsables sont appelées **nanotubes** et ont été identifiées dans divers type de cellules dont les neurones et les cellules immunitaires. Ces nanotubes permettent le transport de protéines Tau fibrillaires.

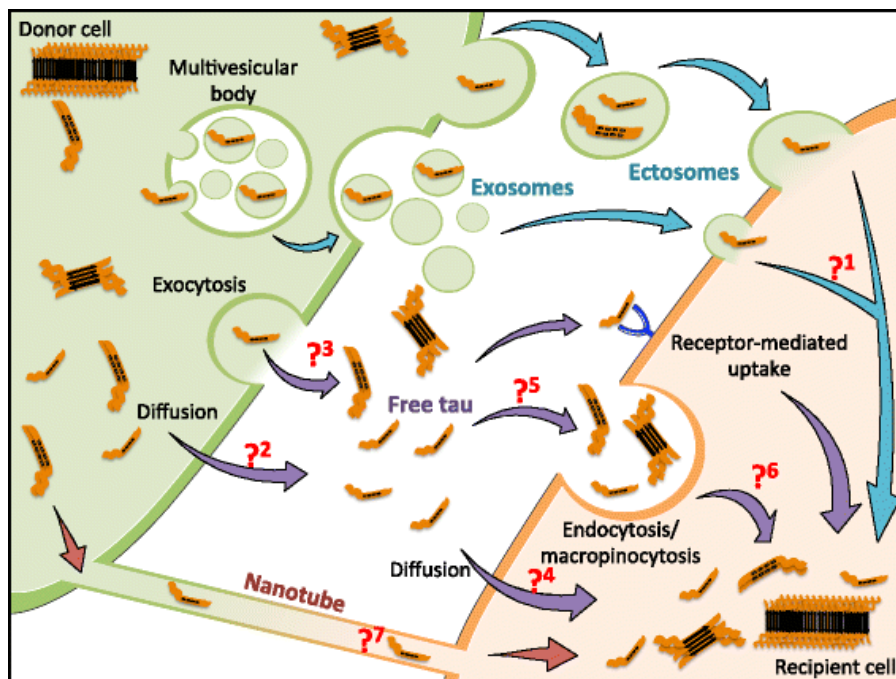


Figure 25 : Transfert trans-cellulaire de Tau: mécanismes potentiels.

Tau peut être transféré d'une cellule donneuse (vert) à une cellule réceptrice (orange). Cette figure illustre les hypothèses en lien à ce transport. Deux mécanismes principaux : sécrétion de Tau libre ou transport par l'intermédiaire de nanotubes sont développés. En particulier, la sécrétion de Tau libre majoritaire (90 %) se voit effectuée par des mécanismes d'exocytose, endocytose, micropinocytose. L'implication de vésicules comme les endosomes, ectosomes ou endosomes est importante ([Mudher, Colin et al. 2017](#)).

La réception de protéines Tau pourrait voir intervenir des protéines comme la HSPG ou l'APP, agissant comme des récepteurs liant Tau et induisant son endocytose ou macropinocytose. Ces mécanismes restent encore très peu étudiés.

Enfin, certains gènes identifiés dans les GWAS comme facteurs de risque pour la MA sont potentiellement impliqués dans la propagation de Tau. Ainsi, *APOE4*, le facteur de risque majeur aggrave la neurodégénérescence médiée par Tau. *BIN1*, connu également d'après les GWAS, est un régulateur négatif de l'endocytose médiée par la clathrine et module la toxicité de Tau. Alors que le niveau de BIN1 neuronal est réduit dans le cerveau de patients avec la MA et il est connu que la diminution de BIN1 dans des cultures neuronales augmente la propagation de la pathologie Tau.

4. L'hypothèse de la cascade amyloïde actuelle et revisitée

Nous l'avons abordé succinctement tout au long de cette partie, l'hypothèse de la cascade amyloïde décrite en 1996 par John Hardy, est aujourd'hui sujette à de nombreuses reconsidérations.

De vives discussions se sont particulièrement focalisées sur la part de la composante amyloïde dans la pathogenèse de la MA. Une vision, différente de celle de John Hardy, est développée par Karl Herrup dans une perspective intitulée « *The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis* » ([Herrup 2015](#)). Dans cette revue, Herrup évoque la peur exprimée par la communauté scientifique à rejeter cette hypothèse puisqu'il faudrait passer d'une hypothèse simple à une hypothèse complexe. Pour lui, alors que la biologie de la MA est certainement bien plus complexe que celle de toutes autres pathologies touchant le système nerveux central, elle ne peut pas être expliquée par une hypothèse simple reposant sur un événement unique. Ainsi, la MA ne peut être vue uniquement comme une maladie de l'amyloïde ou comme une tauopathie. Elle peut également être causée par une perte de l'homéostasie calcique ou par l'exacerbation de la neuroinflammation conduite par les cellules astrocytaires et microgliales. D'autres arguments sont en faveur d'un défaut de l'autophagie ou de la fonction lysosomale, de la perturbation du cycle cellulaire des neurones, de l'apparition progressive de dommages oxydatifs ou encore d'une perte de la fonction mitochondriale. En résumé, **Herrup soutient l'idée que l'amyloïde intervient fréquemment dans la pathogenèse de la MA mais qu'elle n'est ni nécessaire, ni suffisante.**

Ce qu'avance Herrup est bien sûr recevable mais, il me semble, peut-être trop clivant et quelque fois contestable tant il restreint la pathologie amyloïde aux plaques séniles. Pour preuve, il avance deux arguments centrés sur ces plaques séniles : (i) des plaques amyloïdes sont

retrouvées chez des personnes cognitivement saines et (ii) les essais cliniques ayant pour but de supprimer la charge amyloïde se sont révélés être des échecs.

Comme décrit dans cette partie, le rôle toxique des plaques amyloïdes dans la MA est maintenant largement remis en question. L'accumulation de données obtenues ces dernières années révèle en effet que les oligomères d'A β intracellulaires (A β ₁₋₄₂ surtout) sont bien plus toxiques que la forme extracellulaire agrégée (voir Chapitre I, IV, 2 ; ([Tomiyama, Matsuyama et al. 2010](#))). Malgré tout, Herrup souligne que **l'âge est le plus puissant et unique facteur de risque** de la MA et qu'il ne prend pas assez de place dans l'hypothèse de la cascade amyloïde. **Cette notion est particulièrement intéressante et vraie.** Elle suggère que **la cascade amyloïde ne commence pas lorsque la démence est cliniquement mesurable mais certainement 20 à 30 ans plus tôt**, ce que développe également David Holtzman par exemple. Dès cette période de vie, l'A β intracellulaire exercerait sa toxicité de façon subtile à l'intérieur du cerveau de futur patients atteints de MA.

Un deuxième point de divergence s'explique sur l'importance de la pathologie Tau dans la MA. La question de savoir quelle composante déclenche l'autre est maintenant relativement claire. De nombreuses preuves expérimentales suggèrent que l'A β intervient en amont de Tau. Ainsi, l'injection d'A β ou des mutations de l'*APP* conduisant aux formes familiales de la MA, chez des souris transgéniques Tau favorise la formation de DNF ([Gotz, Chen et al. 2001](#), [Lewis, Dickson et al. 2001](#)). La pathologie Tau n'est cependant pas un épiphénomène de la pathologie A β . En effet, Tau semble être requis pour que l'A β soit toxique *in vivo* puisque l'inactivation du gène *MAPT* (codant la protéine Tau) chez des souris exprimant les mutations de l'*APP* et de la PS1 « protège » ces dernières de déficits cognitifs ([Roberson, Scearce-Levie et al. 2007](#)). Ses données suggèrent que l'A β n'est probablement pas la plus toxique, en particulier, elle ne serait pas responsable de la mort cellulaire au contraire de la pathologie médiée par Tau. Cette idée est soutenue par Small et Duff, qui en plus, considèrent que la MA serait divisée en deux phases : l'une dépendante de l'A β , l'autre dépendante de Tau ([Small and Duff 2008](#)).

En conclusion, l'hypothèse de 1996 (Dépôt d'amyloïde- β \rightarrow phosphorylation de Tau et formation de DNFs \rightarrow mort neuronale) et l'hypothèse reformulée récemment diffèrent sur plusieurs points ([Selkoe and Hardy 2016](#)). Alors que de nombreux facteurs contribuent à la pathogénicité de la MA, l'A β dans sa forme soluble et la perturbation de son homéostasie est l'élément central. Son agrégation produisant les plaques séniles n'est maintenant plus considérée comme nécessaire comme le soutenait Hardy en 1996. (**Figure 26**).

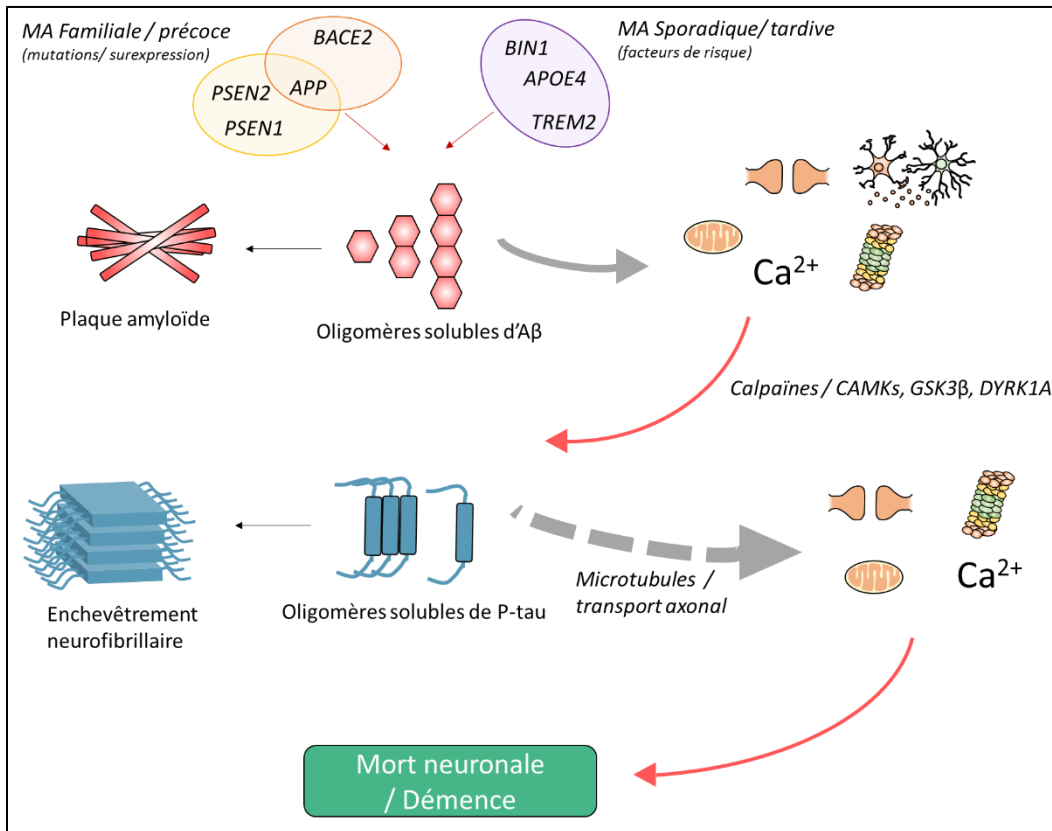


Figure 26 : L'hypothèse de la cascade amyloïde actuelle

(adapté de ([Herrup 2015](#), [Selkoe and Hardy 2016](#))). La dégénérescence neuronale observée lors du stade de démence chez les patients atteints de MA est le résultat de nombreux événements défectueux. Dans cette hypothèse réactualisée, l'élément central est le peptide Aβ (en particulier Aβ₁₋₄₂) dont l'accumulation est produite soit par la mutation ou la surexpression (cas de la trisomie 21) de gènes impliqués dans son métabolisme (APP, PSEN1 et 2, BACE2). Ces gènes sont alors retrouvés dans la forme familiale de MA. L'accumulation de peptide Aβ peut être dépendante de l'âge (progressive) et favorisée par la présence de facteur de risque (APOE4, BIN1, CD33) comme on la rencontre dans la majorité des cas (forme sporadique de MA). Ces facteurs de risque n'interviennent très probablement pas uniquement à ce stade de la maladie. En tout état de cause, la dyshoméostasie de ce peptide conduit à son oligomérisation (forme soluble). Ces oligomères peuvent dans la minorité des cas être libérés dans le milieu extracellulaire et progressivement former des plaques amyloïdes. A l'inverse, l'Aβ est majoritairement ré-internalisé soit par les cellules gliales (astrocytes / microglie) soit par les neurones. Dans le premier cas, l'Aβ est pris en charge par ces cellules. Progressivement, on observe cependant un changement d'état, passant de cellules à fort pouvoir macropinocyttaire à des cellules à faible pouvoir macropinocyttaire mais libérant des cytokines/interleukines inflammatoires. Dans les neurones, l'Aβ perturbe **directement** mais de façon **subtile** (symbolisé par la flèche sans tiret avec une épaisseur moyenne) de nombreuses fonctions neuronales incluant : la fonction mitochondriale (en limitant l'apport énergétique et produisant des espèces réactives à l'oxygène (ROS)), la fonction synaptique (liaison aux récepteurs α7nAChR, aux NMDAr), la fonction du protéasome (recyclage de protéines) et surtout l'homéostasie calcique (activation de protéases comme la Calpaïne ou de protéines kinases comme les CAMKs dépendantes du calcium). Ces éléments vont **secondairement** augmenter le niveau de phosphorylation des protéines Tau et phosphoryler ces dernières anormalement. L'hyper-

phosphorylation de Tau a pour conséquence principale de favoriser l'oligomérisation de celle-ci. Ces formes solubles sont capables de former des enchevêtrements neurofibrillaires insolubles, composant des DNFs. L'affinité des oligomères de Tau solubles avec les microtubules n'est plus assurée réduisant significativement leurs polymérisations. En plus, le transport axonal dépendant de la kinéine et de la forme physiologique de Tau est très perturbé. Ainsi, l'oligomérisation de Tau hyperphosphorylé perturbe **indirectement** mais de façon **forte** (symbolisé par la flèche en tirets avec une épaisseur large) plusieurs fonctions neuronales incluant : la fonction du protéasome, la fonction synaptique (en limitant l'apport de néo-récepteurs à la synapse), la fonction mitochondriale (en limitant l'apport énergétique) ou encore l'homéostasie calcique (activant des protéases et caspases pro-apoptotiques). La diminution significative de neurones entraîne alors une anomalie majeure des fonctions cognitives signe clinique d'une démence.

Ce qui semble aujourd'hui le moins correspondre à la cascade amyloïde évoquée dès 1996 est le rôle pathologique des formes insolubles (plaques séniles et DNFs). Ces éléments, caractéristiques de l'expression clinique de la MA, sont la base de la recherche fondamentale, du développement de thérapies et de modèles animaux de la MA, ou encore de la sélection de patient rentrant dans les essais clinique.

Dans ce travail de thèse, nous tâcherons de prendre en compte également les éléments solubles initiant la pathologie Alzheimer.

VIII. Modélisation de la pathologie Alzheimer

L'élucidation de la physiopathologie de la MA et la longue route avant le développement de traitements ciblant cette maladie est un défi de taille qui nécessite des études approfondies. **Chez l'Homme, ces études sont souvent restreintes** par des considérations évidentes telles que pratiques et éthiques : quelques types cellulaires, comme ceux contenus dans le sang, sont disponibles mais l'accès au système nerveux central est limité aux analyses *post-mortem*. Nous l'avons vu, l'évaluation de composés chez l'Homme passe par des études cliniques très coûteuses en temps et sur le plan financier.

La modélisation de la maladie d'Alzheimer chez l'animal représente une solution alternative. En particulier, les avancées technologiques telle que la transgénèse (manipulation génétique) ainsi que la courte durée de gestation (21 jours en moyenne), le nombre d'individus par portée (6 à 10 selon le fond génétique), la courte durée de vie (aux alentours de 2 ans), la facilité d'élevage sont autant d'atouts à l'utilisation de la souris pour le développement de modèles mimant les pathologies humaines comme la MA. La question éthique au sujet de la recherche animale est évidemment présente à mon esprit lors de l'écriture de cette partie. Sans rentrer dans

trop de détails, il faut savoir que le respect de l'animal dans la recherche médicale est l'une des premières obligations pour un chercheur. **Son utilisation est ainsi strictement contrôlée** par approbation de chaque projet de recherche incluant l'animal par un comité d'éthique désigné par l'Etat. En particulier, ce travail de thèse n'a pas débuté avant l'évaluation et la validation d'un projet de recherche par le Ministère de l'Agriculture français (numéro d'autorisation : APAFIS#4449-2016031012491697). De plus, j'ai personnellement suivi et validé une formation de deux semaines à l'institut Pasteur « REGULATORY COURSE FOR PROJECT DESIGNERS (RODENTS & LAGOMORPHS) » (numéro d'approbation : I-75Institut Pasteur-F1-14) me délivrant tous les aspects éthiques et réglementaires relatifs à l'expérimentation animale en laboratoire.

Je présenterai dans cette partie, une liste de modèles animaux, utilisés classiquement en recherche fondamentale ou lors d'études précliniques. En particulier des souris transgéniques ont été développées en insérant dans leurs génomes des gènes humains retrouvés chez des patients porteurs de mutations et atteints de MA sous sa forme familiale. Bien que minoritaires, d'autres modèles ont par exemple été développés par administration de peptides A β de synthèse chez différentes espèces animales incluant la souris, le rat ou encore le primate non-humain.

Par ailleurs, je soulignerai avant-propos que : (i) au vue du nombre de modèle développé, il apparait impossible pour moi de tous les décrire, (ii) les résultats expérimentaux peuvent varier d'un laboratoire à l'autre expliquant de possible différences entre ce qui est énoncé ici et ce qui avancé dans certaines études (iii) et que chacun des modèles utilisés est évidemment critiquable et par définition imparfait. Avant toutes conclusions hâtives de nos résultats expérimentaux, la bonne connaissance de notre modèle expérimental doit primer.

Enfin, je finirai cette partie par décrire un modèle basé sur le transfert de gènes chez la souris et développé tout récemment au sein de l'équipe. Il sera question ici de présenter ses avantages par rapport aux modèles précédemment décrits mais également ses limites.

1. Les souris transgéniques

La grande majorité des modèles souris de la MA sont référencés et régulièrement actualisés dans la base de donnée de Alzforum (www.alzforum.org/research-models). Celle-ci possède l'avantage de récapituler de manière assez simple leurs lésions histopathologiques et leurs phénotypes en fonction de leurs temps d'apparition. En complément, je me suis grandement inspiré d'une revue publié en 2008 et présentant les similarités et les différences entres les modèles transgéniques actuels et la pathologie humaine ([Duyckaerts, Potier et al. 2008](#)).

i. Modèles de souris transgéniques accumulant l'Aβ

Souris simples transgéniques pour le gène APP. Les premières stratégies de transgénèse ont consisté à cibler le gène *APP*. Dix-sept acides aminés diffèrent entre la protéine APP murine et humaine (*hAPP*) dont 3 sont localisés au sein de la séquence de l'Aβ. Alors que l'Aβ de diverses espèces est capable de s'agréger et former des plaques séniles, ces 3 acides aminés font de l'Aβ de souris (et de rat) une exception ([Jankowsky, Younkin et al. 2007](#)). Ainsi, l'obtention de ce phénotype nécessite la transfection d'*APP* humaine dans les modèles rongeurs. La première lignée de souris transgénique développant une large accumulation d'Aβ est **la souris PDAPP** qui inclut dans son génome un cDNA exprimant un *hAPP* arborant la mutation Indienne (V717F) avec les portions des introns 6-8 de l'*APP*. Ces introns permettent l'épissage alternatif des exons 7 et 8 et l'expression des trois isoformes de l'*hAPP* (695, 751 et 770). L'expression de l'*APP* est sous le contrôle du promoteur PDGF. **La souris Tg2576** surexprime l'isoforme 695 de l'*hAPP* avec une mutation Suédoise double (K670N et M671L) sous le contrôle du promoteur de la protéine à prion de hamster (Prp). **La souris APP23**, développée par Novartis Pharma., présente une surexpression de l'isoforme 751 de l'*hAPP* avec la mutation Suédoise double sous le contrôle du promoteur neuronal de souris Thy-1.2. **La lignée CRND8** est une souris développant à la fois la double mutation Suédoise et la mutation Indienne sous le contrôle du promoteur Prp. Elle développe des plaques dès 3 mois d'âge. Le niveau très élevé d'Aβ₁₋₄₂ conduisant un ratio Aβ₁₋₄₂/Aβ₁₋₄₀ élevé explique le développement rapide des lésions. Enfin, une dernière souris simple transgénique peut ici être présentée : il s'agit de **la souris ARC6 et ACR8**. La mutation Arctique (E22G) présente au niveau de l'Aβ stimule la fibrillation de l'Aβ sans modification du ratio Aβ₁₋₄₂/Aβ₁₋₄₀. Le transgène comprend l'*hAPP* incluant les mutations Arctique, Suédoise et Indienne sous contrôle du promoteur PDGF.

Ces lignées de souris développent des quantités d'Aβ plus ou moins importante qui corrélerent avec la sévérité et le début d'apparition des plaques amyloïdes et défauts comportementaux. Une réaction astrocytaire et microgliale est également retrouvée aux abords des lésions amyloïdes mais la présence de DNFs et mort neuronale n'est pas observée. En particulier, la concentration en Aβ₁₋₄₂ est lié directement à la présence de plaques amyloïdes et apparait comme nécessaire mais pas suffisant (les mutations doivent être connues comme impliquées dans les formes familiales de la MA). A noter, l'utilisation de différents promoteurs qui ciblent tous, au moins : une expression neuronale, une expression dans toutes les régions cérébrales et débutant tous entre 12,5 jours après fécondation (**expression in utero**) (Prp) et à 7 jours post-nataux (Thy-1.2).

Souris simples transgéniques PS1 ou PS2. Des gènes humains mutés ont été insérés dans le génome de souris qui développent alors une augmentation d'A β , des défauts de comportements modestes sans aucune lésion amyloïde détectable. Alors que 83 % des MA de type Familiale sont expliqués par la présence d'une mutation sur la *PS1* ou la *PS2*, les modèles de souris transgéniques surexprimant ces mutations sont curieusement très peu utilisés. Il est cependant intéressant de noter que les mutations sur *PS1* conduisent à une dérégulation calcique dans le réticulum endoplasmique, altèrent les transports axonaux rapides et induisent une hyperphosphorylation des protéines Tau ([Lazarov, Morfini et al. 2007](#)).

Souris doubles transgéniques APP et PS1 (ou BACE1). Un croisement de souris hAPP et de souris surexprimant *BACE1* a été réalisé. La souris *hBACE1* exprime un *BACE1* humain sous le contrôle du promoteur de la *CamkII* et produit de l'A β (site de clivage AA1) mais également de l'A β tronquée en N-ter (site de clivage AA11). La formation de plaques amyloïdes n'est pas observée mais des déficits mnésiques apparaissent vers 6 mois. Leur croisement avec une souris hAPP augmente la densité de dépôts amyloïdes diffus et focaux mais diminue dramatiquement la sévérité de l'angiopathie amyloïde. L'une des hypothèses voudrait que l'A β tronqué soit abondant dans le parenchyme alors que l'A β entier soit drainé hors du SNC.

Une deuxième stratégie a cherché à croiser des souris *hAPP* avec des souris *PS1*. Alors que les *PS1* ou *PS2* « wild type » (normaux) ne montre pas d'effet, les mutations humaines de la *PS1* (M146L ou M146V) permettent de produire plus d'A β et de diminuer le temps d'apparition de plaques amyloïdes chez des souris co-transfectées avec un *hAPP*. Par exemple, le croisement de la souris **Tg2576** et la souris **PS1_{M146L}** humaine permet la formation de plaques dès 6 mois (comparé à 9 mois chez des Tg2546 simple). La souris **APP_{SL}PS1_{M146L}**, a été développée par Sanofi-Aventis et exprime un *hAPP* 751 avec la double mutation suédoise sous le contrôle du promoteur *Thy1* et le gène *hPS1* mutation M146L sous le contrôle du promoteur de la réductase HMG-CoA. Cette construction provoque une large production d'A β intracellulaire visible dès 2 mois et le dépôt de plaques amyloïdes dès 3 mois. Une lignée de souris similaire incluant une mutation Knock-In de la *hPS1* (M233T/L235P) couplée à une *hAPP* suédoise (**APP_{SL}PS1_{ki}**) développe une pathologie très agressive incluant des pertes neuronales dans le secteur du CA1 de l'hippocampe. Preuve de la volonté de toujours produire plus vite et plus rapidement de l'A β , un modèle est développé en insérant des gènes *hAPP* et *hPS1* arborant jusqu'à 5 mutations retrouvées dans les FAD. Il s'agit de **la souris 5xFAD** [mutations Suédoise (K670N/M671L), Florida (I716V) et London (V717I) sur l'*hAPP*; M146L et M146V sur l'*hPS1*] développant un phénotype agressif incluant des plaques dès 8 semaines (**Figure 27**). Enfin, la délétion de l'exon 9 de la préséniline 1 augmente chez l'Homme la sécrétion de l'A β et est associée à la production

de plaques sénile larges et homogènes réagissant à moindre mesure au rouge Congo. Cette mutation, plus que d'inactiver le gène, induit un gain de fonction et est exprimée chez la souris sous le contrôle du promoteur de la protéine à prion de la souris (MoPrP.Xho) ciblant une expression neuronale et astrocytaire dans l'ensemble du cerveau. L'apparition de plaques apparaît plus précocement en couplant ces souris avec une souris *hAPP*. Ainsi, **la souris APP_{swe}/PS1_{ΔE9}** a été développée et montre des premières plaques amyloïdes à 5-6 mois particulièrement dans l'hippocampe et le cortex et un ratio Aβ₁₋₄₂/Aβ₁₋₄₀ élevé ([Jankowsky, Fadale et al. 2004](#)). Les plaques continuent à se développer jusqu'à 12 mois environ ([Garcia-Alloza, Robbins et al. 2006](#)). Une gliose se développe en parallèle débutant vers 6 mois aux abords des plaques. Entre huit et dix mois, quelques équipes observent une perte de neurones restreinte au niveau des plaques. La formation de DNFs n'est pas typique chez ces animaux.

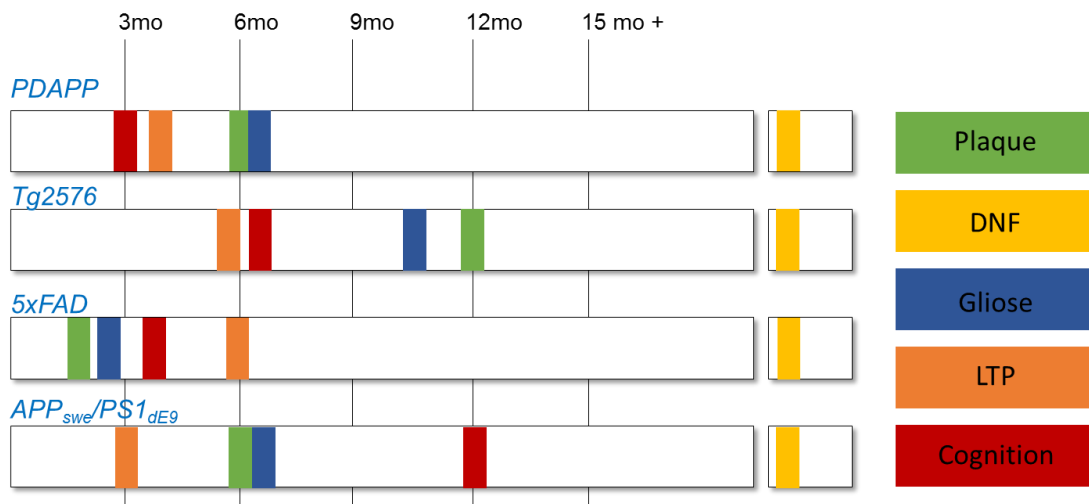


Figure 27 : Age d'apparition de phénotypes chez quelques modèles murins transgéniques ciblant l'amyloïde

Notons que l'âge d'apparition des phénotypiques diffère en fonction des lignées de souris et que ces derniers n'apparaissent pas toujours dans le même ordre. Les lésions de type DNFs ne sont pas observées chez ces souris (adapté d'Alzforum).

Les altérations observées dans ces nombreux modèles sont ainsi compatibles avec les données permettant d'expliquer le métabolisme de l'APP. D'abord clivé par la β-sécrétase (BACE1 ou 2) l'APP subit un clivage par le complexe de la γ-sécrétase pour produire l'Aβ. Une concentration élevée de ce peptide est observée par surexpression des gènes codant ces protéines. Une fois en concentration suffisante, l'Aβ est capable de s'agréger et former des plaques mais uniquement lorsque l'APP est humanisée et mutée. En plus, la voie non-amyloïdogénique est vérifiée : le croisement de souris *hAPP* arborant une mutation *London* et de souris surexprimant le gène humain wild-type codant l'ADAM10 - connu comme l'enzyme

responsable du clivage physiologique de l' α -sécrétase - suffit pour promouvoir la formation de sAPP α et prévenir l'apparition de plaques amyloïdes ([Kojiro and Fahrenholz 2005](#)).

Altérations de la MA reproduites chez les souris transgéniques accumulant l'A β .

Sur de nombreux points, les souris transgéniques de la voie amyloïde miment fidèlement la MA, expliquant pourquoi elles sont très majoritairement utilisées dans la recherche fondamentale ou préclinique.

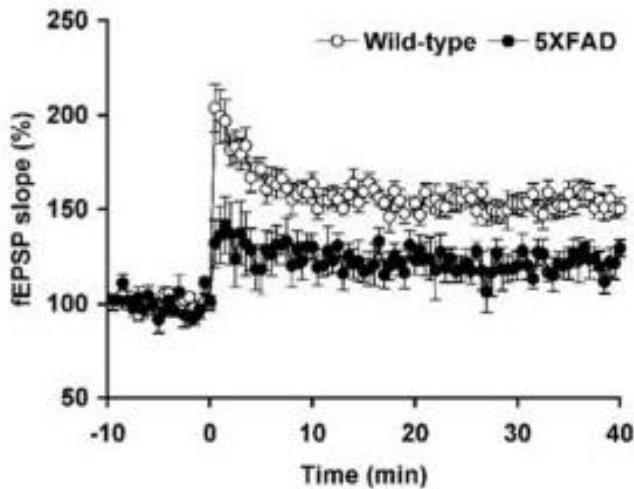
Production d'A β , de plaques amyloïdes et d'angiopathie amyloïde cérébrale (AAC). Nous l'avons listé plus haut, la production de peptides A β et de plaques séniles est retrouvée dans de nombreux modèles murins transgéniques. Globalement, la concentration d'A β augmente avec l'âge : les souris PDAPP âgées de 18 mois présentent 18 fois plus d'A β que leurs congénères âgés de 4 mois par exemple. Comme dans la MA humaine, l'apparition de plaques est d'abord observée entre les couches cellulaires suggérant que l'A β est sécrété au niveau des terminaisons neuritiques du neurone. Ces dépôts sont positifs aux colorations utilisées en clinique humaine comme le rouge Congo ou la thioflavine S et sont produits à partir de fibrilles de 9 à 11 nm de diamètre, comme chez l'Homme. Leurs formations ne sont pas une conséquence de la surexpression très importante de l'APP ou de la concentration accrue en A β . Pour preuve, certaines régions cérébrales, ne présentant pas de plaques amyloïdes, expriment un niveau d'APP plus élevé que d'autres présentant ces agrégats. L'AAC est très largement retrouvée dans des autopsies de cerveaux de patients atteints de MA. On la retrouve également chez les souris transgéniques ciblant la composante amyloïde. En particulier, elles apparaissent de façon très importante dans certaines lignées de souris (la souris APPDutch E693Q arborant l'APP 751 par exemple). L'étude de ces souris a d'ailleurs permis de souligner l'importance du ratio A β_{1-42} /A β_{1-40} quant à la distribution entre l'accumulation de plaques séniles (parenchymateuse) et l'accumulation d'AAC (vaisseaux sanguins). Associé à une forte AAC, la souris APPDutch montre une importante concentration en A β_{1-40} . Une fois co-exprimé avec la PS1 humaine muté (G384A), le ratio A β_{1-42} /A β_{1-40} augmente et l'accumulation de cette lésion diminue. Etant donné que des promoteurs neuronaux sont utilisés pour exprimer les transgènes précurseurs de l'A β , il est très probable que ces peptides prennent leur origine au niveau des neurones et s'accumulent aux contours des vaisseaux sanguins. Ce phénomène serait alors compatible avec l'idée que l'A β est drainé par le fluide interstitiel vers l'espace perivasculaire ([Weller and Nicoll 2003](#)). Finalement, l'A β est colocalisé avec l'ApoE, notamment près de vaisseaux, suggérant que le drainage du peptide peut impliquer une interaction avec l'ApoE.

Pathologies de la synapse et effets comportementaux. De nombreuses protéines sont impliquées dans la transmission synaptique. En particulier, la **synaptophysine** est considérée

comme l'une des protéines de référence intervenant dans la liaison entre les vésicules synaptiques et la membrane présynaptique. La réactivité contre la synaptophysine est diminuée dans la MA. Chez la souris, des résultats contradictoires concernant ce phénotype sont rapportés et dépendent de la lignée de souris étudiée. Malgré une forte concentration en dépôt extracellulaire d'A β , la souris APP23 ne présente pas de perte de synaptophysine. Au contraire, une diminution, dépendant de l'âge, de cette dernière est observée dans le modèle PDAPP. Ce phénotype est observé chez des souris hAPP mutée mais également wild-type. Ces souris présentent dans les deux cas une forte concentration d'A β soluble, associée à la présence ou à l'absence de dépôts amyloïde, respectivement. Ces données suggèrent donc que la diminution de la synaptophysine n'est pas dépendante de la présence en plaques amyloïdes mais est nécessairement corrélée négativement à la concentration en A β soluble. Les protéines localisées au niveau de la région post-synaptique semblent également être diminuées en fonction de l'A β soluble, nous noterons par exemple, la protéine de maintien : PSD-95 ou le récepteur ionotropique au glutamate : NMDAr.

La potentialisation à long-terme (**LTP** ou long-term potentiation), **reflète une transmission synaptique renforcée de façon persistante**. Elle est observée après une stimulation haute fréquence de neurones pré-synaptique et la mesure à long-terme de la réponse post-synaptique suite à ce renforcement. Elle est étudiée par des études électrophysiologiques généralement réalisées *ex-vivo* sur des coupes d'hippocampes, en stimulant la zone du Stratum Radiatum et en enregistrant la réponse des neurones du CA1. La LTP est considérée comme le mécanisme supportant la mémorisation et l'apprentissage et est montrée défectueuse dans de nombreuses lignées de souris transgéniques de la MA (**Figure 28**). Ce phénotype est observé avant l'apparition de plaques amyloïdes dans la lignée PDAPP suggérant que l'A β soluble est suffisant pour perturber la LTP.

Figure 28 : Mesure électrophysiologique chez un modèle murin de la MA



Défaut de LTP observé chez la souris 5xFAD (adapté de [\(Kimura and Ohno 2009\)](#)). Sur coupes de cerveau fraîchement autopsié, l'étude consiste à stimuler à une fréquence de base puis à haute fréquence (temps 0) les axones projetant sur le stratum radiatum de l'hippocampe et à enregistrer la réponse (fEPSP) des neurones du CA1 afférents la zone. La LTP est définie par une meilleure réponse à un même stimulus. Ainsi, après la stimulation haute fréquence, une stimulation à fréquence basale induit une

réponse plus élevée et maintenue dans le temps (de 0 à 40 minutes). La souris 5xFAD (arborant l'APP et la PS1 humaine à 5 mutations – cercle noir) répond plus faiblement au stimulus de base que la souris wild-type (cercle blanc) soulignant un défaut de LTP.

Le syndrome amnésique, touchant des fonctions cognitives dépendantes des régions temporales médiane du cerveau, est considéré comme un symptôme cognitif précoce de la MA. Sur cette base, des études comportementales permettant d'évaluer les fonctions mnésiques liées à l'intégrité de l'hippocampe ont été réalisées chez les souris transgéniques. Ici, je présenterai rapidement certains tests comportementaux effectués couramment et les altérations que peuvent exprimer les modèles murins de MA.

Le Y-maze ou labyrinthe en « Y » est utilisé dans un test visant à évaluer la mémoire de reconnaissance. Le stimulus est ici une place. Trois branches distinctes composent ce labyrinthe. Dans un premier temps, l'expérimentateur donne à l'animal un accès libre à deux branches du labyrinthe (phase d'acquisition). L'animal peut se repérer grâce à des indices placés autour de celui-ci. Après un délai prédéterminé, dépendant de l'espèce (souris ou rat), l'animal est replacé dans le labyrinthe en ayant accès à tous les bras (dont un nouveau). Les rongeurs ont une propension naturelle à explorer un nouvel environnement. Ici, l'animal présentera donc un biais de temps ou de distance parcourue dans le nouveau bras. Cette mémoire de reconnaissance requiert une mémoire de travail impliquant des structures comme l'hippocampe mais également le cortex frontal. Des altérations sont retrouvées dans plusieurs lignées de souris APP et double APP/PS1 avant l'apparition de plaques séniles.

La reconnaissance du nouvel objet est une tâche comportementale mesurant la mémoire de reconnaissance visuelle, sensible aux lésions de l'hippocampe mais dépendante également des cortex parahippocampiques (cortex perirhinal et entorhinal).

Dans une arène, deux objets identiques sont présentés à l'animal lors de la phase d'acquisition. Après un temps allant d'une minute à plusieurs heures, la souris est replacée dans le même environnement, avec un objet identique aux premiers (objet familier) et un objet différent des premiers (nouvel objet). Les rongeurs ont une tendance naturelle à explorer un nouvel objet. Dans le cas d'une reconnaissance efficace du nouvel objet, la souris explorera plus longtemps le nouvel objet. Des anomalies de la mémoire de reconnaissance sont observées chez des souris APP et APP/PS1.

Le test de la piscine de Morris a été développé par Richard G. Morris en 1981 comme un test comportemental mesurant l'apprentissage spatial et la mémoire spatiale à long-terme ([Morris 1981](#)). Il est l'un des tests le plus utilisé dans le domaine, simple mais relativement long à exécuter (5 à 10 jours de manipulation) ; il possède l'avantage de ne pas souffrir des interférences liées à l'olfaction des rongeurs ; il est relativement peu onéreux à mettre en place ; enfin, il est possible de différencier plusieurs fonctions cognitives. Ici, l'animal est placé dans une piscine rempli d'eau opaque et doit durant 5 jours consécutifs apprendre à localiser une plateforme immergée dans l'eau en créant une carte ou plan cérébral de l'environnement dans lequel il se trouve. En utilisant des indices visuels, l'animal retrouve la plateforme de plus en plus facilement au fil des essais. Cette première phase s'apparente à un apprentissage spatial, dépendant de l'hippocampe. A la suite de celle-ci, les animaux sont testés dans un « probe test » consistant à supprimer la plateforme et à mesurer la distance ou le temps que parcourt l'animal dans la région de la piscine où se trouvait la plateforme. Ce « probe test » est réalisé 4 heures après le dernier essai permettant de savoir si l'animal a appris la tâche. Il est également effectué plusieurs jours après le dernier test pour évaluer la mémoire spatiale à long terme de l'animal (**Figure 29**). La majorité des souris transgéniques montrent une augmentation du temps à trouver la plateforme lors de la phase d'apprentissage synonyme d'un important déficit de la fonction hippocampique, en particulier sur la capacité d'apprentissage spatiale. Elles rencontrent également des difficultés lors du probe test.

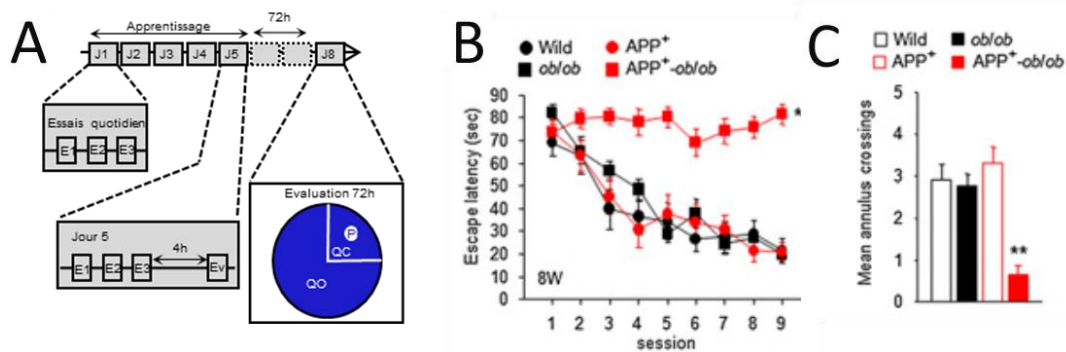


Figure 29 : Evaluation de la mémoire chez la souris par le test de la piscine de Morris

Déficits en apprentissage spatiale et en mémoire spatiale à long-terme évalués par le test de la piscine de Morris (MWM : Morris Water Maze) (adapté de ([Takeda, Sato et al. 2010](#), [Fol, Braudeau et al. 2015](#))). **A** Protocole usuel d'un test de la piscine de la piscine de Morris. L'apprentissage de la tâche se déroule pendant 5 jours à raison de 3 essais quotidiens. Le temps ou la distance pour retrouver la plateforme est moyenné chaque jour et une cinétique décroissante est obtenue au fil des jours si l'apprentissage est efficace. 4 heures après le dernier essai du jour 5, une évaluation de l'apprentissage est effectuée. Cette phase consiste à supprimer la plateforme (P) et à mesurer la distance ou le temps parcouru par l'animal dans le quadrant cible (QC) ou les quadrants opposés (QO). Au jour 8, une évaluation similaire est effectuée mesurant la mémoire à long terme de l'animal. **B** Exemple de cinétique d'apprentissage obtenue par un groupe de souris normales, de souris normales obèses (ob/ob), de souris transgéniques APP et de souris transgéniques APP obèses. Noter que le dernier groupe ne parvient pas à apprendre la tâche puisque le temps pour retrouver la plateforme ne diminue pas au fil des jours. **C** Exemple de résultat obtenu lors de la phase d'évaluation de ces mêmes souris. Noter que les souris APP obèses croisent la zone, où se trouvait la plateforme synonyme, significativement moins de fois que leurs congénères.

Le comportement général est bien moins étudié que la cognition chez ces modèles murins. Néanmoins, certaines lignées de souris transgéniques APP et/ou PS1 montrent un comportement relatif à de l'anxiété, des difficultés de coordination motrice, une réduction de la volonté/capacité d'agrippement et de l'hyperactivité.

Gliose et inflammation. La présence de cellules microgliales et astrocytaires aux alentours des plaques amyloïdes est observée chez l'Homme comme chez les souris transgéniques pour l'APP. Chez la souris, ces cellules gliales expriment un certain nombre de cytokines inflammatoires différentes. De façon intéressante, les premiers changements liés à la présence de ces molécules sont relativement précoces et arrivent avant le dépôt d'Aβ. Par exemple, ils coïncident avec l'augmentation de l'activité BACE1 dans un modèle surexprimant uniquement l'APP ([Heneka, Sastre et al. 2005](#)). La nature de ces molécules est largement discutée. Nous noterons que dans le modèle Tg2576, des cellules microgliales exprimant l'IL-1β et le TNFα et des astrocytes exprimant l'IL-6 sont retrouvés aux abords des plaques amyloïdes de façon

similaire à ce qui est observé chez l'Homme. La raison de la présence des cellules microgliales autour des dépôts amyloïdes fait débat. Pour Wegiel et al., la microglie serait responsable de la transformation des formes A β non-fibrillaires piégées dans les plaques alors que pour d'autres, ces cellules seraient comme « attirées » par l'inflammation associée aux agrégats. L'impact des cellules gliales et de l'inflammation dans la pathologie amyloïde est considérée par certains comme bénéfique ou par d'autres comme délétère. Par exemple, la charge en plaque amyloïde est réduite lorsque la souris APP/PS1 est croisée à une souris surexprimant l'IL-1 β ([Wegiel, Wang et al. 2001](#)). Au contraire, la coexpression de Cox2, une enzyme pro-inflammatoire, chez des souris APP/PS1 ne modifie pas la quantité de plaques amyloïdes mais augmente le nombre de neurones rentrant en apoptose. En conclusion, les souris transgéniques modélisant le dépôt d'amyloïdes montrent une présence de cellules microgliales et astrocytaires similaire à ce qui est observé chez l'Homme. Bien que les mécanismes impliqués mais aussi les effets de l'inflammation soient sujets à de nombreuses discussions, nous savons que l'immunothérapie anti-amyloïde, nécessitant la présence de cellules microgliales, nettoie aisément les dépôts extracellulaires d'A β . Ces données suggèrent que l'orientation de ces cellules vers un état adéquat est probablement une meilleure stratégie que de réduire complètement leur activité.

Altérations manquantes chez les souris transgéniques accumulant l'A β . Malgré plusieurs similarités entre la pathologie humaine et celle observée chez les souris transgéniques décrites précédemment, ces modèles ne répliquent pas parfaitement la MA humaine. Par exemple, le dépôt d'A β extracellulaire suit chez l'Homme un décours très stéréotypé comme le présente Thal et al. Chez la souris modèle de la MA, cette progression commence souvent d'abord dans l'hippocampe mais dépend du promoteur utilisé. Dans tous les cas, la progression observée chez l'Homme n'est pas répliquée chez l'animal. Les disparités, entre MA et modèle murins transgéniques, sont particulièrement marquées concernant **la pathologie impliquant les protéines Tau**. En effet, le postulat de l'hypothèse de la cascade amyloïde voudrait que l'accumulation d'A β intracellulaire active certaines voies cellulaires favorisant l'hyperphosphorylation, la phosphorylation anormale et le clivage de Tau, conduisant à la formation de DNFs. Or, même si une étude fait exception – il est observé un marquage discutable de neurones AT8 chez des souris Tg2576/PS1_{M146L} âgées seulement de 24 semaines ([Kurt, Davies et al. 2003](#)) – cette hypothèse n'est pas vérifiée lorsqu'elle est challengée dans les modèles de souris transgéniques *APP* et/ou *PS1*. Sans que cela soit véritablement encore bien expliqué, plusieurs hypothèses peuvent être évoquées : la protéine Tau murine serait incapable de former des DNFs ou l'A β serait produite en trop grande quantité chez ces modèles et n'activerait pas les mêmes voies biologiques impliquées dans l'induction de la voie Tau. Une autre

différence entre la pathologie humaine et celle retrouvée chez ces souris est **l'atrophie cérébrale**. Il a été décrit que la lignée de souris PDAPP exprime en effet une atrophie relativement marquée de l'hippocampe dès 3 mois mais sans progresser avec l'âge et avant l'accumulation d'A β . En parallèle, la perte neuronale chez cette lignée est très difficile à observer. En fait, l'atrophie supposée ne serait en réalité que la conséquence d'effets neurodéveloppementaux des transgènes, pouvant d'ailleurs s'amplifier selon le fond génétique de la souris hôte ([Magara, Muller et al. 1999](#)). Ainsi, si la MA est considérée comme une maladie neurodégénérative, un consensus voulant que telle ou telle composante de la maladie (composante amyloïde ou Tau) soit responsable de la mort neuronale n'est pas trouvé. Certains voulant que l'A β soit directement impliqué dans la mort neuronale se basant le plus souvent sur des études sur lignée cellulaires *in vitro* montrant la toxicité du peptide. Or, il n'est clairement pas prouvé que les mêmes résultats soient observés à l'intérieur de cerveaux humains. D'autres, incriminent directement la pathologie Tau dans la mort neuronale. Une preuve directe est la présence de « ghosts tangles » qui explique totalement ou au moins en partie l'implication de Tau dans la mort neuronale ([Braak and Braak 1991](#)). Enfin, une troisième hypothèse voudrait qu'un mécanisme encore inconnu soit responsable de ce phénotype ([Gomez-Isla, Hollister et al. 1997](#)).

En conclusion, les modèles de souris accumulant l'A β ont l'avantage de reproduire rapidement, en quantité importante les éléments composant la voie amyloïde incluant l'A β ₁₋₄₂. Ils sont ainsi d'une précieuse aide pour comprendre les mécanismes formant les plaques amyloïdes et tester des composés ciblent la phase lésionnelle de l'amyloïde dans la MA. En revanche, ces souris transgéniques modélisent une MA disproportionnée et surtout incomplète. La production de transgènes dès *in utero* est clairement un obstacle. La rapide formation de lésions amyloïdes empêche de reproduire la longue progression de la maladie sous sa forme asymptomatique en ne prenant pas en compte l'âge et les mécanismes associés au vieillissement physiologique de l'animal. Surtout, ces modèles murins sont incapables de reproduire la composante Tau, conséquence d'un stress en A β ([Pilcher 2006](#), [Souchet B. 2018](#)).

ii. Modèles de souris transgéniques développant une pathologie Tau

Des souris transgéniques ont également été développées pour étudier l'impact de mutations sur le gène *MAPT* codant la protéine Tau. Alors qu'aucune mutation sur ce gène n'a été retrouvée dans les formes familiales de MA, ces modèles sont bien plus représentatifs de la démence fronto-temporal par exemple que de la démence de type Alzheimer. Toujours est-il que ces outils permettent de mieux comprendre la progression de la tauopathie.

La physiologie de la protéine Tau est différente entre l'Homme et la souris (ou même le rat). L'épissage alternatif permet en effet chez l'Homme de produire des protéines 3R (courtes) ou 4R (longues) et dont le pouvoir de fixation aux microtubules varie en fonction de leurs longueurs. Ainsi, il est retrouvé des protéines Tau 3R et 4R dans les DNFs de sujets atteints de MA mais uniquement des protéines 3R dans les DNFs de sujets atteints de la Maladie de Pick (une démence fronto-temporal).

Le rongeur produit quant à lui uniquement les formes longues 4R, meilleures fixatrices. L'insertion de Tau 3R sous le contrôle du promoteur murin du gène codant la 3-hydroxy-méthylglutaryl CoA reductase dans le génome de la souris est associée à une immunoréactivité semblable aux enchevêtrements neurofibrillaires mais sans production de DNFs. Une autre approche a consisté à exprimer du Tau humain dans un chromosome artificiel PAC et contenant tous les exons. L'insertion de son propre promoteur permet une surexpression de celui-ci avec une expression dans les neurites et axones mais pas dans le corps cellulaire. Un croisement avec une souris Tau murin knock-out permet une expression strictement humaine mais dans ces deux cas, aucune pathologie Tau est à signaler. Il faut attendre le développement d'une souris exprimant strictement toutes les isoformes de Tau humaines associées à une augmentation des formes 3R par rapport aux formes 4R pour observer la présence de DNFs par microscopie électronique à l'âge de 9 mois ([Andorfer, Kress et al. 2003](#)) ce qui suggère que le Tau murin *wild type* prévient l'apparition de la pathologie Tau.

Souris simples transgéniques ciblant Tau. Deux lignées de souris incluant des mutations de Tau humaine P301L et V337M retrouvées dans certaines démences fronto-temporal permettent de produire chez la souris jeune des DNFs ([Gotz, Probst et al. 1995](#), [Lewis, McGowan et al. 2000](#), [Tanemura, Murayama et al. 2002](#)). **La souris JNPL3** (arborant la mutation P301L) présente de manière âge-dépendant et dosage génique-dépendant des DNFs dès 4,5 mois chez les animaux homozygotes (ou 6,5 mois pour les animaux hétérozygotes) localisées dans les régions de l'amygdale, de l'hypothalamus ou encore de la moelle épinière. Les défauts comportementaux se résument à des troubles moteurs, des perturbations de la posture et une diminution de la vocalisation. **La souris V337M** présente des agrégations de Tau dans l'hippocampe associé à une dégénérescence neuronale dans l'hippocampe. Des formes hyperphosphorylées et tronquées y sont détectées. De façon surprenante ces souris ne montrent pas de défauts liés à la mémoire à long terme dépendants de l'hippocampe mesurable par le test et de la Piscine de Morris mais un biais dans le test « elevated plus maze » mesurant la locomotion spontanée. Enfin, un modèle développé par l'équipe de Luc Buée nommé **THY-Tau22** contient dans un cDNA l'isoforme 4R humaine présentant deux mutations G272V et P301S sous le

contrôle d'un promoteur neuronal Thy1.2 ([Schindowski, Bretteville et al. 2006](#)). Le Tau exogène est surexprimé de façon âge-dépendant : 4 à 5 fois à l'âge de 3 mois et jusqu'à 6 fois à l'âge de 12 mois comparé à l'expression du Tau endogène. Ces souris montrent une large variété d'éléments pathologiques des protéines Tau incluant une hyperphosphorylation sur de multiples sites, des enchevêtrements neurofibrillaires et des DNFs apparaissant généralement de façon légère à 3 mois, modérée à 6 mois et forte à 9 mois et plus. Ces souris ne présentent aucun trouble moteur susceptible d'interagir avec les tests de comportement lié à la mémoire. Ainsi, un déficit de la mémoire spatiale sociale et contextuelle est observé vers 9 mois et coïncide avec une perturbation de la plasticité synaptique.

Les enchevêtrements neurofibrillaires et les DNFs ne sont globalement pas observés si la forme murine ou humaine wild-type de Tau est utilisée comme transgène chez la souris. La production de lésions de type DNF passe donc impérativement par l'utilisation de souris arborant des mutations de Tau humaine non-retrouvées dans la MA familiale ou sporadique.

Interactions entre Tau et l'A β chez une souris triple transgénique. L'influence de la production d'A β sur la pathologie Tau peut être étudiée de différentes façons. D'une part, le croisement de souris *hAPP* à des souris Tau-/+ ou Tau-/- améliore ou prévient totalement les défauts comportementaux des souris surexprimant l'APP humaine. La présence de Tau est donc nécessaire pour produire expérimentalement des lésions toxiques dépendantes de l'APP. D'autre part, l'injection d'A β sous sa forme fibrillaire dans le cerveau de souris JNPL3 (Tau muté P301L) induit une augmentation du nombre de DNFs. De plus, le croisement de ces mêmes souris JNPL3 aux souris Tg2576, surexprimant l'APP humaine produit des plaques amyloïdes apparaissant aux mêmes âges mais augmente significativement le nombre de DNFs dans le système limbique et le cortex olfactif suggérant une synergie entre les deux pathologies.

Le développement de souris triple transgéniques arborant des mutations sur l'APP (Suédoise et London) et sur la PS1 (M146L) en plus d'une MAPT (Tau) humaine incluant la forme 3R ne développe pas de réels DNFs. Les composants neuritiques retrouvés aux abords des plaques montrent cependant la présence de Tau humaine et hyperphosphorylée.

Une souris triple transgénique **3xTg-AD** développée par LaFerla et publiée en 2003 exprime le gène APP humain porteur d'une mutation Suédoise, le gène PS1 humain porteur de la mutation M146V, tous les deux sous contrôle du promoteur Thy1.2, et le gène MAPT humain porteur de la mutation P301L ([Oddo, Caccamo et al. 2003](#)). Dans les premiers stades, les peptides A β se concentrent dans le compartiment intracellulaire puis s'accumulent et s'agrègent dans l'espace extracellulaire (6 mois). Finalement, on observe une accumulation de Tau intracellulaire (DNFs à 12 mois). Similairement à la pathologie humaine, les deux composantes apparaissent

l'une à la suite de l'autre, dans l'isocortex et dans le système limbique. Les défauts de plasticité synaptique mesurés par LTP sont présents avant tout dépôt de plaques séniles. Des troubles mnésiques semblent être liés autant à la pathologie amyloïde qu'à la pathologie Tau puisqu'en utilisant des immunothérapies supprimant l'une ou l'autre des composantes, il est observé un rétablissement des fonctions cognitives de la souris.

Ce dernier modèle est aujourd'hui considéré comme le modèle représentant le mieux la pathologie humaine puisqu'il récapitule les deux lésions retrouvées chez les patients atteints de MA. Il semble développer une dynamique correspondant à l'hypothèse de la cascade amyloïde proposée par John Hardy et souligne l'intérêt des formes oligomériques dans le développement de déficits subtils tel que la réduction de la LTP. Malheureusement, l'utilisation de triple mutations incluant en particulier la mutation *Tau* ne correspond en rien avec la MA. Cette notion constitue donc la principale limitation de ce modèle. Une seconde notion contraire provient directement de la technologie utilisée : la transgénèse. Ainsi, les gènes humains sous contrôle de promoteurs exogènes s'expriment dès *in utero*, dans tous les neurones du cerveau et à des concentrations supra physiologiques. Les deux pathologies bien que présentes et aboutissant même aux lésions finales retrouvées chez l'Homme, ne sont clairement pas liées l'une à l'autre. Pour preuve, l'utilisation d'immunothérapie anti-A β chez ces souris réduit la formation de la pathologie amyloïde mais n'affecte pas le niveau d'agrégation des protéines Tau hyperphosphorylées ([Oddo, Billings et al. 2004](#), [Gimenez-Llort, Rivera-Hernandez et al. 2013](#)).

2. Autres modèles animaux de la MA

Pour passer outre les problèmes liés à la transgénèse, certains modèles animaux ont donc été développés en injectant directement le peptide A β_{1-42} dans le cerveau de souris wild-type adultes. Ces **modèles par injection d'A β de synthèse** possèdent plusieurs avantages. Il est possible d'injecter différentes formes de peptides A β de synthèse : A β_{1-40} ; A β_{1-42} ; A β_{1-43} ; A β_{25-35} ([Maurice, Lockhart et al. 1996](#)), différentes formes, monomériques, oligomériques (modèles *in vitro* et modèle de souris produits par SynAging), et même agrégées. Celles-ci peuvent être injectées chez des animaux adultes, d'espèces différentes et dans des zones plus ou moins précises : injections intracérébroventriculaires ou intrahippocampiques, certaines fois après chirurgie stéréotaxique. L'intérêt majeur dans ce type de modélisation, réside dans sa rapidité : une analyse peut être effectuée quelques minutes après l'injection d'A β . Evidemment, il n'est pas question ici de prendre en compte un quelconque effet du vieillissement : la durée d'action des peptides est de l'ordre de 7 jours. De plus, il faut préciser que les quantités de peptides injectés à

ces souris est de l'ordre du micromolaire, plus de mille fois plus élevé que chez l'Homme ([Selkoe 2002](#)).

Bien que moins nombreux que les modèles de souris transgéniques, **des modèles rats** développés de la même manière sont de plus en plus utilisés. Ils offrent très clairement de nombreux avantages comparés à la souris. D'abord, le rat est plus proche de l'Homme d'un point de vue génétique, morphologique et physiologique. Les tests comportementaux réalisés sur le rat sont bien plus fins, élaborés et pertinents que ceux effectués chez la souris. Le rat est bien plus gros que la souris (30 grammes pour une souris C57/Bl6 d'âge adulte contre 750 grammes pour un rat Wistar adulte). Des techniques ou analyses translationnelles réalisées en clinique humaine, comme l'imagerie IRM ou TEP ou le prélèvement de LCR, sont nettement plus simple à effectuer chez le rat. L'accès au fluide sanguin peut être obtenu tout au long de la vie de l'animal et en plus grande quantité. Sa durée de vie est plus longue que la souris, laissant plus de temps pour le développement de phénotypes liés à l'âge ([Abbott 2004](#)). Ainsi le premier rat transgénique de la MA a été publié en 2004, où l'*APP* humaine mutée (Suédoise ou Indienne) et la *PS1* humaine mutée (mutation FINN) ont été co-exprimées. Le **rat UKUR25** exprime alors le transgène dans l'hippocampe et le néocortex produisant de l'A β intra-neuronal sans aucune production de lésions amyloïdes (au moins à 24 mois). Aucun déficit comportemental ou électrophysiologique n'a été rapporté sur cet animal ([Echeverria, Ducatzenzeiler et al. 2004](#), [Lopez, Bell et al. 2004](#)). Un modèle rat **Tg6590** exprime une *APP* humaine mutée (Suédoise) sous contrôle du promoteur de l'ubiquitine C. Ce modèle présente de l'amyloïde peri-vasculaire à 15 mois suivi de plaques amyloïdes diffuses en quantité très limitée et une tendance à l'augmentation du phospho-épitope PHF-1 Tau. Dès 9 mois, un déficit d'apprentissage spatiale est observé chez ce modèle ([Folkesson, Malkiewicz et al. 2007](#), [Kloskowska, Pham et al. 2010](#)). Enfin, **le modèle rat McGill-R-Thy1-APP** a été publié en 2010. Il s'agit d'un rat Wistar présentant une *APP* humaine mutée (Suédoise) sous promoteur Thy-1. Il présente des plaques dès 13 mois ainsi que des défauts mnésiques et de la gliose périplaque. A ce titre, il est le modèle rat le plus utilisé ces dernières années ([Leon, Canneva et al. 2010](#)). Néanmoins, et de la même manière que pour les souris transgéniques, les avantages et inconvénients de la transgénèse appliquée à la modélisation de la MA, pourraient être une nouvelle fois développés ici.

Alors que les modèles rongeurs sont les plus utilisés en laboratoire, il existe d'autres espèces animales permettant de modéliser une partie des lésions propres à la MA. Le primate non-humain (PNH) est l'espèce la plus proche de l'Homme sur le plan phylogénétique. Il est particulièrement intéressant de noter que le cerveau du PNH est, à l'image de celui de l'Homme, permissif à la formation de plaques et de DNFs, au contraire des modèles rongeurs. Par exemple,

en dépit de sa durée de vie courte (8-12 ans), **le microcèbe** produit des plaques amyloïdes naturellement. Sa petite taille (70 g – 150 g) permet un élevage simplifié et en fait l'une des espèces animales les plus intéressantes dans la recherche sur la MA ([Languille, Blanc et al. 2012](#), [Roy, Cardoso et al. 2015](#)). **Un modèle macaque** (*macacus cynomolgus*) a été développé et **publié en 2014** par une équipe de Rio de Janeiro. Des injections quotidiennes sur 24 jours de 100µg d'Aβ oligomérique soluble ont été réalisées dans le cortex frontal. L'Aβ diffuse dans différentes régions cérébrales adjacentes (cortex entorhinal, gyrus denté, amygdale, striatum) et induit une phosphorylation de Tau sur certains épitopes (Ser 396). Les macaques ne développent pas de plaques amyloïdes, mais des cellules AT100 positives sont observées et associées à une activation astrocytaire (GFAP) et microgliale (IBA1). Enfin, il apparaît une diminution du niveau de protéines synaptiques (synaptophysine et PSD95) mais aucun marqueur de l'apoptose n'est observé. L'utilisation de ce type de modèle reste cependant très contraignante. D'abord par son aspect éthique, ensuite par les coûts financiers et matériels requis pour l'élevage de ces animaux ([Forny-Germano, Lyra e Silva et al. 2014](#)).

A contrario, des modèles expérimentaux *in vitro* nécessitant uniquement la culture de cellules neuronales sont développés. En particulier, des systèmes de culture microfluidique permettent d'étudier les mécanismes de propagation des pathologies amyloïdes ou Tau ([Brahic, Bousset et al. 2016](#), [Polanco, Li et al. 2018](#)). Deux chambres de culture regroupent par exemple deux populations neuronales distinctes : l'une issue de souris wild-type, l'autre issue de souris transgéniques *APP* ou *Tau*. Les deux populations peuvent se « connecter » via leurs neurites et échanger leurs peptides toxiques. Ce type d'expérience reste un moyen rentable sur le plan financier, temps et éthique dans l'étude des mécanismes cellulaires impliqués et dans le criblage large de composés pharmacologiques.

3. Un nouveau modèle propriétaire, développé par transfert de gènes

L'équipe d'accueil dans laquelle j'ai effectué ma thèse est reconnue dans l'utilisation du transfert de gènes pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ([Perdomini, Belbellaa et al. 2014](#), [Burlot, Braudeau et al. 2015](#), [Fol, Braudeau et al. 2015](#), [Alves, Churlaud et al. 2017](#)). Cette technologie a été détournée pour développer un nouveau modèle de la MA. L'idée n'étant pas de reproduire ce qui avait déjà été fait avec les souris transgéniques et les souris par injections d'Aβ mais d'utiliser les vecteurs viraux permettant une modélisation hautement flexible et de pallier aux écueils émis par la communauté scientifique contre les modèles préexistants ([Audrain, Fol et al. 2016](#)).

Des adéno-virus associés (AAV) exprimant soit le gène de l'APP humaine (mutations Suédoise et London), soit le gène de la PS1 humaine (mutation M146L) (afin de privilégier la production d'A β ₁₋₄₂) ont ainsi été injectés seuls ou co-injectés chez des souris C57BL/6J âgées de 8 semaines. L'injection virale est effectuée au moyen d'une chirurgie rapide, sous cadres stéréotaxiques, permettant de cibler le stratum lacunosum de l'hippocampe. Ces gènes sont exprimés sous le contrôle du promoteur CAG, contenus dans un AAV de sérotype 10 permettant une expression ciblée dans quelques neurones de l'hippocampe, localisés dans la couche granulaire du CA2 et dans le subiculum (**Figure 30 A**). A l'âge de 5 mois (ou 3 mois post-injection), 4 groupes d'animaux sont étudiés : les souris non-injectées, les souris injectées avec l'AAV-APP, les souris injectées avec l'AAV-PS1 et les souris injectées avec l'AAV-APP et l'AAV-PS1 (AAV-AD). Des analyses biochimiques ont permis de mesurer les métabolismes de l'amyloïde. Grâce à elles, les souris AAV-AD sont définies comme le groupe pathologique puisqu'une quantité d'A β ₁₋₄₂ et un ratio A β ₁₋₄₂/ A β ₁₋₄₀ significativement plus élevés par rapport aux trois autres groupes sont observés (**Figure 30 B et C**). Par ailleurs, la production de protéine APP humaine est compatible avec les concentrations mesurées dans l'hippocampe humain (patients atteints de la MA et personnes cognitivement saines) au contraire de celles retrouvées chez des souris transgéniques (APP_{SWE}/PS1 Δ E9) âgées de 5 mois surexprimant près de 8 fois celle-ci. Concernant, la quantité d'A β ₁₋₄₂, il est à noter qu'elle est plus élevée que celle des patients sains tout en étant inférieure à celle des patients atteints de MA à des stades très avancés dans la pathologie (Braak 6 – Thal 5). L'une des conséquences est un ratio A β ₁₋₄₂/ A β ₁₋₄₀ équivalent entre les patients MA et les souris AAV-AD et significativement différent entre ces derniers et celui des souris non injectées, des souris AAV-APP, des souris AAV-PS1, des souris transgéniques âgées de 5, 14 et 16 mois et des patients cognitivement sains (**Figure 30 D et E**). Cette production physiopathologique d'A β ₁₋₄₂ permet d'augmenter le niveau de protéine Tau phosphorylé sur l'épitope 181 (**Figure 30 F**). Fonctionnellement, alors que l'apprentissage spatial n'est pas perturbé, les souris AAV-AD développent un déficit de mémoire spatiale à long terme évaluée lors de la phase d'évaluation du test de la piscine de Morris (**Figure 30 G et H** respectivement).

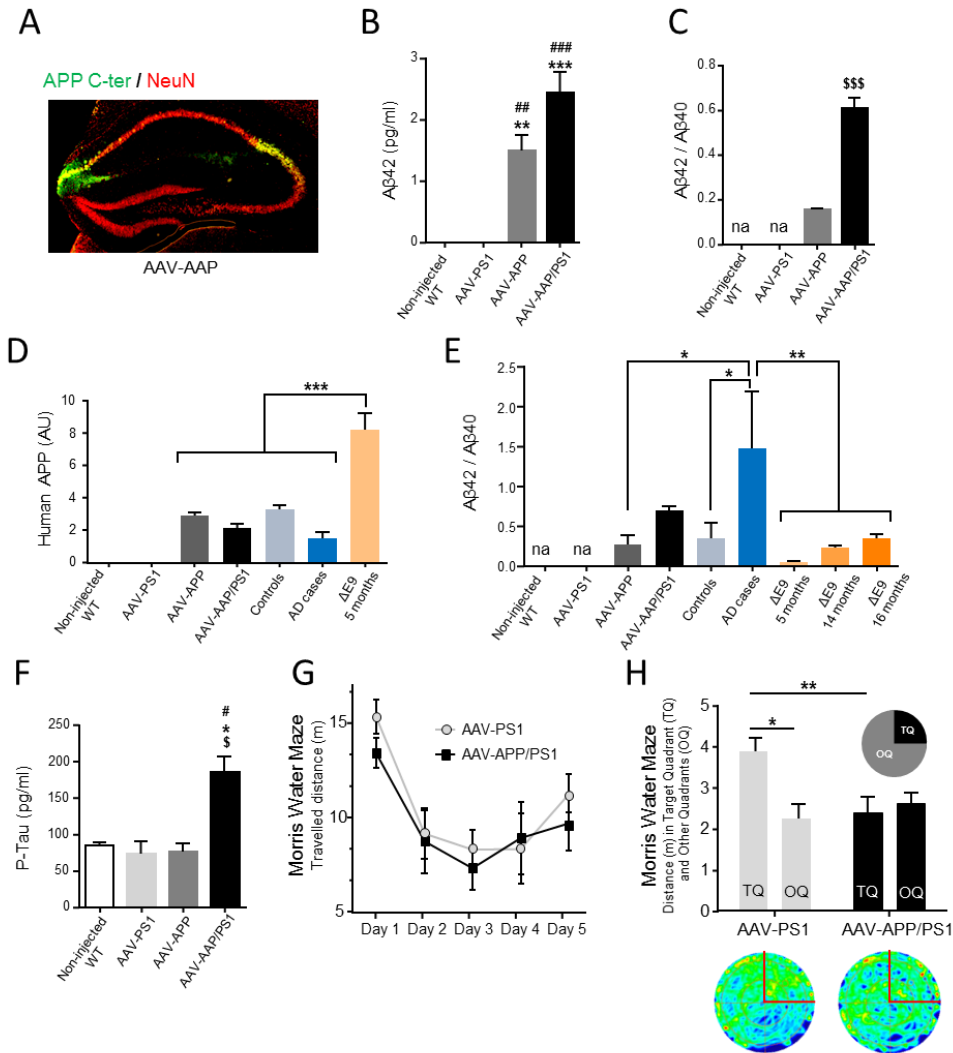


Figure 30 : Caractérisation du modèle AAV-AD développé dans l'équipe

A Immunohistochimie représentant les zones infectées par les virus AAVs : le soma de neurones est coloré en rouge, l'APP exogène (non clivé par la PS1) est colorée en vert. Les zones colorées en jaune représentent ainsi les zones infectées. Noter que l'APP exogène exprimée par les souris AAV-AD n'est pas en concentration suffisante pour être détectée. **B** Concentration en $A\beta_{1-42}$ mesurée par ELISA dans l'hippocampe de souris. **C** Ratio $A\beta_{1-42} / A\beta_{1-40}$ mesuré par ELISA dans l'hippocampe de souris AAV-AD. **D** Quantité d'APP humaine mesurée dans l'hippocampe murins AAV, transgéniques et humains (AD cases = MA). **E** Ratio $A\beta_{1-42} / A\beta_{1-40}$ évalué dans l'hippocampe murin AAV, transgénique et humain. **F** Concentration en protéines Tau phosphorylées sur la Thr 181 mesurée par ELISA dans l'hippocampe de souris AAV. **G** Courbe d'apprentissage de souris AAV-PS1 (contrôles) et AAV-APP/PS1 (AAV-AD) lors de la tâche du test de la piscine de Morris. **H** Distance parcourue dans le quadrant cible (TQ) et la moyenne des 3 autres (OQ) lors de la phase d'évaluation (72 heures post-apprentissage) du test de la piscine de Morris chez des souris AAV-PS1 (contrôles) et AAV-APP/PS1 (AAV-AD) (adapté de [Audrain, Fol et al. 2016](#))).

Avec le modèle AAV-AD, l'équipe dispose d'un système efficace permettant une production de peptides A β limitée mais suffisante pour déclencher une cascade de processus pathologiques. A la différence des souris transgéniques, cette stratégie de modélisation via transfert de gènes, est capable (i) d'activer la pathologie Tau endogène par hyperphosphorylation d'un résidu Tau et (ii) d'exprimer de façon stable dans le temps les transgènes. Leur expression est restreinte à quelques cellules de l'hippocampe et correspond à ce que publie Bushman en 2015. D'après eux, il existerait un mosaïcisme génétique du gène *APP* dans les neurones de patients atteints de MA sporadique. Ces neurones contiendraient plus de 2 copies du gène (allant parfois jusqu'à 12 copies) et produiraient de façon excessive mais limitée dans l'ensemble du tissu les peptides A β ([Bushman, Kaeser et al. 2015](#)).

Le principal écueil de ce modèle est le manque de progression de la maladie : aucune lésion caractéristique de la MA n'est observée chez les souris AAV-AD à 20 mois d'âge (18 mois post-injection). Ce modèle, de par sa progression lente, n'est évidemment pas pertinent dans l'étude des plaques amyloïdes et des DNFs caractérisant la phase clinique de la maladie chez l'Homme. Les souris transgéniques seront bien plus pertinentes sur ce point et devront être utilisées si l'on souhaite par exemple évaluer l'efficacité de traitement ciblant la phase clinique de la MA.

Pour autant, grâce justement à cette progression lente, nous disposons d'une fenêtre temporelle très large permettant une meilleure compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans le développement précoce de la MA. Avec le modèle AAV-AD, l'évaluation de traitements ciblant ces phases sera particulièrement pertinente. De plus, en analysant les conséquences biologiques de cette pathologie débutante au niveau des fluides biologiques (LCR, plasma), nous avons la possibilité d'identifier des marqueurs spécifiques des phases précoces de la MA et potentiellement utilisables comme test diagnostique. Enfin, la technologie utilisée ici par transfert de gènes est facilement transposable sur un modèle animal autre, comme le rat, présentant bien des avantages par rapport à la souris comme nous l'avons décrit plus haut ([Abbott 2004](#)).

CHAPITRE III : Les protéines kinases et la maladie d'Alzheimer

La phosphorylation de protéines est le type de modification post-traductionnelle le plus largement utilisé dans la signalisation cellulaire. Elle est effectuée par une famille de protéine appelée kinase. La famille des gènes, codants ces protéines, est la plus importante en nombre chez les cellules eucaryotes (environ 1,7% du génome humain). On rencontre ce type de réaction dans tous les processus cellulaires comme le métabolisme, la croissance, la division, la différenciation, la motilité, le trafic des organelles, le transport membranaire, la contraction musculaire, l'immunité ou encore la mémoire. Plus précisément, il a été estimé que plus de 30% des protéines cellulaires sont phosphorylées sur au moins un résidu ([Manning, Whyte et al. 2002](#)). Par conséquent, il n'est pas surprenant que la dérégulation de ces protéines kinases soit sous-jacente à de nombreuses pathologies chez l'Homme, en particulier celles du système nerveux central (SNC) et la MA.

J'évoquerai dans ce chapitre leurs fonctions biologiques, leurs régulations et les molécules permettant de les moduler, avant d'introduire la protéine kinase DYRK1A particulièrement intéressante dans notre contexte pathologique.

I. Les protéines kinases

1. Définition et classification.

i. Définition

Une protéine kinase catalyse le transfert d'un γ -phosphate, prélevé d'une molécule d'ATP (Adénosine TriPhosphate) ou plus rarement de GTP (Guanosine TriPhosphate), sur le site de phosphorylation d'une protéine réceptrice ou cible (**Figure 31**). Ce site de phosphorylation est un acide aminé contenant un groupement hydroxyl, habituellement Sérine (Ser), Thréonine (Thr) ou Tyrosine (Tyr) chez les cellules eucaryotes.

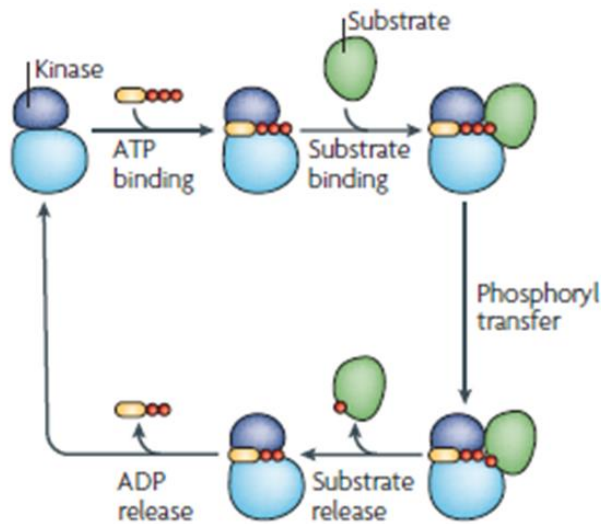


Figure 31 : Réaction de phospho-transfert par une protéine kinase.

Le cycle catalytique de la phosphorylation d'une protéine cible par une protéine kinase : En haut à gauche, l'ATP puis le substrat se lient au niveau du site actif de la kinase. Une fois cette liaison établie, le γ -phosphate de l'ATP (rouge) est transféré sur un résidu Ser, Thr ou Tyr de la protéine cible. Après la phosphorylation, la protéine réceptrice et l'ADP sont libérés du site actif de la kinase ([Ubersax and Ferrell 2007](#)).

ii. Classification

Les protéines kinases ont été identifiées par le projet « kinome humain » à partir des entrées présentes dans les bases de données génomiques et protéiques ([Manning, Whyte et al. 2002](#)). En analysant les similarités des séquences et des structures de leurs domaines catalytiques, elles ont été divisées en deux super-familles et nommées respectivement « ePKs » pour protéines kinases eucaryotes typiques et « aPKs » pour protéines kinases eucaryotes atypiques. Au nombre de 478, les ePKs représentent la grande majorité des kinases. Celles-ci présentent une forte homologie de séquence au niveau de leur domaine catalytique ([Hanks, Quinn et al. 1988](#)). Au contraire, les aPKs sont moins nombreuses en nombre (40) et ne présentent pas de similarité avec le domaine kinase des ePKs.

En fonction de leurs homologies de séquence, de leurs domaines catalytiques, de la structure de leurs régions N- et C-terminales, de leurs fonctions biologiques et de l'existence d'une classification précédemment établie chez les protéines kinases de levure, de *C.elegans* et de drosophile, les protéines kinases humaines ont d'abord été classées en 9 groupes, 134 familles et 201 sous-familles, comme présentées dans le **Tableau 1**.

Super-familles	Groupes	Origine du nom	Familles	Sous-familles	Kinases de levures	Kinases de C.elegans	Kinases de drosophile	Kinases humaines	Exemples de kinases humaines
ePK	AGC	PKA/PKG/PKC kinases group	14	21	17	30	30	63	PKB, PKA, PKC, PKG
	CAMKIIKI	Calcium/Calmodulin regulated kinases group	17	33	21	46	32	74	CAMKL, CAMKII, PDK
	CKI	Casein kinase 1 group	3	5	4	85	10	12	CKI, TTBK, VRK,
	CMGC	CDK/MAPK/GSK3/CLK kinases group	8	24	21	49	33	61	CDK5, ERK1, DYRK1A, GSK3
	STE	Yeast STE-like MAPK kinases group	3	13	14	25	18	47	MAP2K, MAP3K, MAP4K
	TK	Tyrosine kinases group	30	30	0	90	32	90	TrkA, FGFR, SRC
	TKL	Tyrosine kinases-like group	7	13	0	15	17	43	LRRK, MLK, STRK
	RGK	Receptor Guanylate Cyclase group	1	1	0	27	6	5	GCA, GC2D, GC2F
	Other	Other ePK kinases	37	39	38	67	45	83	CAMKK, PLK, AUR
aPK	Atypical	Atypical protein kinases	14	22	15	20	17	40	HistK, BCR, PDHK
Total			134	201	130	454	240	518	

Tableau 1 : Classification des kinases

En plus de l'homologie du domaine catalytique utilisée dans le projet « human kinome », la nature de l'acide aminé récepteur du γ -phosphate d'ATP constitue un second critère de classification. Trois grands groupes sont généralement évoqués :

- **Les protéines sérine/thréonine kinases (PSTKs)**. Alors que ces protéines ciblent des résidus sérine ou thréonine, elles représentent 80 % du kinome humain et sont activées par d'autres kinases situées en amont dans la cascade de signalisation via la phosphorylation de résidus sérine, thréonine ou tyrosine localisés au niveau de leur boucle d'activation ([Ubersax and Ferrell 2007](#)). Les membres de la famille des MAPKs (ERK1/2), des CAMKs (CAMKII) ou des GSK3 ne sont que des exemples les plus connus.
- **Les protéines tyrosine kinases (PTKs)**. La nature de leurs acides aminés cibles sont des tyrosines. Elles représentent 20 % des protéines kinases et sont présentes sous deux formes : **récepteurs** à activité tyrosine kinase (comme les facteurs neurotrophiques NGF ou BDNF) ou protéines tyrosines kinases **solubles**. Pouvant être cytosoliques ou nucléaires, ces dernières ont la capacité lorsqu'elles sont actives de recruter des protéines d'ancrage, des facteurs de transcription (comme par exemple STAT3) ou d'autres protéines kinases ([Hubbard and Miller 2007](#), [Pawson and Kofler 2009](#)).
- **Les protéines kinases à double spécificité (DSKs)**. Découverte dans les années 1990, ces protéines kinases ont la capacité de phosphoryler leurs cibles protéiques à la fois sur des résidus sérine/thréonine et les résidus tyrosine (double activité kinase :

sérine/thréonine et tyrosine) ([Lindberg, Quinn et al. 1992](#)). Il est à noter qu'il y a cependant de **vrais DSKs** et des **DSKs activées par phosphorylation**. Ces dernières regroupent la famille des DYRKs, dont DYRK1A pour « Dual- specificity Tyrosine (Y) phosphorylation Regulated Kinase 1A », qui une fois activées par autophosphorylation de leurs propres résidus Tyrosine situés dans leurs boucles d'activation, phosphorylent des résidus Ser/Thr (activité Ser/Thr kinase « simple ») ([Becker, Weber et al. 1998](#)).

Une classification des protéines kinases humaines, de leurs fonctions biologiques et de leurs similarités chez d'autres espèces animales peut également être retrouvée sur <http://kinase.com/web/current/> où l'ensemble du kinome humain est présenté sous la forme d'un arbre phylogénétique.

2. Structure et fonction du domaine catalytique

Le domaine catalytique d'une protéine kinase doit être capable de réaliser trois principales fonctions :

- La liaison et l'orientation du phosphate
- La liaison et l'orientation du substrat protéique
- Le transfert du phosphate terminal du donneur vers le groupement accepteur des résidus Ser, Thr ou Tyr du substrat protéique.

Si l'on excepte la super-famille des protéines kinases atypiques, très minoritaire, **toutes les protéines kinases partagent une homologie de séquence et de structure au niveau de leur domaine kinase**. Ainsi, les ePKs ont un domaine catalytique canonique d'environ 250 acides aminés, constitué d'un petit lobe N-terminal de feuillets β et d'un plus grand lobe C-terminal d'hélices α . Les deux domaines étant séparés par un fragment liant l'ensemble appelé boucle catalytique ou « linker » (**Figure 32**).

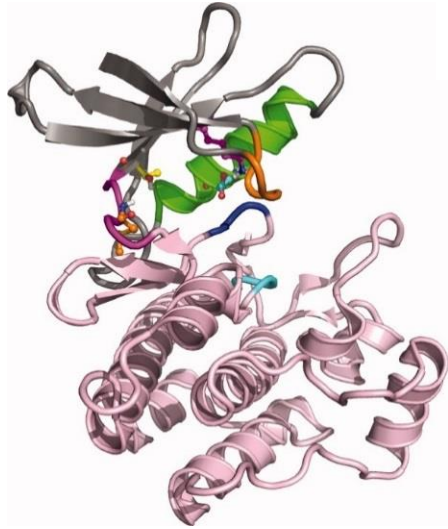


Figure 32 : Structure d'un domaine catalytique type de protéine kinase.

Exemple de la kinase 2GQG. Le petit lobe placé en N-terminal est représenté en gris et est constitué de feuillets β . Un plus grand lobe est constitué d'hélices α , représentées en rose. La région reliant les deux lobes ou « linker » est illustrée en magenta sur le côté gauche. L'hélice αC est représentée en vert alors que la boucle riche en glycine en orange. Les motifs conservés DFG (ruban bleu foncé) et HRD (ruban cyan) sont également mis en évidence. Les résidus indiqués explicitement sont le résidu donneur de la région charnière (carbones orange), le résidu du portique (carbones jaunes), la lysine catalytique (carbones magenta) et l'acide Helix C (carbones cyan)([Brooijmans, Chang et al. 2010](#)).

Le lobe N-terminal est composé de 5 feuillets- β et surtout d'une hélice- α (αC), qui, positionnée d'un côté du site catalytique d'une kinase à l'état « actif » peut se retrouver vers l'extérieur à la suite d'un mouvement latéral ou « swing motion » lorsque la kinase est « inactive ». En plus, une boucle appelée « Glycine-rich loop » ou « G-loop » assure flexibilité et dynamisme de l'ensemble. Elle couvre les β - et γ -phosphates de l'ATP. Le lobe N-terminal joue un rôle important à la fois dans la réaction de phospho-transfert et l'échange d'ATP durant le cycle catalytique.

Le lobe C-terminal est composé de plusieurs domaines (VI à XI) avec 6 hélices- α (αD à αI) en plus de 4 feuillets- β très courts ($\beta 6$ à $\beta 9$). Ce lobe est plus stable et plus rigide que le premier et forme un site d'ancrage ou « Docking site » pour les substrats protéiques. Ses hélices αD et αF d'une part et αG d'autre part, façonnent une fente permettant de se lier au substrat. A la suite de la fixation, le résidu précédant le site de phosphorylation Ser/Thr ou Tyr du substrat s'ancre au niveau d'une boucle P+1 ou « P+1 loop ». Située dans la partie C-terminale du segment d'activation de la kinase, elle prend la forme d'une poche.

Mais l'homologie de structure déjà évoquée ne se résume pas seulement à cela, on la retrouve sur plusieurs autres sites bien particulier du domaine catalytique :

- Le site de liaison au substrat. Toujours protégé par la boucle P+1, la position du site de phosphorylation du substrat est fermement ancrée dans les structures tridimensionnelles de la kinase. Des résidus de la kinase : P-2 et P-5 confortent cette liaison et restent conservés dans toutes les kinases ([Zhu, Liu et al. 2005](#)).
- Le site de liaison du donneur de phosphate. Il est contrôlé par l'hélice αF du lobe C-ter et sa structure hydrophobe est nommée épine catalytique ou « C-spine ». Présente

dans toutes les kinases elle joue sur le positionnement et l'orientation de l'ATP et contrôle la catalyse.

- L'épine régulatrice ou « R-spine ». L'épine régulatrice doit son nom au fait qu'elle traverse les deux lobes (N et C) de la protéine kinase et sa partie centrale renferme des résidus du segment d'activation et de l'hélice α C importants pour la réaction de phospho-transfert.

La boucle catalytique ou linker, regroupant les épines catalytique « C-spine » et régulatrice « R-spine », connecte les deux lobes de la kinase et stabilise sa structure en protégeant les positions de l'ATP et du substrat. Ce modèle dit « modèle en épine » nous renseigne sur l'architecture interne et les changements de conformation que doit accomplir la kinase typique pour son bon fonctionnement. Ainsi, lors du cycle catalytique, les protéines kinases passent d'une conformation active (Fermé) ou inactive (Ouvverte) (**Figure 33**).

L'alignement et l'analyse comparative des séquences primaires du domaine catalytique de plus de 60 kinases a permis de les sous diviser en 11 sous-domaines. Ces sous-domaines hautement conservés dans toutes les kinases de la famille des ePK contiennent des motifs caractéristiques et résidus conservés que nous avons déjà cités plus haut. Plus de détails sont indiqués dans le tableau ci-dessous (**Tableau 2**) ([Hanks and Quinn 1991](#)).

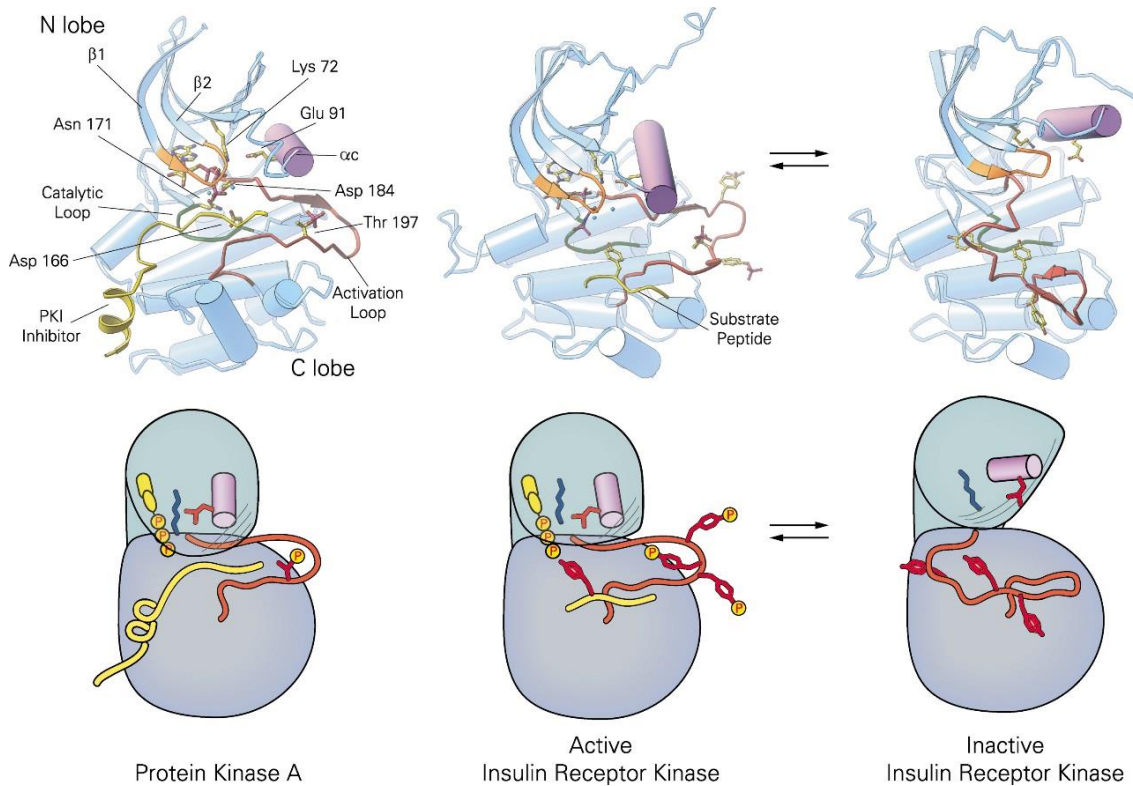


Figure 33 : Conformations du domaine catalytique d'une kinase

Conformation Active (Fermée) et Inactive (Ouvrée) du domaine catalytique d'une kinase. Exemple de la protéine sérine/thréonine kinase PKA (protéine kinase A) et de la protéine tyrosine kinase IRK (Insulin receptor kinase).

(Partie haute) Représentation de la structure cristallisée des protéines PKA ([Zheng, Trafny et al. 1993](#)) et IRK ([Hubbard 1997](#)). Les éléments structuraux clés du domaine catalytique y sont illustrés comme ceci : G-loop en rouge, l'hélice- α C en violet, le « P+1 loop » en orange et la boucle catalytique en vert. Le peptide PKI (inhibiteur de la PKA) et le substrat de l'IRK sont colorés en jaune. Les nucléotides clés et hautement conservés dans le site catalytique sont indiqués sous la forme Thr 197. L'IRK est représenté sous sa forme active ou phosphorylé : conformation fermée ainsi que sous sa forme inactive non phosphorylé : conformation ouverte. Dans ce dernier état, le segment d'activation de l'IRK adopte une conformation empêchant la liaison au substrat.

(Partie basse) Les trois structures citées dans la partie haute sont schématisées, illustrant clairement la plasticité de conformation d'une protéine kinase. En particulier, la boucle activatrice et l'hélice- α C y sont soulignées ([Huse and Kuriyan 2002](#)).

Structure 3D	Sous-Domains	Séquence consensus	Conformation	Acides aminés conservés	Rôle dans l'activité kinase
N-lobe	Sous-domaine I	Leu ⁴⁹ -Gly ⁵⁰ -X ⁵¹ -Gly ⁵² -Ser ⁵³ -Phe ⁵⁴ -Gly ⁵⁵ -X ⁵⁶ -Val ⁵⁷	2 Feuilletts β (β1 et β2)	Ser ⁵³ , Phe ⁵⁴ , Gly ⁵⁵ Leu ⁴⁹ , Val ⁵⁷	Formant des liaisons hydrogène avec l'oxygène du β-phosphate de l'ATP Participe à la formation d'une poche hydrophobe pour l'anneau adénine de l'ATP
	Sous-domaine II	Pas de séquences consensus	Feuillet β (β3)	Ala ⁷⁰ Lys ⁷²	Participe à la formation d'une poche hydrophobe pour l'anneau adénine de l'ATP * Participe à l'ancrage et l'orientation de l'ATP en formant des liaisons avec les α et β-phosphates de l'ATP * Forme des ponts "salt bridge" avec le Glu ⁹¹ du sous-domaine III
	Sous-domaine III	Pas de séquences consensus	Hélice α (αC)	Glu ⁹¹	Stabilise l'interaction entre la Lys ⁷² du sous-domaine III et les α et β-phosphates de l'ATP
	Sous-domaine IV	Pas de séquences consensus	2 Feuilletts β (β4 et β5)	Pas de résidus conservés	Ne semble pas être impliqué dans la reconnaissance du substrat et la catalyse
	Sous-domaine V	Pas de séquences consensus	2 Feuilletts β	Glu ¹²¹ , Val ¹²³ , Glu ¹²⁷ Met ¹²⁰ , Tyr ¹²² , Val ¹²³ Glu ¹²⁷	Aident à l'ancrage de l'ATP en formant des liaisons hydrogène avec l'anneau adénine ou le ribose Participent à la formation d'une poche hydrophobe pour l'anneau adénine de l'ATP Participe à la liaison du substrat en établissant une liaison ionique avec le résidu Arg dans la séquence consensus de reconnaissance du substrat
Linker					

Sous-domaine VI a	Pas de séquences consensus	Hélice α (αC)	Pas de résidus intéragissant avec le substrats ou l'ATP	Rôle non déterminé
Sous-domaine VI b	Tyr ¹⁵⁶ /His-Arg ¹⁵³ -Asp ¹⁵⁶ -Leu ¹⁵⁷ -Lys ¹⁵⁸ -X ¹⁵⁹ -Glu ¹⁷⁰ -Asn ¹⁷¹	2 Feuilletts β ($\beta 6$ et $\beta 7$)	Asp ¹⁵⁶ , Asn ¹⁷¹	* Les deux feuilletts β forment la boucle catalytique (renferme le site catalytique) * Asp ¹⁵⁶ accepte le proton (H+) du groupe hydroxyl du substrat durant le phospho-transfert
Sous-domaine VII	Triplet DFG: Asp ¹⁸⁴ -Phe ¹⁸³ -Gly ¹⁸⁶	2 Feuilletts β séparés par une boucle ($\beta 8$ et $\beta 9$)	Arg ¹⁵³ , Lys ¹⁵⁶ Glu ¹⁷⁰ Asn ¹⁷⁷ Asp ¹⁸⁴	Facilitent la réaction de phospho-transfert en neutralisant la charge négative du γ -phosphate de l'ATP * Forme une liaison hydrogène avec le ribose de l'ATP * Participe à l'encrage du substrat en formant des liaisons ioniques avec le résidu Arg dans la séquence consensus de reconnaissance du substrat * Stabilise la boucle catalytique en formant des liaisons hydrogène avec le résidu Asp ¹⁸⁶ * Joue le rôle d'un chélateur des cations Mg ²⁺ ou Mn ²⁺ liés à l'ATP * Participe à l'orientation du γ -phosphate de l'ATP lors de la réaction de phospho-transfert * Joue le rôle d'un chélateur du cations Mg ²⁺ associés à l'ATP
Sous-domaine VIII	Motifs de reconnaissance du substrat : * Pour les Tyr kinases (TKs) Pro-Ile/Val-Lys/Arg-Trp-Thr/Met-Ala-Prol-Glu * Pour les Ser/Thr kinases (STKs) Gly-Thr/Ser-X-X-Tyr/Phe-X-Ala-Prol-Glu	3 Hélices α (αD , αE et αF)	Ala ²⁰¹ , Pro ²⁰² , Glu ²⁰³ ou séquence APE Glu ²⁰³	* Indicateur de l'activité catalytique kinase * Se situe à proximité du site catalytique et joue un rôle important dans la réaction de phosphotransfert Forme des liaisons hydrogène et ioniques avec les résidus Ile et Arg de la séquence consensus du substrat * Site d'activation des kinases via la phosphorylation par d'autres kinases situées en amont ou par autophosphorylation intermoléculaire dans le cas des kinases à double spécificité
Sous-domaine IX	Pas de séquences consensus	Hélice α (αG)	Thr/Tyr située 20 aa en amont de la séquence APE	Participe à la stabilisation de la boucle d'activation en formant des liaisons hydrogène avec les résidus Arg ²¹⁵ et Tyr ²¹⁶ du sous-domaine VI b
Sous-domaine X	Pas de séquences consensus	Hélice α (αH)	Pas de résidus hautement conservés	Se lie au résidu Arg dans la séquence consensus du substrat Fonction non élucidée
Sous-domaine XI	Pas de séquences consensus	Hélice α (αI)	Arg ²³⁰	* Se prolonge jusqu'à l'extrémité C-terminale du domaine kinase * Fonction non élucidée

Clobe Core catalytique

Clobe Core catalytique

Tableau 2 : Classification détaillée du domaine catalytique des ePKS

Structure et conservation du domaine kinase dans la super-famille des ePKs. Le tableau a été réalisé à partir des résultats d'alignement des séquences de 65 protéines kinases ([Hanks and Hunter 1995](#)). Le domaine kinase est divisé en 12 sous-domaines indiqués par des chiffres romains (I,II,III,IV,V,VIA,VIB,VII,VIII,IX,X,XI) qui montrent une forte homologie entre les différentes kinases de la famille des ePKs. Le tableau présente les structures secondaires, les séquences consensus identifiées dans certains sous-domaines, les acides aminés les plus conservés ainsi que les rôles qu'ils jouent dans la conformation 3D de la kinase et dans la réaction de phospho-transfert. La position exacte des acides aminés par rapport à la séquence primaire de la kinase est indiquée en prenant la protéine kinase A (PKA) comme référence. La structure 3D d'une protéine kinase est composée de deux lobes (lobe Nterminal dit N-lobe et lobe C-terminal dit C-lobe) séparés par un fragment leur appelé « Linker » ([Kornev and Taylor 2010](#)).

3. Mécanismes de spécificité des protéines kinases

Compte tenu du nombre très conséquent de protéines à phosphoryler (30% des protéines cellulaires) et du pourcentage d'acides aminés « phosphorylables » (17%), une protéine kinase typique doit pouvoir reconnaître entre un et une de centaine résidus cibles dans un vaste « nuage » d'environ 700 000 sites de phosphorylation potentiels. La faible homologie de séquence constatée au niveau du domaine catalytique n'aide pas la kinase dans cette tâche. Pourtant, plusieurs mécanismes expliquant la spécificité subtile des protéines kinases ont été avancés. Nous évoquerons dans ce paragraphe plusieurs d'entre eux, tous issus d'une revue de 2007 ([Ubersax and Ferrell 2007](#)). Ils sont ici classés en fonction de leurs localisations au sein de la kinase.

Profondeur de la fente catalytique et spécificité entre Ser/Thr kinases et Tyr kinases.

Deux groupes de kinases sont séparés en fonction de la nature de l'acide aminé à phospho-transférer : Serine/Thréonine ou Tyrosine. Cette spécificité est expliquée par le fait que les protéines Tyr kinases possèdent une fente catalytique plus profonde que celle du second groupe. En effet, un résidu Tyrosine peut parcourir la distance entre le squelette du peptide et le γ -phosphate de l'ATP. Plus petit, les résidus Serine et Thréonine en sont alors incapables. Cependant, il est à noter que cette spécificité n'est pas absolue et il n'est pas rare que les Ser/Thr kinases phosphorylent les résidus Tyr. Le contraire étant moins vrai (**Figure 34**).

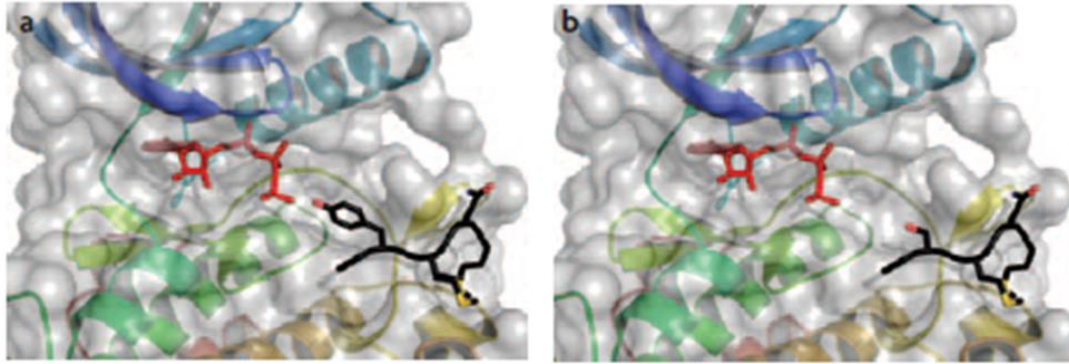


Figure 34 : Disparité de profondeur de la fente catalytique entre une Tyr et une Ser/Thr kinase

Fente catalytique d'une Tyr kinase et son interaction avec un résidu Tyrosine (a.) ou un résidu Sérine (b.). La profondeur d'une fente catalytique de Tyr kinase est plus importante que celle d'une Ser/Thr kinase. Par conséquent, un résidu Ser (b.) ou Thr sera positionné trop loin de l'ATP. Au contraire, la catalyse peut se faire avec un résidu Tyr, plus long (a.). L'ATP est représentée sous forme de bâtonnets rouges. Le peptide substrat est illustré majoritairement en noire avec une partie rouge symbolisant le groupement OH ([Ubersax and Ferrell 2007](#)).

Compatibilité en charge ionique des résidus distaux au site de phosphorylation.

Dans la plupart des cas, le site actif des kinases interagit avec 4 acides aminés du site de phosphorylation (P-site). Mais, en plus, des séquences situées en position distale du P-site peuvent également interagir avec des portions de la kinase. Cette idée provient d'analyses structurales et cinétiques démontrant que la kinase et son substrat partagent des séquences peptidiques complémentaires sur la base de leurs liaisons hydrogène ou hydrophobe. Prenons l'exemple de la PKA qui possède deux résidus Glu créant ainsi des sites de liaison anionique au niveau des P-2 et P-3 du substrat. Alors que la poche hydrophobe de la kinase privilégie un résidu hydrophobe sur la position P+1, les séquences consensus (**Figure 35**) de PKA s'intègrent parfaitement dans l'environnement local du site actif. Ceci constitue un premier niveau de spécificité aux kinases à leurs substrats respectifs.

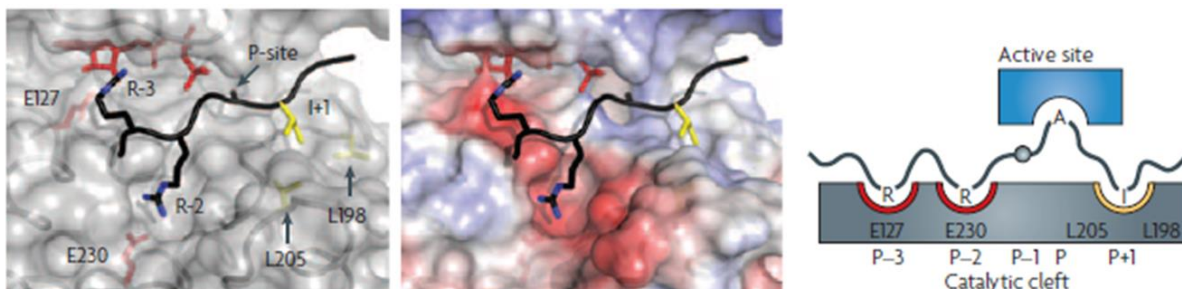


Figure 35 : Spécificité d'interactions médiée par les résidus distaux au site de phosphorylation

Interactions locales établissant la spécificité de la PKA envers son substrat peptidique. Diagramme en ruban, représentation électrostatique de surface et schéma du site de liaison au

substrat entre la PKA et un substrat de synthèse non-phosphorylable de PKI. Les résidus Arg (R) chargés positivement à P-3 et P-2 de la PKI interagissent avec les Glu¹²⁷ et Glu²³⁰ chargé négativement de la PKA. P+1 s'insère dans la poche hydrophobe formé par la Leu¹⁹⁸ et Leu²⁰⁵ de la kinase. En plus, des résidus de la PKI localisé sur le site actif (Active site) s'ajoutent pour contribuer à une liaison de haute affinité. La représentation électrostatique montre les surfaces chargées positivement en bleu, et négativement en rouge ([Ubersax and Ferrell 2007](#)).

Domaines ou motifs d'ancrage distaux. Un niveau supérieur de spécificité d'une kinase s'explique par la présence de motifs d'ancrages souvent spatialement séparés du site d'interaction entre la kinase (site actif) et du substrat (site-P). Ceux-ci sont retrouvés dans de nombreuses kinases incluant c-Jun N-terminal kinases (JNKs), phosphorylase kinase (PHK), ERK, MERK, glycogen synthase kinase-3 (GSK3) ou encore CDK2 indiquant un mécanisme plutôt général. Les motifs d'ancrages sont présents chez les Tyr kinases et les Ser/Thr kinases mais positionnés différemment d'une famille à l'autre. Chez les Tyr kinases, ils sont généralement séparés du domaine kinase (**Figure 36**) alors que les Ser/Thr kinases possèdent des motifs d'ancrages dans le domaine catalytique. Dans ce groupe, ils sont cependant moins répandus. L'un des premiers motifs d'ancrage découvert a été le « **D domain** » sur les substrats des MAPK (**Figure 36**). Typiquement situés à plus de 50 – 100 résidus du site-P, ils présentent le motif : (R/K)₁₋₂-(X)₂₋₆-Φ-X-Φ où les résidus basiques vont s'ancrer sur les aires chargées négativement (ou CD-site) sur la partie C-ter du domaine kinase. Les résidus hydrophobiques s'associent quant à eux aux groupements Φ-X-Φ au niveau des feuillets-β7 et 8 et des hélices-αD et E des MAPK. La différence dans la composition et l'espacement des résidus de ces motifs d'ancrages et la préférence du cœur catalytique pour tel ou tel acide aminé situé autour du site-P sont deux notions permettant d'augmenter la sélectivité globale de la kinase envers son substrat. Des études s'intéressant aux ERK, ont identifié un second motif d'ancrage : le « DEF domain » ou FXF motif pour F/Y-X-F/Y-P situé à 10 acides aminés du site-P et retrouvé dans d'autres domaines régulateurs des MAPK. L'un des effets annexes de ces motifs d'ancrages serait d'augmenter la concentration de substrat autour de la kinase et ainsi favoriser le phospho-transfert. Cette hypothèse suppose alors que les régions d'interactions entre les motifs d'ancrage et le site catalytique d'un côté et le site-P de l'autre (ou les deux à la fois) soient flexibles. En particulier, la plupart des interactions d'ancrage auraient un effet allostérique pouvant positivement ou négativement réguler la spécificité de la kinase. La combinatoire de tous ces mécanismes augmenterait donc significativement la spécificité des kinases plus qu'un seul mécanisme pourrait le faire à lui seul (**Figure 36**).

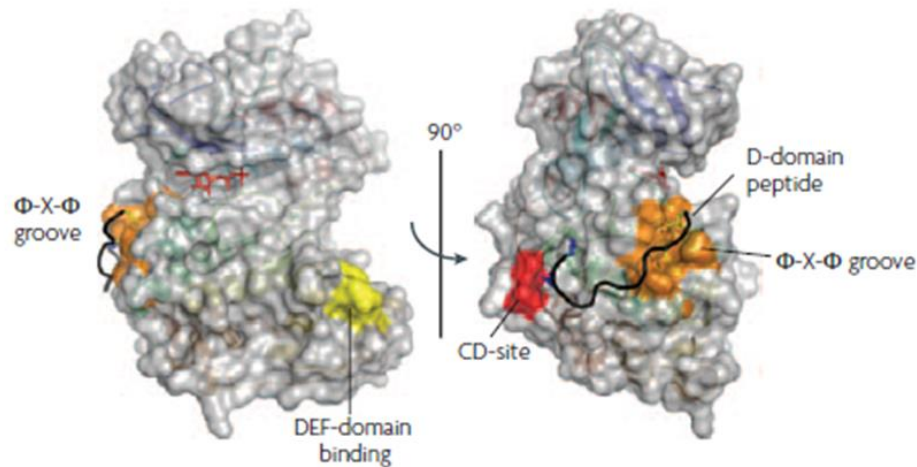
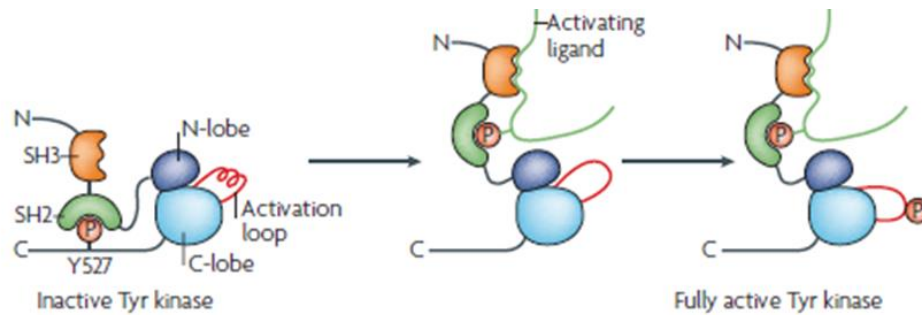


Figure 36 : Spécificité de la kinase médiée par les domaines distaux

Importance des motifs d'ancrage de la kinase dans la reconnaissance du substrat. (Partie haute) La kinase Src est inactive lorsque la boucle d'activation située entre les lobes N-terminaux (bleu foncé) et C-terminaux (bleu clair) est présente dans cette conformation. L'activation de la kinase nécessite la dé-phosphorylation d'un résidu Tyr C-terminal (Y527), ce qui permet au domaine homologie-2 (SH2) Src et / ou au domaine SH3 de se dissocier de la kinase et de s'associer à un substrat. La boucle d'activation de Src est ensuite phosphorylée sur le résidu Tyr 416 et la kinase devient complètement active. (Partie basse) Représentation de surface de la MPAK en complexe avec son substrat, en particulier le « domaine D » (bande noire). Le site chargé négativement (CD-site) sur la MAPK (aire rouge) s'associe aux résidus basiques du peptide substrat. La groupement Φ -X- Φ est montré en orange et lie les résidus LXL. La région de la kinase qui lie la séquence FXF des substrats contenant le domaine DEF est représentée en jaune. L'ATP est illustrée en une boule rouge et bâtonnets ([Ubersax and Ferrell 2007](#)).

Sites d'accueil conditionnels. Le recrutement de kinases sur des substrats qui ont été précédemment phosphorylés (ou amorcés) est un mécanisme augmentant la spécificité d'une kinase. Cet amorçage peut se produire par phosphorylation d'un résidu proche ou éloigné du site de phosphorylation en question. C'est par exemple le cas pour certains substrats de GSK3. En effet, cette kinase nécessite une phosphorylation initiale sur le résidu Ser placé en site P + 4 du substrat pour une catalyse efficace. Le motif de phosphorylation amorcé se lie à une rainure

d'ancrage de la GSK3, adjacente à la clé catalytique de la GSK3. En plus, GSK3 peut subir une phosphorylation sur un résidu Ser en N-terminal, induisant son inactivation par la protéine kinase B (PKB ou AKT). Ce résidu Ser phosphorylé se retourne en boucle et se lie au sillon d'ancrage de la GSK3 empêchant la kinase de se lier à d'autres substrats amorcés. L'amorçage d'un substrat ajoute donc un niveau de contrôle supérieur à ce qui est possible avec les interactions précédemment détaillées ou « non conditionnels ». L'amorçage rend donc la phosphorylation de la kinase d'intérêt dépendante de l'activité de la kinase d'amorçage ce qui peut aider à établir le moment idéal de la phosphorylation du substrat.

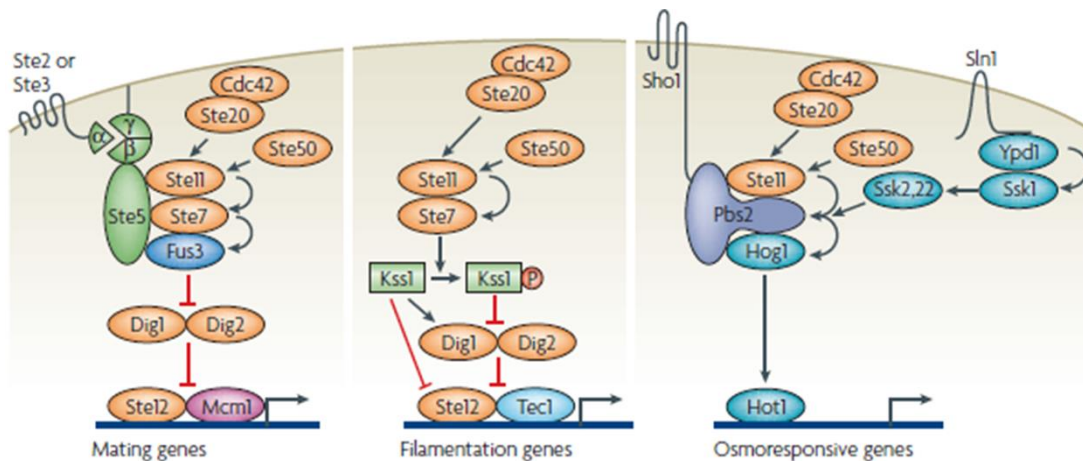
Localisation de la kinase. Un autre niveau de spécificité peut être obtenu en jouant sur la localisation subcellulaire de la kinase. Dans ce cas, elle favorise la spécificité en limitant le nombre de substrat potentiels dont la kinase peut avoir accès. Prenons l'exemple de la kinase ERK2. Cette kinase est impliquée, entre autre, dans la différenciation et la mitogenèse des cellules PC12. D'un côté l'ajout de NGF (Neural Growth Factor) conduit à la croissance neuritique via l'activation et la translocation de la kinase du cytoplasme vers le noyau. De l'autre, l'ajout d'EGF (« epidermal growth factor ») promeut la mitogenèse par l'activation d'ERK2 cytoplasmique. Ces données soulignent alors bien la dualité de fonction que peut avoir cette kinase, comme bien d'autre, selon si elle se trouve au sein de tel ou tel substrat protéique.

Protéines adaptatrices ou scaffold. En plus de l'interaction directe entre la protéine kinase et sa cible protéique, des interactions indirectes sont observées. Ici, des protéines scaffold ou adaptatrices vont pouvoir recruter la kinase et sa cible sous un seul et même complexe présenté comme de véritables plateformes. Il est à noter que l'interaction kinase-cible est alors très dynamique comparé aux mécanismes cités plus haut comme les sites d'ancrage. De plus, alors que ce dernier procédé associe généralement kinase et protéine effectrice, l'utilisation de protéines scaffold regroupe communément la kinase à d'autres kinases ou phosphatases. La spécificité de la kinase est alors très dépendante de la nature du complexe et de sa composition en protéines adaptatrices. Par exemple, de très nombreuses voies de signalisation incluant les cascades de MAPK sont dépendantes des protéines scaffold. La MAPK Ste11 (sterile-11) est impliquée dans différents processus cellulaires incluant : la reproduction, la croissance et les réponses aux variations d'osmolarité. Ce sont les protéines scaffold qui vont influencer Ste11 dans le choix de sa cible et réguler le « cross-talk » entre ces trois voies de signalisation (**Figure 37**). Les protéines scaffold peuvent associer des boucles de rétroaction positivement ou négativement liées à la kinase. En recrutant ces boucles conjuguées à l'apport des phosphatases, les protéines adaptatrices peuvent par conséquent moduler la sortie des voies de signalisation

en soudaines impulsions d'activités, mimant des réponses ultrasensibles ou de hautes fréquences.

Figure 37 : Intérêts des protéines adaptatrices dans la spécificité d'une kinase

Les protéines adaptatrices et leurs rôles dans la spécificité des protéines kinases. Exemple de la MAP kinase Ste11 chez *Saccharomyces cerevisiae* qui peut accomplir trois fonctions incluant : la reproduction, la croissance et la réponse aux variations d'osmolarité. Trois complexes comprenant des protéines adaptatrices régulent Ste11 et lui permette de sélectionner la voie de signalisation adéquat. Prenons l'exemple de la voie de l'osmolarité où deux branches d'entrée redondantes (les récepteurs Sho1 et Sln1) activent la MAPK Ste11 et la MAPK Pbs2 (polymyxin B sensitivity-2). Dans ce cas, Pbs2 agit comme une protéine scaffold et conduit à l'activation de la MAPK Hog1 (high osmolarity glycerol response-1) puis au facteur de transcription Hot1. Ssk1, suppressor of sensor kinase-1; Ssk2, suppressor of sensor kinase-2; Ssk22, suppressor of sensor kinase-22; Ste12, transcription factor that activates genes involved in mating; Ypd1, Tyr (Y)-phosphatase-dependent-1 (Ubersax and Ferrell 2007).



Effets à des niveaux systémiques. L'interaction entre la kinase et son substrat est souvent étudiée *in vitro* en purifiant la kinase et son substrat d'intérêt. Pourtant, elle est bien plus complexe dans la cellule où nombre de propriétés biochimiques diffèrent. D'abord, le substrat se retrouve accompagné d'un mélange de milliers de protéines non-ciblées. Très souvent, une kinase est capable d'agir sur plus d'un substrat dans son environnement. Chaque substrat agit alors comme un inhibiteur compétitif d'un autre. Enfin, des phosphatases s'opposent à l'action des kinases sur leurs substrats. Tout ceci conduit à un comportement complexe de catalyse pouvant être regroupés ici comme des effets de niveaux systémiques.

Les kinases utilisent différents mécanismes pour phosphoryler leurs propres substrats et ainsi activer spécifiquement les voies de signalisation sous-jacentes. Les séquences consensus du site de phosphorylation, la structure de la fente catalytique déterminant la spécificité des Tyr ou Ser/Thr kinases et les interactions locales entre la clé catalytique et le site-P du substrat contribuent à jouer ce rôle fin. Ces éléments sont tous localisés dans les lobes N-et C-terminal du domaine catalytique. En plus, les motifs d'ancrage distaux, les sites d'accueil conditionnels, les sites de localisation ou d'appariement avec des protéines scaffold et enfin les effets à des niveaux plus systémique comme par exemple la compétition affinent encore plus leurs fonctions. A contrario, ces éléments sont retrouvés dans les domaines non-catalytiques des kinases.

Nous pouvons donc imaginer que la perte des domaines non-catalytiques ait pour conséquences de réduire ou d'abolir complètement l'activité de la kinase et/ou de perturber la spécificité de la kinase concernée. Une étude s'intéressant à la GSK3 démontre justement que son domaine non catalytique C-terminal est indispensable à une activité kinase physiologique. Sa délétion conduit au « misfolding » ou mauvais repliement de celle-ci, accompagné d'une activité déficitaire et une interaction non spécifique envers un substrat ([Buescher and Phiel 2010](#)).

4. Inhibiteurs des protéines kinases

Les protéines kinases sont des cibles prometteuses dans le développement de médicaments pour de nombreuses pathologies humaines compte tenu du fait qu'elles interviennent dans un large éventail de signaux de transduction et par conséquent d'activités cellulaires. La stratégie d'inhibition des kinases a été initiée à la fin des années 1980 avec le développement d'inhibiteurs de la protéine kinase de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) ([Yaish, Gazit et al. 1988](#)). Depuis, un nombre croissant d'inhibiteurs de kinases ont vu le jour sur la base de différents profils pharmacologiques, ou fonctions structurales. Cela s'accompagne par

ailleurs d'une augmentation du nombre de publications dédiées à ce champ de recherche (**Figure 38**) ([Wu, Nielsen et al. 2016](#)).

L'approbation de l'**imatinib** (Gleevec®, Novartis) par la FDA (US Food and Drug Administration) en 2001 pour le traitement des leucémies myéloïdes chroniques n'a pas seulement validé la première thérapie ciblant une protéine kinase, mais a ouvert la voie à l'approbation de 9 autres molécules entre 2001 et 2009 lors de la « sprouting decade of SMKIs » ou la décennie de germination des petites molécules à activité inhibitrice de kinases puis de 19 autres entre 2011 et 2015 (**Figure 38**) ([Wu, Nielsen et al. 2016](#)).

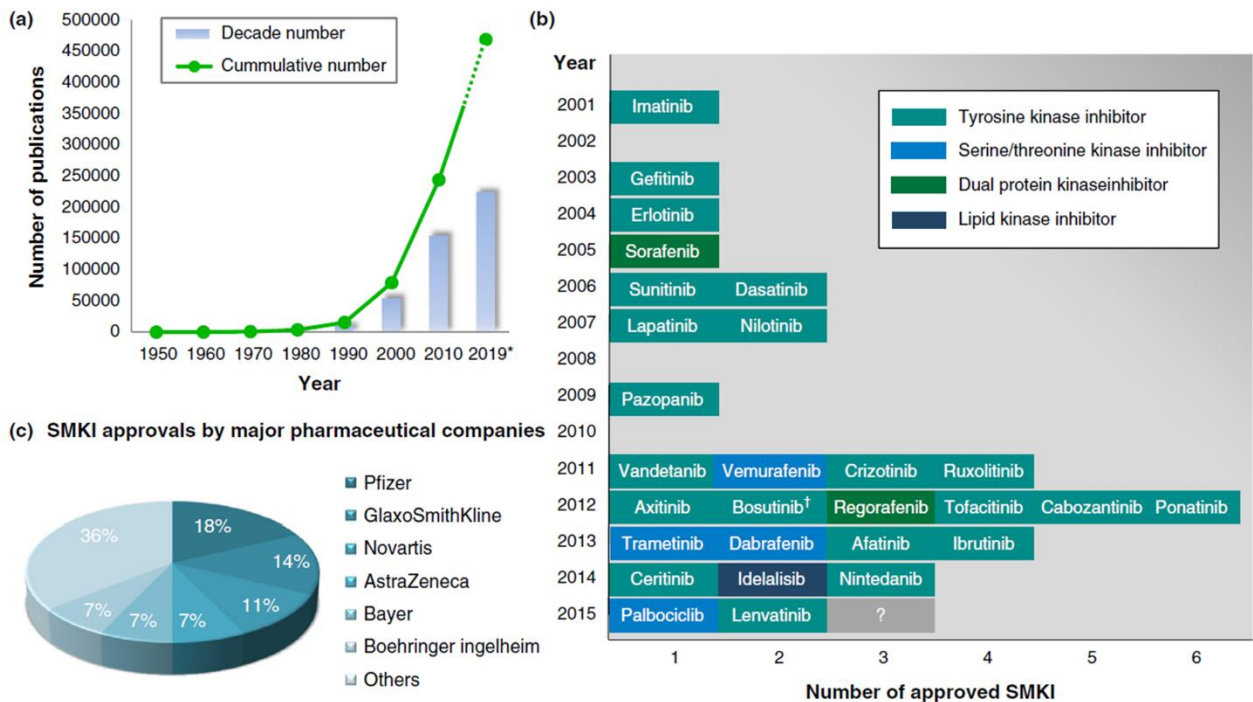


Figure 38 : Tendances et évolution dans le développement de petites molécules à activité inhibitrice de kinases ou SMKIs.

(A) Nombre cumulatif (ligne verte) and nombre par décennies de publications en lien avec les SMKIs. (B) Nombre de molécules SMKIs approuvées par la FDA entre 2001 et 2015. Elles ont été classées en fonction de la famille d'appartenance de leurs kinases cibles. (C) SMKIs approuvées en fonction de leurs compagnies pharmaceutique d'appartenance ([Wu, Nielsen et al. 2016](#)).

Parmi ces 28 molécules cliniquement approuvées, nous noterons que la plupart d'entre elles, ciblent des Tyr kinases, quelques-unes ciblent des Ser/Thr kinases ou double spécificité alors que la molécule **idelalisib** (Zydelig®, Gilead) a été approuvée en Juin 2014 pour son activité inhibitrice sur des kinases lipidique. En général, la recherche académique identifie les composés « hit » et « lead » lors de phases précoces du développement de médicament. Ici, la découverte de SMKIs ou petites molécules à activité inhibitrice de kinases est dominée par quelques compagnies

pharmaceutiques incluant Pfizer, GlaxoSmithKline, Novartis, AstraZeneca, Bayé et Boehringer Ingelheim avec plus de 64 % de l'ensemble des molécules approuvées (**Figure 38**).

Comme précédemment illustré, les protéines kinases partagent un degré de similarité important, tout particulièrement au niveau de la structure 3D de leurs domaines catalytiques. La grande majorité des molécules inhibitrices de kinase approuvées s'ancrent dans la fente catalytique formée par les lobes N et C où les molécules d'ATP se lient (**Figure 39**). Elles sont divisées en deux groupes selon leur méthode de liaison à la kinase. D'abord l'interaction inhibiteur – kinase peut être **irréversible** (**Figure 39 a**). L'inhibiteur va s'ancrer de façon covalente au résidu cystéine le plus proche du site d'ancrage de l'ATP et ainsi bloquer ce site. Ce sont les inhibiteurs de kinase à inhibition irréversible. La liaison peut également être **réversible**. Dans ce second cas, les molécules sont divisées en 4 sous-groupes selon la conformation que prennent la poche d'ancrage et la boucle activatrice après liaison de l'inhibiteur à la kinase (**Figure 39 b**).

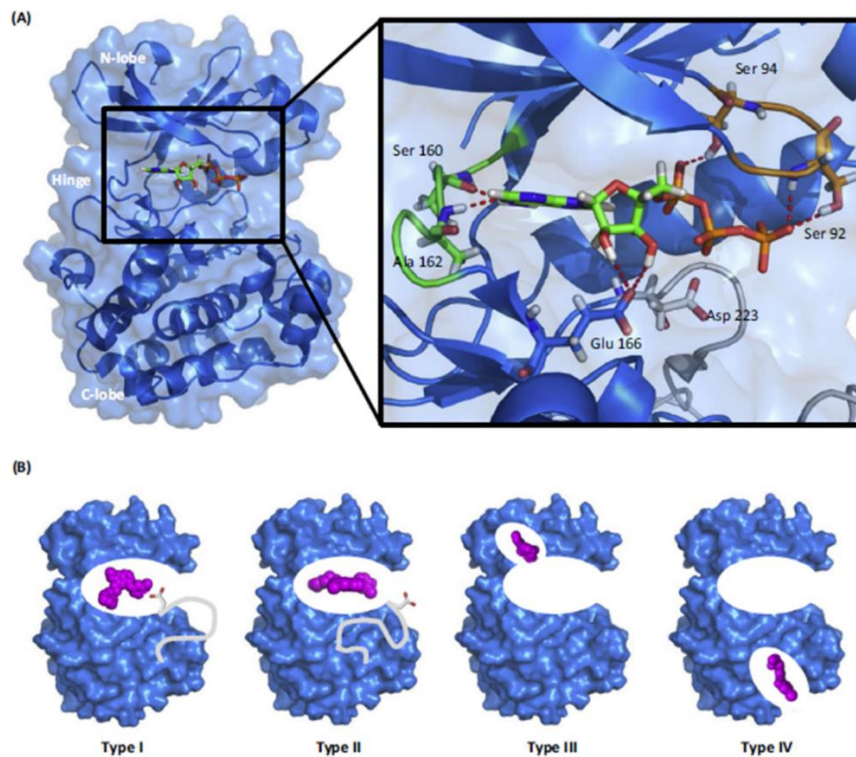


Figure 39 : Structure d'une kinase et classification des différents types d'inhibiteurs de kinases.

Structure co-cristallisée de PDK1 en interaction à l'ATP (adénine et ribose en vert et groupements phosphates en orange). L'image élargie illustre les éléments de structure autour du site de liaison de l'ATP. Les ponts d'hydrogènes sont montrés en tirets rouges, la région de liaison à l'ATP en vert, la boucle P et des résidus de la boucle P en orange-marron, le résidu aspartate de la boucle d'activation en gris. (B) Les quatre types d'inhibiteurs réversibles de kinases sont illustrés. L'inhibiteur est illustré en magenta, le résidu aspartate est représenté en

blanc. Type I : l'inhibiteur se trouve dans la poche catalytique d'une kinase active. Type II : l'inhibiteur se trouve dans la poche catalytique d'une kinase inactive. Type III : l'inhibiteur se trouve proche mais hors de la poche catalytique de la kinase. Type IV : l'inhibiteur se trouve hors de la poche catalytique de la kinase (Wu, Nielsen et al. 2016).

Les inhibiteurs de Type I exercent une inhibition compétitive à l'ATP en se liant à la kinase sous sa forme active et sur un résidu aspartate de sa boucle catalytique. Les inhibiteurs de Type II se lient à une forme inactive de la kinase. Toujours lié au résidu aspartate de la boucle activatrice qui se trouve dans ce cas éloigné du site de liaison à l'ATP. Pour les inhibiteurs de Type III, la liaison est exclusivement de type allostérique, c'est-à-dire, sans se lier directement au site de liaison de l'ATP mais de façon adjacente à celui-ci. Enfin, les inhibiteurs de Type IV exercent leurs liaisons à la kinase de façon bien plus éloigné du site de liaison à l'ATP, toujours au niveau du domaine catalytique et de façon allostérique.

Parmi les 28 inhibiteurs de kinases disponibles en clinique, 26 font partie de la classe des inhibiteurs réversibles de Type I ou Type II. Le **trametinib** (Mekinist®, Novartis) étant le seul allostérique de Type III, alors que les deux autres : **afatinib** (Gilotrif®, Boehringer Ingelheim) et **ibrutinib** (Ibruvica®, Janssen) sont des inhibiteurs de la famille des inhibiteurs irréversibles ([Wu, Nielsen et al. 2015](#), [Wu, Nielsen et al. 2016](#)).

II. DYRK1A

Parmi les 560 protéines kinases humaines connues, nous nous sommes intéressés, dans ce travail de thèse, à la kinase DYRK1A. Dans cette partie, je discuterai de son expression tissulaire, de la structure de la protéine et de ses fonctions. Bien connue pour son rôle délétère dans la trisomie 21 ou Syndrome de Down, je citerai ici quelques travaux permettant de comprendre son rôle lors du développement cérébral humain. Je préciserai son rôle à l'âge adulte en condition physiologique et surtout lors du vieillissement m'amenant à évoquer son lien potentiel avec la maladie d'Alzheimer. Enfin, le développement d'inhibiteurs de cette kinase pour contrer le développement des symptômes liés à la MA sera introduit.

1. Du gène à son expression tissulaire

Chez l'Homme les paralogues du gène *Dyrk1A* appartiennent à deux familles : les **DYRKs** « Dual-specificity Tyrosine (Y) phosphorylation regulated kinases » incluant *Dyrk1B*, *Dyrk2*, *Dyrk3* et *Dyrk4* mais également les **HIPKs** « Homoeodomain-INteracting Protein Kinase » avec *Hipk1*, *Hipk2*, *Hipk3*, *Hipk4*. Ces gènes possèdent des différences que ce soit dans leurs transcrits, leur expression tissulaire et leurs rôles dans la cellule. En particulier, le pourcentage d'homologie entre

Dyrk1A et *Dyrk1B* son plus proche paralogue est de 74% et seulement de 41 % entre *Dyrk1A* et *Dyrk2*. Alors que l'expression tissulaire de *Dyrk1A* est fortement localisée dans le SNC et plus modérément dans les muscles squelettiques et les testicules, *Dyrk1B* est retrouvée dans les muscles squelettiques, le cœur et les testicules. Enfin, *Dyrk2* s'exprime dans les testicules, le foie et le tube digestif (revues ([Becker, Weber et al. 1998](#), [Hammerle, Elizalde et al. 2003](#), [Park, Song et al. 2009](#))).

La localisation du gène *Dyrk1A* a été identifiée dans la région DCR-1 (DSCR) du chromosome 21 humain (HSA21) grâce aux techniques de cartographie physique combinant les banques de YACs, de cosmides et de phages P1 permettant de couvrir de larges régions du HSA21 ([Chumakov, Rigault et al. 1992](#), [Soeda, Hou et al. 1995](#)). Plus tard, Guimera et ses collaborateurs précisent sa localisation sur une bande chromosomique 21q22.13 (([Guimera, Casas et al. 1996](#)) ; NCBI/UniSTS). 14 exons ont d'abord été mis en évidence (exons 1 à 14) dont trois non codants (exons 1,2 et 3), puis, 5 autres exons alternatifs ont été identifiés (6a et 6b pour l'exon 6 ; 13a, 13b et 13c pour l'exon 13) ([Guimera, Casas et al. 1999](#)). Aujourd'hui, la base de données Ensembl, détaillant et précisant l'ensemble du génome humain, nous renseigne que le gène *Dyrk1A* humain, appelé *Mnbh* (ENSG00000157540) s'étend sur 148,5 kb, comporte 16 exons dont la taille varie de 10 pdb (exon 6) à 3467 psd (exon 16). Les introns varient de 136 (intron1A) à 42941 pdb (intron 1B) et 5 isoformes ont été identifiées (Iso1 : 763 aa ; Iso2 : 754 aa ; Iso3 : 584 aa ; Iso4 : 540 aa ; Iso5 : 529 aa).

L'orthologue de *Dyrk1A* chez la souris est localisé au niveau de la partie distale du chromosome 16 (MMU16) dans une région présentant une colinéarité avec la DCR-1 (Song et al., 1997), 3 isoformes ont été identifiées (Iso1 : 763 aa ; Iso2 : 754 aa ; Iso3 : 763 aa) ([Song, Chung et al. 1997](#)). Chez le rat, *Dyrk1A* se situe quant à elle sur le chromosome 11, un seul isoforme a été décrit (Iso1 : 763 aa) ([Kentrup, Becker et al. 1996](#)).

L'expression tissulaire du gène *Dyrk1A* et de ses transcrits a été analysée par l'intermédiaire de techniques comme le northern-blot, la RT-PCR ou l'hybridation *in situ* chez différentes espèces (drosophile, souris, rat, Homme, ...) à différentes périodes de développement.

Chez la souris (*mus musculus*), deux études ont identifié les transcrits alternatifs de *Dyrk1A* et analysé leur expression tissulaire au cours du développement embryonnaire jusqu'à l'âge adulte. Ainsi des analyses de northern blot, utilisant des banques d'ADNc en libre d'accès, révèlent l'expression de deux bandes de taille différentes (6,0 et 4,0 kb) chez des embryons totaux aux stades embryonnaire : E.7, E.9, E.13, E.15, et E.17. L'hybridation *in situ* démontre un motif d'expression spatiale et temporelle différent lors du développement embryonnaire avec un enrichissement du signal dans la matière grise du cerveau, la moelle épinière et la rétine ([Song,](#)

[Sternberg et al. 1996](#)) (**Figure 40**). Chez la souris adulte, les deux mêmes transcrits sont détectés par northern blot dans différentes régions incluant le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques ou les testicules alors qu'un signal important est détecté dans différentes régions du système nerveux central dont les bulbes olfactifs, le cortex, la couche de cellules pyramidale de l'hippocampe ([Guimera, Casas et al. 1996](#)).

Chez le rat (*rattus norvegicus*), deux bandes de tailles similaires à la souris ont été détectées dans différents tissus étudiés chez des rats nouveau-nés et adultes. En *post-natal*, *Dyrk1A* est retrouvé dans le cortex, l'hippocampe, la moelle épinière avec une forte expression à P41 ([Okui, Ide et al. 1999](#)). A l'âge adulte, les deux transcrits sont retrouvés dans tous les tissus analysés incluant le cerveau, le cœur, les muscles squelettiques, les testicules ([Kentrup, Becker et al. 1996](#)).

Chez l'Homme, l'analyse par northern blot nous révèle deux transcrits alternatifs de 6 et 7,5 kb. Le premier, est exprimé dans plusieurs tissus embryonnaires (cerveau, poumons, foie et reins). Ce même transcrit est exprimé à l'âge adulte de façon ubiquitaire mais plus abondante dans le cerveau, le cœur ou les muscles squelettiques ([Chen and Antonarakis 1997](#), [Guimera, Casas et al. 1999](#)) (**Figure 40**).

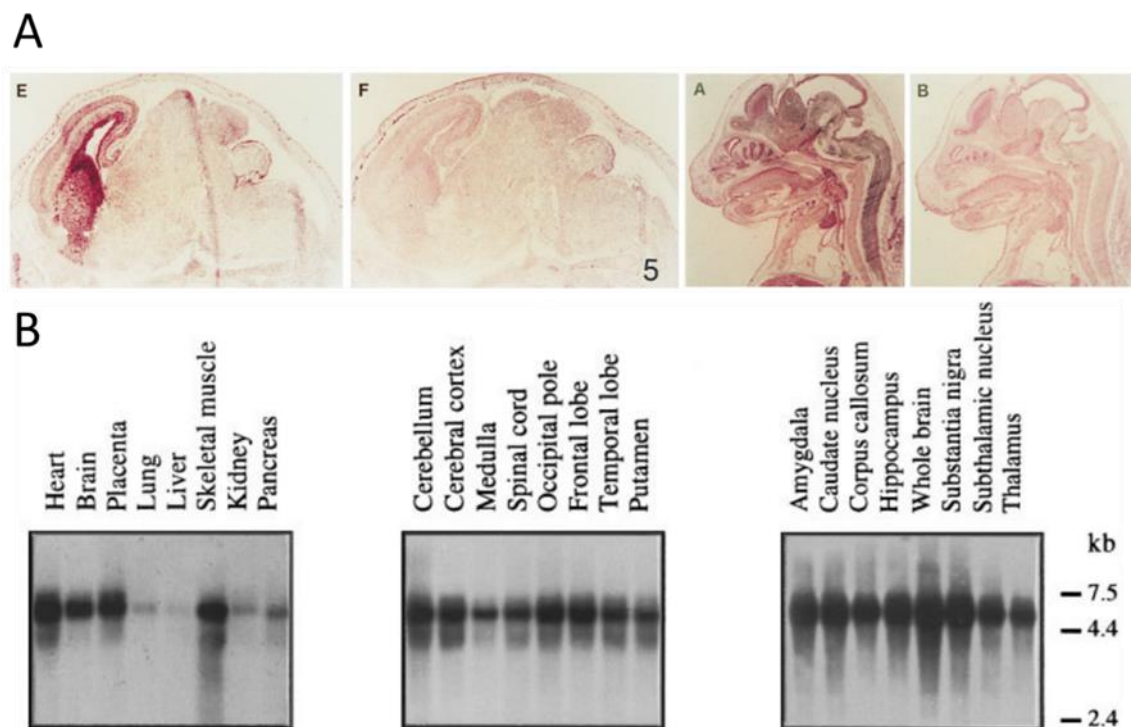


Figure 40 : Expression tissulaire de *Dyrk1A*

A Analyse par hybridation *in situ* illustrant une expression cérébrale sur un embryon de souris à P17,5 : hybridation d'amorces spécifiques de *Dyrk1A* (E) et hybridation avec amorces

anti-sens (F) et au niveau de la moelle épinière sur un embryon de souris à P15,5 : hybridation d'amorces spécifiques de Dyrk1A (A) et hybridation avec amorces anti-sens (B). B Analyse par northern-blot de l'expression de transcrits Dyrk1A dans différents tissus humains adultes.

2. La protéine DYRK1A : de la structure à la fonction

La protéine DYRK1A fait partie des DSKs ou protéines kinases à double spécificité. Elle est cependant à différencier des « vrai » DSKs, qui phosphorylent à la fois des résidus Tyr et des Ser/Thr, puisque DYRK1A va d'abord activer par autophosphorylation ses propres résidus Tyrosines pour catalyser ensuite des réactions de phospho-transferts sur des résidus Serine ou Thréonine comme une « simple » Ser/Thr kinase. Nous décrivons donc dans cette partie sa séquence primaire et ses structures spécifiques qui expliquent pourquoi DYRK1A fait partie de cette classe de protéine kinase. Surtout, nous évoquerons plusieurs études rendant compte de son potentiel rôle chez l'Homme, en fonction de son profil d'expression (âge et localisation) et de la nature des substrats qui l'entoure.

i. Séquence primaire et structure de la protéine DYRK1A

Le gène *Dyrk1A* code cinq isoformes protéiques dont la plus abondante (DYRK1A-iso1 ; EC.2.7.12.1) est longue de 763 acides aminés pour une masse molaire de 85,6 kDa. Les autres isoformes sont relativement rares dans le cerveau ([Guimera, Casas et al. 1999](#)). Nous notons d'abord que les séquences primaires des protéines DYRK1A humaine (n° accès Q13627), de souris (Q61214) et de rat (Q63470) présentent une homologie de 99% (**Figure 41**).

Ensuite, DYRK1A peut être divisée en trois régions principales comme pour toutes les kinases.

Ainsi, **le domaine kinase** situé en position centrale s'étend entre les acides aminés 159 et 479. Bien-sûr, il contient l'ensemble des régions conservées du domaine catalytique des kinases et ses 11 sous-domaines selon la classification de Hanks. En plus, des séquences consensus et résidus conservés, participant à la liaison de l'ATP et du substrat communs à toutes les kinases, trois motifs particuliers et spécifiques à toutes les DYRKs peuvent être évoqués ([Becker, Weber et al. 1998](#)).

- Le motif His-**Cys**-Asp-Leu-Lys-Pro-Glu-Asn (aa 285 à 292) du sous-domaine VI b contenant le résidu **Cys**²⁸⁶ conservé dans toutes les protéines de la famille des DYRKs.
- Le motif Asp-Phe-Gly-**Ser-Ser-Cys** (aa 307 à 312) du sous-domaine VII avec les résidus **Ser**³¹⁰, **Ser**³¹¹ et **Cys**³¹² constituant l'empreinte des kinases DYRKs.
- Le motif **Tyr**³¹⁹-Gln³²⁰-**Tyr**³²¹ (aa 319 à 321) du sous-domaine VIII identifié comme le site d'activation par autophosphorylation de la protéine DYRK1A

Enfin un motif « Leucine zipper » [Leu²⁷⁴-(X)₆-Leu²⁸¹-(X)₆-Leu²⁸⁸-(X)₆-Leu²⁹⁵] situé également dans le domaine catalytique peut être évoqué. Il intervient dans l'établissement d'interactions protéine/protéine et protéine/ADN. La présence d'un tel motif suggère que DYRK1A est capable de former des dimères/multimères complexes incluant des facteurs de transcription et/ou de l'ADN ([Song, Chung et al. 1997](#), [Guimera, Casas et al. 1999](#)).

La partie N-terminale de DYRK1A s'étend des acides aminés 1 à 158. Elle comporte une séquence de localisation nucléaire ou NLS pour « Nuclear Localization Signal » contenant les résidus **Arg-Arg-His-Gln-Gln-Gly-Gln-Gly-Asp-Ser-Ser-His-Lys-Lys-Glu-Arg-Lys** (aa 117 à 134). Cette séquence est reconnue par des protéines cytosoliques telles que les importin- α ou - β qui guident alors DYRK1A au niveau des pores nucléaire pour sa translocation. Un second domaine de localisation nucléaire a été identifié dans le domaine catalytique (NLS2) et serait uniquement présent chez DYRK1A ([Alvarez, Estivill et al. 2003](#)).

L'extrémité C-terminale est la partie de DYRK1A lui apportant toute sa spécificité. Elle différencie en effet DYRK1A des autres kinases de la famille des ePKs et même de celles des DYRKs (**Figure 41**) et s'étend entre les acides aminés 480 à 763. Elle est très riche en sérines thréonines (28%) et possède plusieurs sous-domaines particulièrement intéressants.

- La région PEST pour « Proline/Glutamine/Sérine/Thréonine domain » (Pro⁴⁹⁷ à Pro⁵⁶⁵) est à noter. En général, cette séquence intervient dans la dégradation rapide des protéines ([Rogers, Wells et al. 1986](#)). Elle est la cible de protéase comme les calpaïnes (1 ou 2). Par exemple, la région PEST est nécessaire et suffisante pour induire la dégradation de la protéine I κ B α par la Calpaïne-2, activant ensuite le facteur de transcription NF- κ B ([Shumway, Maki et al. 1999](#)).
- Deux domaines riches en résidus sérine/thréonine s'étendant respectivement des aa 487 à 524 puis de 635 à 672 (avec une proportion de 63 et 60 % de Ser/Thr). Ces domaines sont conservés chez l'Homme, le rat et la souris mais leurs rôles sont à l'heure actuelle inconnus.
- Deux domaines de répétition de résidus histidine « Histidine repeats » situés entre les deux régions riche en Ser/Thr allant des His599 à His602 puis His607 à His619. Ces deux domaines interviennent dans les processus d'épissage.


```

1
MHTGGETSACKPSSVRLAPSFSAAGLQ MAGQMPHSHQYSDRRQPNISDQQVSALSYS DQIQQLTNQ
VMPDIVMLQRRMPQTFRDPATAPLRKLSVDLIKTYKHINEVYAKKRRHQGGQDDSSHKKERKVYNDGY
DDDNYDYIVKNGEKWMDRYEIDSLIGKGSFGQVVKAYDRVEQEWVAIKIKNKKAFLNQAQIEVRLLLMNK
HDTEMKYIYVHLKRHFMRNHLCLVFEMLSYNLYDLLRNTNFRGVSLNLRKFAQQMCTALLFLATPELSIIH
CDLKPENILLCNPKRSAIKIVDFGSSCQLGQRIYQYIQSRFYRSPEVLLGMPYDLAIDMWSLGCILVEMHTGE
PLFSGANEVDQMNKIVEVLGIPPAHILDQAPKARKFFEKLPDGTWNLKTKDKGKREYKPPGTRKLNILGVE
TGGPGGRRAGESGHTVADYLKFKDLILRMLDYPDKTRIQPYALQHSFFKKTADDEGTNTSNSVSTSPAMEQ
SQSSGTTSSSTSSSSGGSSGTSNSGRARS DPTHQHRHSGGHFTA AVQAMDCETHSPQVRQQFPAPLGWS
GTEAPTQVTVETHPVQETTFHVAPQQNALHHHHGNSSHHHHHHHHHHHHHGGQALGNRTRPRVYNSPT
NSSSTQDSMEVGHSHSMTLSSTSSSTSSSTSSSTGNQGNQAYQNRPAANTLDFGQNGAMDVNLTVYS
NPRQETGIAGHPTYQFSANTGPAHYMTEGHLTMRQGADREESPMTGVCVQQSPVASS
763

```

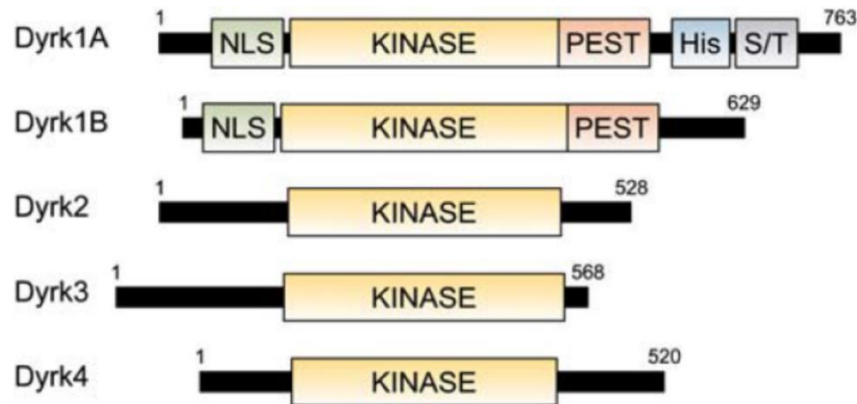


Figure 41 : Structure primaire de la protéine DYRK1A et comparaison aux autres DYRKs humaines

(Partie haute) La protéine DYRK1A humaine est composée de 763 aa organisé en 3 parties distinctes. (A) La région N-terminal (aa 1 à 158) comporte une séquence de localisation nucléaire (rectangle vert). (B) La région correspondant au domaine catalytique est centrale (aa de 159 à 479) (Or entouré de pointillés en or) et contient un domaine de liaison à l'ATP (souligné) ; un motif leucine-zipper (souligné en pointillés) ; les motifs signatures des DYRKs incluant la Cys²⁸⁶ et le triplet Ser³¹⁰, Ser³¹¹ et Cys³¹² (Rouge et gras) ; le site d'auto-phosphorylation Tyr³¹⁹-Gln³²⁰-Tyr³²¹ (Jaune et Gras et représenté d'un P encerclé) et un second domaine de localisation nucléaire NLS2. (C) La région C-terminale (aa 480 à 763) comprend deux séquences riches en résidus Ser/Thr (en violet) ; deux séquences de répétition en histidines (en bleue) et une séquence PEST impliquée dans la dégradation de la protéine (rectangle rouge) (Adapté et modifié à partir des séquences primaires en acides aminés issues de kinase.com).

(Partie basse) Structure primaire de la protéine DYRK1A humaine (isoforme 1 de 763 acides aminés ou 85,6 kDa) et de quelques-uns de plus proches paralogues (Adapté de ([Park, Song et al. 2009](#))).

Alors que plusieurs isoformes de Dyrk1A ont été identifiées, il apparaît qu'au niveau cérébral l'isoforme iso1 (763 aa ou 85,6 kDa) représente la quasi-totalité des produits protéiques. Une analyse de séquences primaires, nous révèle que la partie C-terminale spécifie véritablement la protéine DYRK1A. En effet, elle différencie cette dernière des autres ePKs et mêmes des autres kinases de sa famille. Il est intéressant de noter qu'en perdant ce domaine C-terminal, DYRK1A posséderait alors une structure très proche de son paralogue DYRK2, qui au contraire est très peu exprimé dans le tissu cérébral.

ii. *Modèles d'activation de la protéine DYRK1A*

DYRK1A, comme de nombreuses autres protéines kinases, possède deux résidus Tyr (Y³¹⁹ et Y³²¹) dans son domaine kinase entre les sous-domaines VII et VIII. En les remplaçant par des résidus Phe (proche structurellement), Himpel et al. montrent en 2001 une absence totale d'activité de phosphorylation, indiquant que ces résidus sont bel et bien critiques dans l'activation de DYRK1A « mature ». Les motifs « Y-X-Y » sont ainsi appelés boucle d'activation ([Himpel, Panzer et al. 2001](#), [Wiechmann, Czajkowska et al. 2003](#)).

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'activation de DYRK1A. La première voulait qu'un mécanisme intermoléculaire (Trans) en soit responsable. Ici, une première protéine DYRK1A phosphorylerait et activerait une seconde au niveau de sa boucle d'activation. Ce complexe formerait alors un dimère, facilité par la présence de motifs leucine zipper. Une deuxième hypothèse voulait au contraire qu'un mécanisme intramoléculaire (Cis) en soit responsable. Une protéine DYRK1A phosphorylerait sa propre boucle d'activation par l'intermédiaire de changement de conformation.

Lochhead et al., ont réalisé en 2005 une série de mutations dirigées sur des protéines DYRK1A de drosophile (Mnb) permettant de statuer sur le véritable mécanisme d'activation de DYRK1A ([Lochhead, Sibbet et al. 2005](#)). En plus, ils ont incubés des protéines mnb activées ou matures en présence d'une phosphatase (PPase λ) et des protéines inactivées ou immatures en présence d'ATP radioactif : [γ -³²P] ATP. Leurs résultats suggèrent que le domaine catalytique de la protéine DYRK1A peut adopter, à la suite de sa traduction, une conformation intermédiaire fonctionnelle. Cette protéine intermédiaire immature possède alors une activité tyrosine kinase

intramoléculaire ou d'autophosphorylation (auto-activation) en phosphorylant le résidu Tyr³²¹ situé au niveau de la boucle d'activation de la kinase (**Figure 42**).

Cependant, des expériences réalisées chez la bactérie et des cellules de mammifère démontrent que l'activité tyrosine kinase n'est pas restreinte à l'autophosphorylation de sa boucle d'activation. Cette activité est également observable chez des DYRK1A matures. Les auteurs soulignent que l'autoactivation de DYRK1A par son autophosphorylation sur ses résidus Tyrosine augmenterait son activité Sérine/Thréonine. Au contraire, la protéine immature pourrait également développer une activité Ser/Thr bien que moins importante. Ce modèle proposé par Walte et al., en 2013, se veut ainsi un peu plus dynamique ou plastique que le modèle développé par Lochhead (**Figure 42**).

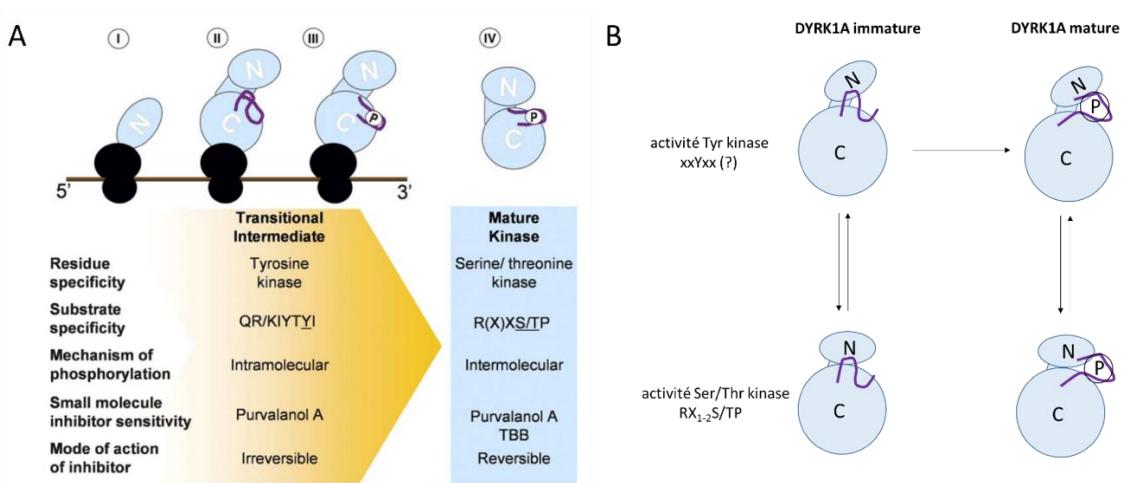


Figure 42 : Modèles expliquant les mécanismes d'autophosphorylation de DYRK1A

(A) Modèle proposé par Lochhead, où dès la traduction des mRNA de DYRK1A, la partie N-terminal commence à former sa structure secondaire tertiaire (I). Pendant la synthèse de la protéine, une forme intermédiaire se forme et la boucle d'activation est reconnue comme le premier substrat potentiel du domaine catalytique (II). L'activité Tyr kinase de la forme intermédiaire est active phosphorylant alors la boucle d'activation (III). Une fois transduit, activé, la protéine DYRK1A est alors mature et peut phosphoryler ses substrats via son activité Ser/Thr kinase (IV). (B) Modèle proposé par Walte et al., 2013, où les formes immatures de DYRK1A possèdent une activité Tyrosine kinase permettant d'autoactiver la kinase mais également une activité Ser/Thr à faible rendement. Les protéines matures, autophosphorylées, peuvent avoir une activité Ser/Thr kinase puissante mais également Tyr kinase jusqu'alors non reconnue (Adapté de (Lochhead, Sibbet et al. 2005, Walte, Ruben et al. 2013)).

iii. DYRK1A et sa fonction

Nous l'avons vu, une fois activée par auto-phosphorylation, DYRK1A peut remplir sa tâche de Ser/Thr kinase « simple » mais DYRK1A est une « proline-directed kinase » et catalysera préférentiellement aux environs de résidus proline. Sa séquence consensus optimale est : Arg-

Pro-X-Ser/Thr-Pro, ressemblant à celles des MAP kinases et des CDKs. La présence du résidu Pro en p-2 est particulièrement importante puisqu'il va être capable d'être reconnu par DYRK1A au contraire de ses paralogues DYRK2 ou DYRK3 ([Himpel, Panzer et al. 2001](#)).

Des études *in vitro* ont identifié un très grand nombre de substrats protéiques, très variables dans leurs rôles et appartenant à différentes familles protéiques :

- Des facteurs de transcription comme STAT3, NFAT, Gli1 ou CREB
- Des facteurs d'épissage impliqués dans le cycle cellulaire comme par exemple la cycline L2 ou CLK1
- Des protéines impliquées dans le trafic vésiculaire en particulier synaptique comme Munc18 (exocytose) ou la dynamine 1, l'amphiphysine 1 et la synaptojanine (endocytose).
- Des protéines liées à l'apoptose comme p53 ou la caspase 9
- Enfin, DYRK1A phosphoryle des protéines particulièrement intéressantes pour nous puisqu'en plus de phosphoryler l' α -synucléine, impliquée dans la maladie de Parkinson, DYRK1A phosphoryle l'APP, la PS1 (*PSEM*), les protéines TAU, et la GSK3 β dont leurs implications dans la maladie d'Alzheimer ont largement été décrites dans le Chapitre I de cette thèse.

La quantité de substrats, pouvant théoriquement être phosphorylés par DYRK1A, laisse à penser que cette protéine kinase module de très nombreuses voies cellulaires. Néanmoins, il faut noter qu'en fonction de la localisation tissulaire, cellulaire, subcellulaire de la kinase et de l'âge de l'espèce, leur nombre est probablement moindre.

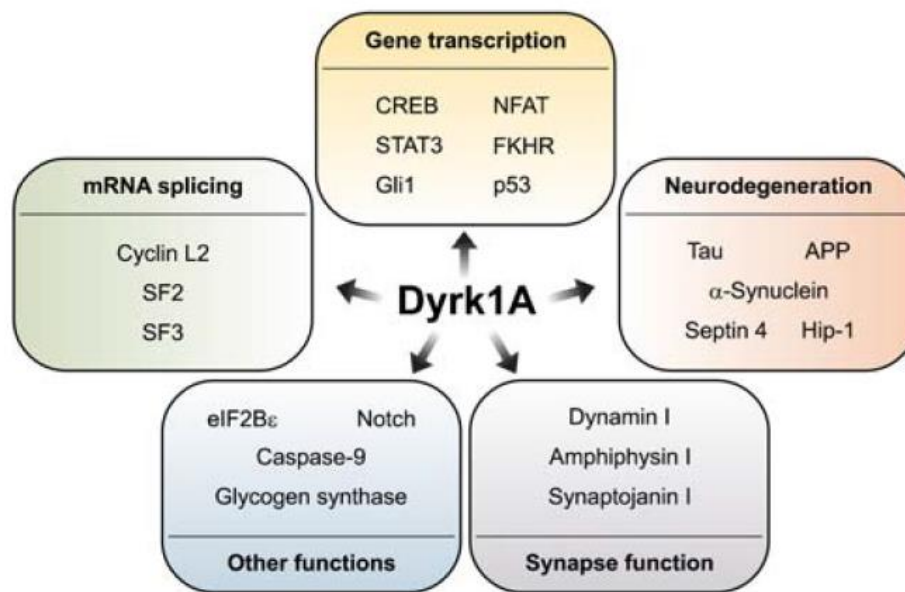


Figure 43 : Interactions de DYRK1A

Les substrats protéiques de la kinase DYRK1A classés en fonction de leurs fonctions dans la cellule (D'après ([Park, Song et al. 2009](#))).

iv. DYRK1A et son expression subcellulaire, cellulaire et tissulaire

Il n'est pas surprenant de retrouver DYRK1A dans le compartiment nucléaire de la cellule s'il l'on se rappelle les deux séquences de localisation nucléaire contenues dans la partie N-terminale et dans le domaine catalytique de la kinase. En utilisant différents fragments de DYRK1A couplés à des protéines de fusion telle que la GFP (Green Fluorescent Protein) ou l'épitope HA (Human influenza hemagglutinin), une étude confirme et affine ce concept ([Alvarez, Estivill et al. 2003](#)). Il apparaît que DYRK1A s'accumule dans les granules nucléaires d'épissage ou SSs (Splicing Speckles) par l'intermédiaire de séquence STS (nuclear Speckles-Targeting Signal) représentées dans sa séquence primaire par le motif en répétition d'histidine (**Figure 44**).

En 2003, une étude associant doubles marquages immunofluorescents et observation par microscopie confocale a permis de révéler une localisation cytosolique et nucléaire de DYRK1A à la fois dans les neurones et les astrocytes de culture primaire de cortex néonataux de rats ([Marti, Altafaj et al. 2003](#)). Les auteurs confirment cette donnée par western blot où la présence de DYRK1A dans des fractions nucléaires et cytosoliques est démontrée. Enfin, ces mêmes auteurs précisent que le marquage neuronal est bien plus marqué que celui observé dans les astrocytes (**Figure 44**).

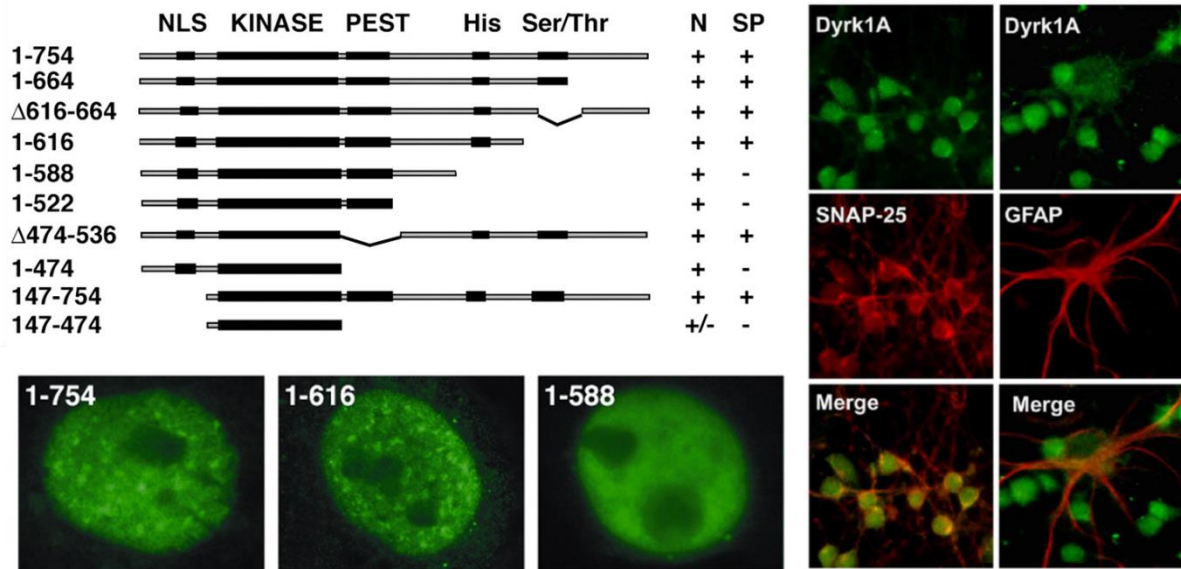


Figure 44 : Localisation subcellulaire et cellulaire de DYRK1A dans le néocortex de rat

(Partie gauche – haute) Description des protéines DYRK1A délétées et leurs séquences primaires respectives. (Partie gauche – basse) Démonstration de l'intérêt de la séquence « Histidine repeat » dans la localisation de DYRK1A. (Partie droite) Localisation de DYRK1A neuronale ou astrocytaire dans une culture primaire de cortex néonatal de rats (D'après ([Alvarez, Estivill et al. 2003](#), [Martí, Altafaj et al. 2003](#))).

Les études *in vivo* visant à déterminer la localisation cellulaire et tissulaire de la protéine DYRK1A sont plus nombreuses. Mais les contextes biologiques varient d'une étude à l'autre, puisqu'elles ont été réalisées dans le cerveau de souris, de rats ou d'Hommes à différentes périodes de développement ou d'âge.

Chez la souris et en particulier dans les stades embryonnaires tardifs, DYRK1A est retrouvé dans diverses sous-population de neurones en cours de différenciation : des précurseurs neuronaux, des neurones récemment différenciés ou matures (associés aux marqueurs nestine, Tuj1 et NeuN respectivement). Dans les précurseurs neuronaux, DYRK1A est préférentiellement localisée dans le cytosol alors que dans les neurones différenciés, DYRK1A se retrouve dans les neurites, le soma et de façon moindre dans le noyau ([Hammerle, Elizalde et al. 2008](#)) (Figure 45). Au contraire, l'expression de DYRK1A dans les astrocytes et les oligodendrocytes n'a pas été démontrée.

L'analyse spatio-temporelle de l'expression de la protéine DYRK1A révèle un profil assez semblable aux analyses du transcrit par hybridation *in situ*. Lors des phases embryonnaires précoces, DYRK1A est retrouvée dans les sites de production de neurones avant leurs synthèses dont la crête neurale, le neuroépithélium du tube neural et les placodes crâniennes. DYRK1A est retrouvée un peu plus tard dans plusieurs structures du cerveau antérieur, du mésencéphale et

du rhombencéphale. A l'âge adulte, le niveau d'expression de DYRK1A varie de très important à très modeste en fonction de la région cérébrale. Nous noterons une forte expression dans le cortex entorhinal, le cortex périforme, le cervelet (en particulier dans les cellules granulaires). Au contraire, peu d'expression est observée dans le striatum par exemple. Enfin, les couches cellulaires pyramidales et granulaires de l'hippocampe, et en général des néocortex, expriment une expression modérée à forte de DYRK1A ([Marti, Altafaj et al. 2003](#)).

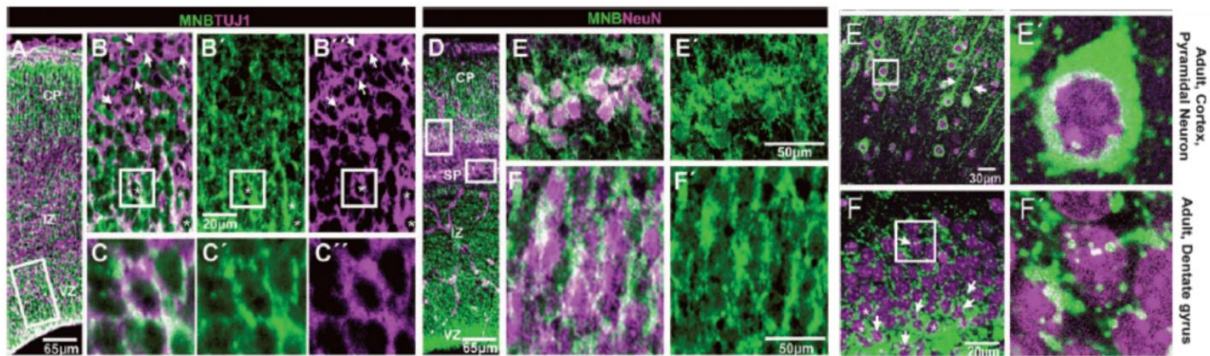


Figure 45 : Localisation cellulaire de DYRK1A dans le cerveau de souris

Expression de DYRK1A (Mnb) dans le cortex cérébral de souris à E16,5 avec co-marquage de neurones en différenciation (TUJ1) (A - C'') ou différenciés (NeuN) (D - F''). Expression de DYRK1A dans le cortex cérébral (E et E') ou le gyrus denté de l'hippocampe (F et F'') de souris adulte (co-marquage avec DAPI) (D'après ([Hammerle, Elizalde et al. 2008](#))).

Chez le rat, peu d'études sont disponibles. Une analyse par western blot révèle cependant une expression de DYRK1A dans plusieurs organes dont le cerveau, le cœur et les reins durant les stades embryonnaires médian et tardif (P14 et P18 respectivement). Une forte expression de la protéine DYRK1A apparaît dans le cerveau après la naissance dans différentes régions cérébrales (cortex cérébral, hippocampe, cervelet) et le cœur. Cette expression diminue progressivement tout en restant à un niveau de base et se stabilise jusqu'à l'âge adulte ([Okui, Ide et al. 1999](#)).

Chez l'Homme, une étude a détaillé l'expression spatio-temporelle de DYRK1A grâce à 22 cerveaux post-mortem de sujets âgés de 8 mois à 90 ans (2 jeunes enfants, 10 adultes, 10 sujets âgés) ([Wegiel, Kuchna et al. 2004](#)). DYRK1A a été observée dans le cytosol, les neurites, les synapses mais aussi dans le noyau des neurones à l'âge adulte. DYRK1A semble être exclusivement neuronal lors de la période post-natale précoce puis apparaît peu à peu au cours du vieillissement dans les astrocytes. Son expression est ubiquitaire, mais comme pour la souris, varie en intensité selon la région cérébrale. En particulier dans l'hippocampe, où elle est décrite comme couche et région-spécifique puisqu'elle est retrouvée fortement exprimée dans la région du CA1 et sa couche pyramidale alors que les régions CA2 et CA3 n'expriment pas la protéine

kinase. Le gyrus denté développe un marquage modéré au niveau de la couche moléculaire mais pas dans la couche granulaire. Enfin, DYRK1A est observée dans le cortex cérébral préférentiellement dans les couches les plus externes (couche II et III) alors qu'elle n'est pas retrouvée dans le cervelet ([Wegiel, Kuchna et al. 2004](#))(Figure 46).

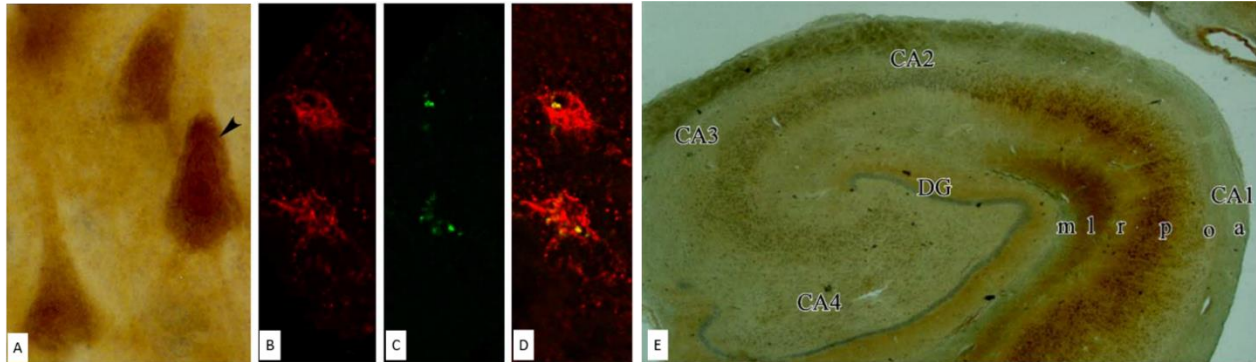


Figure 46 : Localisation cellulaire de DYRK1A dans le cerveau humain adulte.

(A) Marquage DYRK1A positif de neurones pyramidaux localisé dans la couche III du cortex entorhinal de cerveau humain âgé de 43 ans. (B-D) Identification de DYRK1A astrocytaire par double marquage en immunofluorescence (B-D : GFAP- rouge ; DYRK1A – vert) dans le noyau de l'amygdale d'un sujet de 33 ans. (E) Illustration de la distribution couche et région-spécifique de l'expression de DYRK1A dans l'hippocampe d'un sujet âgé de 43 ans. (Adapté de [Wegiel, Kuchna et al. 2004](#)).

3. Pathologies cérébrales liées à DYRK1A

La diversité du profil d'expression mais également du nombre et de la nature des substrats protéiques de DYRK1A sont des éléments laissant à penser que cette protéine peut jouer un rôle dans de nombreuses fonctions normales du cerveau incluant son développement, sa maturation, son vieillissement et sa dégénération. La dérégulation de cette kinase pourrait alors avoir des conséquences très variées. Ici, nous évoquerons son rôle dans l'apparition des anomalies cognitives associés à la trisomie 21. Puis, nous expliquerons pourquoi plusieurs groupes considèrent l'implication de cette kinase dans la progression de la maladie d'Alzheimer comme non-négligeable.

i. Dyrk1A : gène candidat de la déficience intellectuelle dans la trisomie 21

Le gène *Dyrk1A* étant localisé sur le chromosome 21 humain, plusieurs études se sont intéressées au niveau d'expression transcriptionnelle et protéique de ce gène dans la population porteuse de Trisomie 21 ou Syndrome Down (SD). Ces patients développent une copie surnuméraire du chromosome 21, le plus souvent totale, associée à des traits phénotypiques bien connus incluant une cardiopathie, une anomalie des muscles-squelettiques, une dysmorphie

faciale et bien sûr un retard dans le développement cognitif conduisant à une déficience intellectuelle. Dans le cerveau de jeunes fœtus trisomiques (22 semaines d'aménorrhée), le transcrit est surexprimé à raison de 1,5 par rapport aux fœtus euploïdes ([Guimera, Casas et al. 1999](#)). Cette surexpression est du même ordre au niveau de la protéine chez des cerveaux de fœtus de 20 semaines d'aménorrhée ([Cheon, Bajo et al. 2003](#)).

Plus tard, des analyses incluant différentes régions cérébrales de cerveaux post-mortem d'âge différents (enfant de 13 mois à adulte de 71 ans) ont été réalisées. La surexpression de la protéine DYRK1A varie de 1,3 à 1,7 en fonction de la région d'intérêt entre les sujets atteints de SD et les contrôles appariés en âge ([Dowjat, Adayev et al. 2007](#)). Cette expression dosage génique-dépendante de DYRK1A est retrouvée dans le cerveau embryonnaire et adulte de souris Ts65Dn et Dp16(1)Yey, modèles trisomiques utilisés pour l'étude du SD. La surexpression unique du gène *Dyrk1A* chez la souris a été entreprise ([Guedj, Pereira et al. 2012](#)) confirmant son rôle délétère dans le développement cérébral ([Souchet, Guedj et al. 2014](#)).

ii. La maladie d'Alzheimer chez les patients atteints du SD

L'un des nombreux symptômes associé au SD est l'apparition très précoce, et plus fréquente que dans la population générale, d'une forme particulière de la maladie d'Alzheimer. Typiquement, dès l'âge de 40 ans, la majorité des patients atteints du SD, possèdent une neuropathologie suffisante permettant de les diagnostiquer comme atteints de MA. On note en effet la présence dans leurs cerveaux des lésions caractéristiques de la maladie à savoir les plaques amyloïdes, associées à l'augmentation de la quantité de peptides amyloïdes A β , d'angiopathies amyloïdes cérébrales et de dégénérescences neurofibrillaires (DNFs) ([Wisniewski, Wisniewski et al. 1985](#), [Belza and Ulrich 1986](#), [Mann and Esiri 1989](#)) (**Figure 47**).

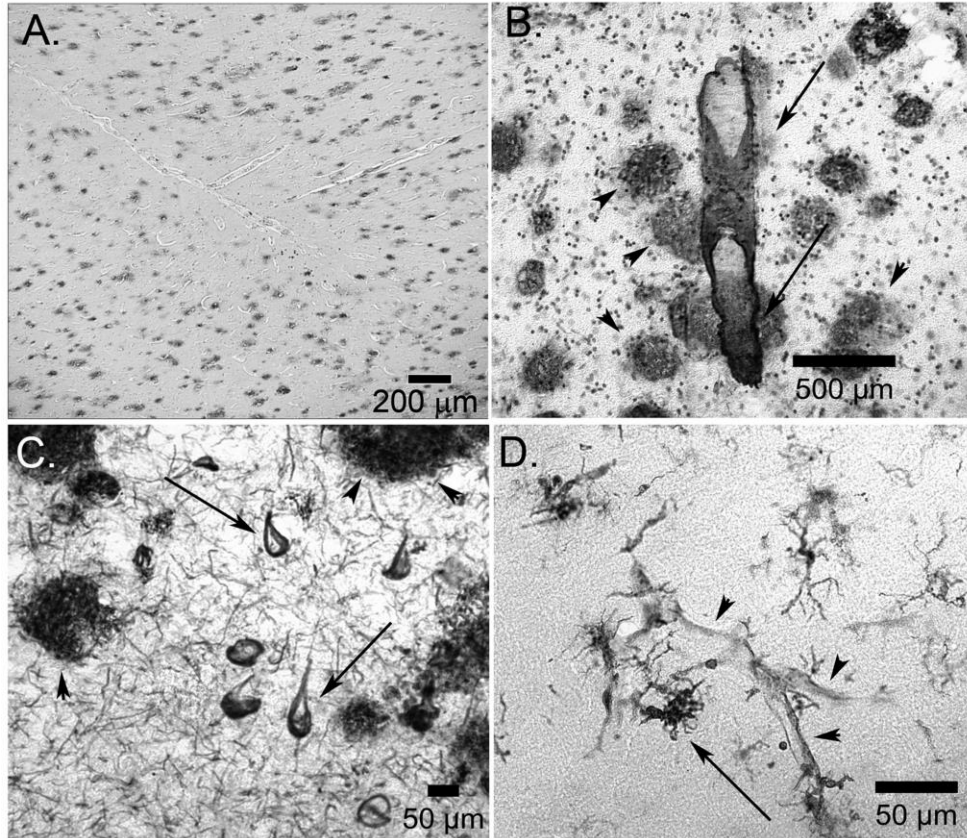


Figure 47 : Neuropathologie associée à la MA dans le cerveau de personnes porteuses de T21.

(A) Dépôt multiple de plaques amyloïdes dans le cortex temporal de patient SD âgé de 21 ans. (B) Angiopathie amyloïde cérébrale observée dans le cortex temporal de patient SD diagnostiqué MA âgé de 46 ans. Notons la distinction entre les AAC (flèches) et les plaques amyloïdes (têtes de flèche) (C) Dégénérescence neurofibrillaire observée dans le cortex temporal de patient SD diagnostiqué MA âgé de 46 ans. (D) Immunomarquage de cellules microgliales IBA1 positives (flèche) autour de vaisseaux cérébraux (tête de flèche) suggérant un phénomène de neuroinflammation ([Head, Lott et al. 2007](#)).

Les plaques amyloïdes apparaissent à un âge très précoce (probablement avant 8 ans) d'abord au niveau du gyrus para-hippocampique et du gyrus temporal inférieur puis vers les autres structures cérébrales. Leur progression est alors « centrifuge » et contraire à celle observé dans la MA sporadique où l'apparition des plaques amyloïdes suivent un profil centripète (Thal, Rub et al., 2002). Dans le SD, leur profil d'apparition suit celui des DNFs qui apparaissent bien plus tard (aux alentours de 30 ans). Ces dernières sont étroitement liées à la présence de cellules microgliales dystrophiques, médiateurs clé de l'inflammation, comme le démontre un examen post-mortem réalisé chez 6 cas de SD âgés en moyenne de 45 ans ([Xue and Streit 2011](#)). Enfin, quelques études indiquent une apparition des angiopathies amyloïdes cérébrales avant l'âge de 55 ans.

De façon intéressante, l'apparition de ces deux lésions cérébrales n'est pas associée immédiatement à une démence. Celle-ci est en effet observable avec un délai supérieur à 10 ans chez des patients d'âge compris entre 50 à 55 ans, comme le décrivent plusieurs groupes utilisant des procédures standardisées ([Wisniewski and Rabe 1986](#), [Coppus, Evenhuis et al. 2006](#), [Margallo-Lana, Moore et al. 2007](#)). Il est donc remarquable de comprendre quels éléments permettent de « ralentir » l'apparition de la démence chez ces individus.

Une hypothèse développée par Head et al., en 2007, fait appel à la notion de gènes « compensateurs ». Ici, certains gènes localisés sur le chromosome 21 pourraient contrebalancer les effets délétères d'autres gènes du chromosome 21 et expliquer cette relative protection. Ainsi, les auteurs soulignent la présence du gène *APP* comme particulièrement intéressante. La protéine APP surexprimée conduit à une production plus élevée de peptides sAPP α . Ce peptide issu du clivage de l'APP par l' α -sécrétase et sa voie dite « non-amyloïdogénique », est particulièrement bénéfique pour la cellule ([Mattson, Cheng et al. 1993](#), [Fol, Braudeau et al. 2015](#)). Il serait alors le facteur clé de cette réponse compensatoire en jouant sur la promotion de la survie neuronale, la croissance et le maintien des synapses et dans la protection contre l'apoptose.

A contrario, le gène *APP* est l'élément initial des peptides A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ toxiques via le clivage de l'APP par sa voie « amyloïdogénique ». Ce clivage est médié par la bêta-sécrétase 1, produit protéique du gène BACE-1 (beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) présent sur le chromosome 11 humain. Son activité est très variable et augmenterait uniquement dans la population âgée atteinte du SD ([Nistor, Don et al. 2007](#)). De façon intéressante, ce clivage peut également être assuré par son paralogue : la bêta-sécrétase 2 codée par le gène *BACE-2*, localisé sur le chromosome 21 humain. Au niveau développemental, le transcrite *BACE-2* et son produit protéique sont observés significativement plus élevés dans les cerveaux de fœtus humains SD comparé aux fœtus euploïdes appariés en âge ([Barbiero, Benussi et al. 2003](#)). Ceci conduit à une augmentation des formes solubles d'A β lors de cette période ([Teller, Russo et al. 1996](#)). A l'âge adulte, la β -sécrétase n'est pas observée dans le cerveau en conditions physiologiques malgré une augmentation du transcrite de *BACE-2* chez les patients SD comparés aux contrôles suggérant un effet compensatoire post-transcriptionnel.

Enfin, la présence d'autres éléments présents sur le chromosome 21 humain peuvent également expliquer un développement accru de MA chez les patients SD. En particulier, l'allèle *ApoE4*, considéré comme le facteur de risque génétique le plus important dans les formes sporadiques mais aussi le gène *Dyrk1A*.

Ces données de littérature nous renseignent sur la MA observée chez des individus porteurs de trisomie 21. Il apparaît que cette forme de MA est clairement à distinguer de la forme sporadique ou même de la forme familiale. Dans ce contexte, on observe d'abord une surexpression conjuguée de l'APP et de BACE2 lors des phases embryonnaires, entraînant une production in utero de peptides solubles A β , puis, une surexpression unique d'APP conduisant à des effets compensateurs probables la production accrue de sAPP α .

Le développement d'un modèle animal surexprimant les gènes APP et BACE-2 humains, sous contrôle de promoteurs endogènes, associé à une étude du métabolisme de l'APP serait une approche intéressante pour mieux comprendre les conséquences de cette pathologie amyloïde in utero.

4. DYRK1A : une protéine clé dans la MA ?

L'intérêt de DYRK1A dans la MA provient probablement de son étude dans le contexte de la Trisomie 21 et par le fait qu'elle soit, depuis quelques années, associée à la composante Tau de la maladie. Nous verrons ici, que son implication potentielle est certainement plus large. Nous évoquerons les études qui ont analysé son expression dans la MA et les dernières avancées dans le développement de stratégies thérapeutiques ciblant la kinase.

i. DYRK1A : implication dans la composante Tau de la MA

La première étude révélant l'intérêt potentiel de DYRK1A dans la MA est à ma connaissance, l'étude de Woods et al., en 2001. Ces biochimistes, spécialistes des kinases, travaillaient sur la GSK3- β , déjà évoquée plusieurs fois dans ce manuscrit. Cette kinase nécessite une phosphorylation préalable de son substrat cible sur des résidus Thr ou Ser pour remplir efficacement sa réaction de phospho-transfert. Par exemple, la GSK3- β inactive par phosphorylation la protéine eIF2B ϵ sur le résidu Ser535 si et seulement si la Ser539 a, au préalable, été phosphorylée. Les auteurs identifient DYRK1A comme unique kinase (avec son paralogue DYRK2) phosphorylant cet épitope. En parallèle, ils identifient que DYRK1A phosphoryle la protéine Tau sur le résidu Thr212 favorisant ensuite la phosphorylation de GSK3- β sur le résidu Ser208 *in vitro*. Avec cette étude, Woods et collaborateurs sont les premiers à

suggérer que DYRK1A prime la phosphorylation de Tau par GSK3- β (Woods, Cohen et al. 2001). En examinant la quantité de DYRK1A dans le cortex de patients diagnostiqués atteints de MA sporadique et âgés de 85 ans en moyenne (Braak V –VI), une étude confirme le lien entre DYRK1A et Tau. Certains neurones du cortex entorhinal développent en effet à la fois une augmentation du niveau de DYRK1A et une augmentation du niveau de Tau phosphorylée sur Thr212. D'autre part, les auteurs ont observé un marquage DYRK1A dans des astrocytes à la proximité de plaques amyloïdes (Ferrer, Barrachina et al. 2005).

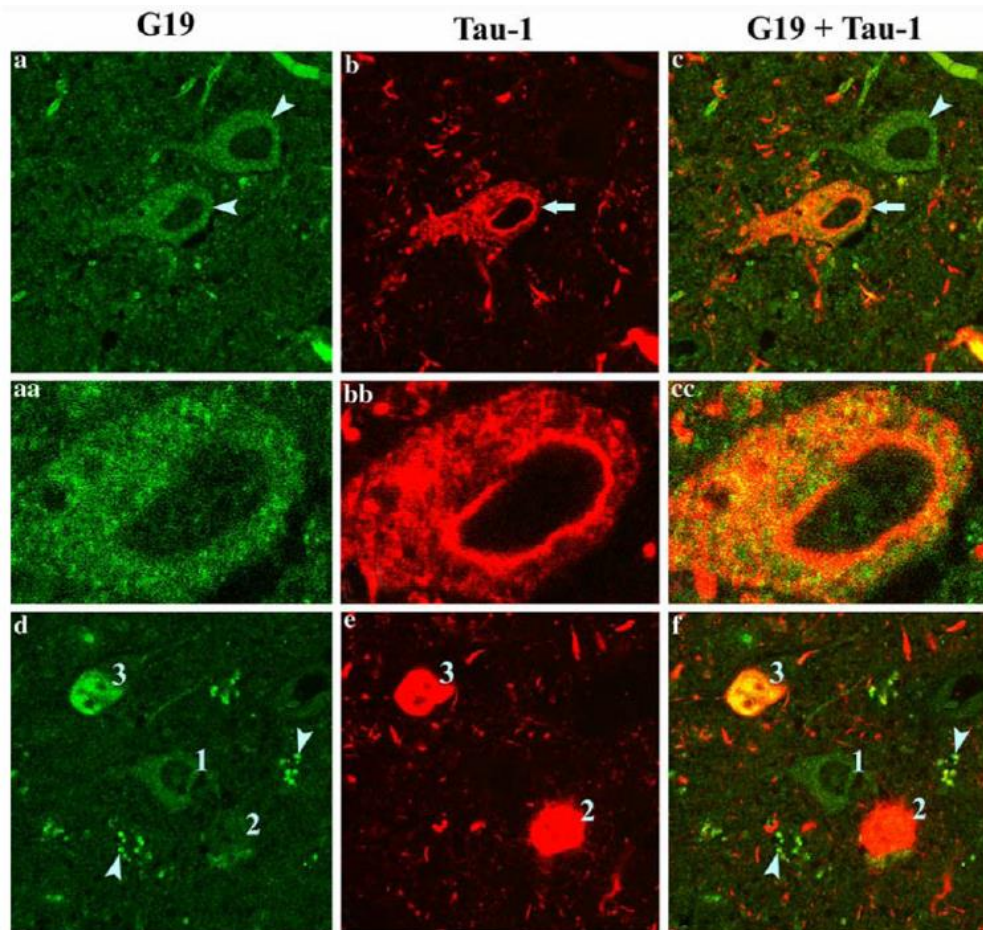


Figure 48 : Localisation de DYRK1A dans un neurone en cours de dégénérescence

Région du CA1 de l'hippocampe de patient SD âgé de 67 ans et observation de cellules DYRK1A et TAU-1 positives. (a - c et aa - cc) DYRK1A est localisée dans le soma de neurones sains (simple marquage vert) et de neurones en cours de dégénérescence (double marquage vert-rouge). (d-f) un neurone normal DYRK1A positif (1) un neurone simplement marqué avec Tau-1 (2), un neurone DYRK1A en cours de dégénérescence (3). Le cytoplasme d'astrocytes présente des granules DYRK1A positives. L'anticorps anti-DYRK1A reconnaît un épitope localisé en N-terminal de la kinase (G-19) (Wegiel, Dowjat et al., 2008).

Une étude histopathologique plus détaillée a ensuite été réalisée sur des cerveaux de patients contrôles (16), SD (21) ou MA (20) ([Wegiel, Dowjat et al. 2008](#)) (**Figure 48**). Les auteurs observent qu'un marquage DYRK1A est présent au sein de neurones en voie de dégénérescence. Un pourcentage de 10 à 15% de DNFs développant un marquage DYRK1A est d'ailleurs observé dans différentes couches du cortex entorhinal de patients atteints de MA. Alors que plus de 25 % de double marquage sont constatés dans le CA1 de l'hippocampe (7% dans le secteur du CA4 et 12% dans la couche des cellules pyramidales du subiculum). Ces études démontrent ainsi clairement que DYRK1A est présent très précocement dans des régions cérébrales connues pour développer un niveau élevé de DNFs.

En 2011, le même groupe fait état d'une nouvelle notion dans une étude combinant analyses histologiques et biochimiques d'une cohorte de patients contrôles, SD et MA. Nous savons que l'épissage alternatif du transcrite de l'ARNm de Tau, et en particulier de son exon 10, conduit à la formation de protéines à 3 répétitions (3R) ou à 4 répétitions (4R) de domaines liant les microtubules. Un ratio de 1 :1 des formes 3R/4R est observé en condition normale mais son augmentation peut initier une dégénérescence neurofibrillaire. Dans cette étude, les auteurs confirment une quantité de DYRK1A augmentée, dépendant de son dosage génique, dans le cytosol et mais également dans le noyau de neurones, où DYRK1A phosphoryle le facteur d'épissage alternatif ASF, connu pour augmenter le ratio 3R/4R. Ainsi, en plus de son rôle délétère dans la phosphorylation de certains épitopes de Tau, DYRK1A contribue à activer l'épissage alternatif de *MAPT* et de son exon 19, augmentant la forme 3R de Tau.

ii. *DYRK1A : implication dans le métabolisme de l'amyloïde*

En s'intéressant aux liens entre les gènes du chromosome 21 humain et la MA, une étude japonaise, incluant 188 patients MA et 375 contrôles, a identifié six gènes d'intérêt associés à un fort risque de MA (étude d'association pangénomique ou analyse des SNPs pour « Single Nucleotide Polymorphism »). *Dyrk1A* figurait dans cette liste de six gènes (en plus de *Samsn1*, *Rrss7*, *Ncam2*, *Runx1* et *Kcnj6*). Son analyse transcriptionnelle par Q-PCR a révélé une augmentation significative dans l'hippocampe de l'ARNm de *Dyrk1A* chez les patients atteints de MA comparé aux contrôles. Une augmentation plus faible mais significative fût également soulignée dans le cerveau total de souris APP/PS1. Les auteurs démontrent que la présence de peptides A β ₄₂ augmente le niveau d'ARNm *Dyrk1A in vitro*, alors qu'une lignée cellulaire surexprimant *Dyrk1A* montre une augmentation du niveau de phosphorylation des protéines Tau. Les auteurs supportent ainsi pour la première fois, l'idée que DYRK1A pourrait jouer un rôle de « pont » entre la production d'A β et la phosphorylation de Tau dans la MA ([Kimura, Kamino et al.](#)

[2007](#)). Une seconde étude d'association pangénomique réalisée sur une cohorte espagnole n'a cependant pas identifié *Dyrk1A* comme associé à un fort risque de MA ([Vazquez-Higuera, Sanchez-Juan et al. 2009](#)). Ces données contradictoires peuvent alors s'expliquer par la disparité génétique des échantillons.

La même année, une étude utilisant un modèle de souris transgénique surexprimant *Dyrk1A* humain, identifie d'abord deux autres épitopes de la protéine Tau phosphorylés par la kinase à savoir la Ser402 et la Ser404 ([Ryoo, Jeong et al. 2007](#)). Par la même méthodologie, ce groupe démontre que DYRK1A est capable de phosphoryler la protéine APP sur le résidu Thr668 ([Ryoo, Cho et al. 2008](#)) mais également la Preseniline 1 ou PS1, sur le résidu Thr354. Cette dernière, plus stable que son homologue non-phosphorylée, pourrait en retour favoriser la production de peptides A β suite au clivage de l'APP ([Ryu, Park et al. 2010](#)). Collectivement, ces études soulignent un intérêt double de DYRK1A dans la MA : la kinase pourrait à la fois moduler la pathologie Tau mais également la composante amyloïde, liant ainsi les deux pathologies.

iii. DYRK1A : implication dans la « neuroinflammation »

L'inflammation cérébrale en réponse aux phénotypes de la MA prend une importance grandissante. L'idée d'une implication de DYRK1A dans la composante inflammatoire de la MA est cependant peu répandue. Pourtant, plusieurs études soulignent l'importance de DYRK1A vis-à-vis de protéines impliquées dans l'inflammation. La première d'entre elles est certainement l'étude d'Arron et al., publiée en 2006 soulignant le rôle de DYRK1A, agissant en synergie avec DSCR1 dans la régulation du développement embryonnaire ([Arron, Winslow et al. 2006](#)). En comparant le phénotype de souris déficientes en *Nfatc* et les modèles de souris trisomiques, surexprimant *Dscr-1* et *Dyrk1A*, les auteurs ont observé plusieurs similarités morphologiques. Des analyses biochimiques ont permis aux auteurs de démontrer que DYRK1A est une kinase jouant un rôle dans l'export nucléaire du facteur de transcription NFATc (**Figure 49**).

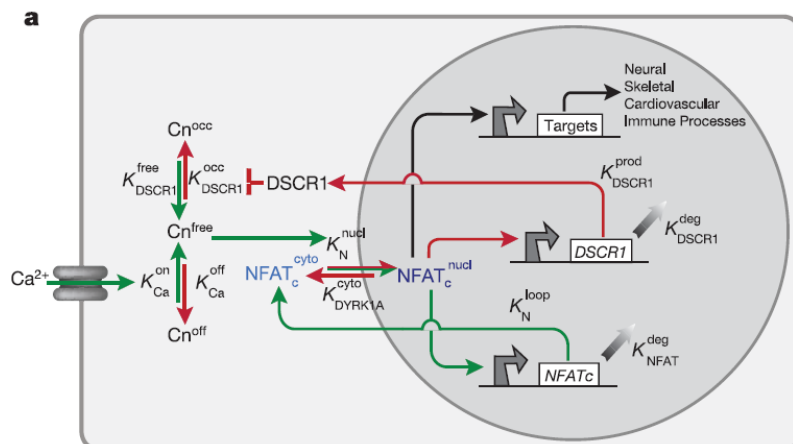


Figure 49 : Le circuit régulateur de NFAT incluant DYRK1A

Les étapes induisant la voie de signalisation NFAT sont illustrées en vert. Celles réprimant la voie, sont notées en rouge. DYRK1A active la retro-translocation nucléaire de NFATc diminuant l'activation de ses gènes cibles (Arron, Winslow et al. 2006).

NFAT (nuclear factor of activated T-cells) est un facteur de transcription impliqué dans la production de cytokines. Il est activé en partie par la Calcineurine, une protéine phosphatase connue pour orchestrer la réponse immune/inflammatoire. Son niveau protéique est augmenté dans les astrocytes localisés dans le cerveau de patients MA et de nombreux modèles murins de la maladie. La voie de signalisation CN/NFAT est particulièrement activée dans les astrocytes en présence de pathogènes typiques de la MA et son hyper-activation dans ce contexte active des programmes de transcription associés au vieillissement cérébral et aux stades précoces de la MA (Norris, Kadish et al. 2005). DYRK1A a été identifiée dans les astrocytes aux abords de plaques amyloïdes (Ferrer, Barrachina et al. 2005). Dans ces cellules, DYRK1A pourrait ainsi moduler la voie CN/NFAT en jouant sur la localisation subcellulaire de NFAT.

Une seconde voie de signalisation, localisée dans les cellules astrocytaires et activée en réponse aux phénotypes associés à la MA, peut ici être évoquée. Il s'agit de la voie JAK/STAT3 connue pour activer la réactivité astrocytaire dans la MA et d'autres maladies neurodégénératives (Ben Haim 2015). En particulier, STAT3 est un facteur de transcription typiquement associé à la production de gènes codant des cytokines lors de processus inflammatoires. L'activation de STAT3 passe par la phosphorylation sur la Tyr705 et son niveau est observé élevé dans le cerveau de souris APP/PS1 et dans des extraits cérébraux post-mortem de patients MA. Son inhibition contribue à diminuer l'apoptose associée à la présence de peptides A β (Wan, Fu et al. 2010). L'implication de DYRK1A dans la voie JAK/STAT3 a été montrée par un groupe japonais dans un modèle de surexpression de la kinase (souris modèle de trisomie 21) en 2015

([Kurabayashi, Nguyen et al. 2015](#)). *In utero*, DYRK1A favorise la différenciation de progéniteurs cellulaires corticaux en astrocytes via la phosphorylation de la protéine STAT3 sur son résidu Ser727. Une donnée pouvant expliquer, en partie, l'astrogliose observée chez les patients atteints de SD.

Le lien entre DYRK1A et les mécanismes d'inflammation a également été montré par un groupe de l'institut Pasteur s'intéressant en premier lieu au régulateur transcriptionnel liant la chromatine : HP1 (heterochromatine protein 1). En phosphorylant l'histone H3 sur la Thr45 et la Ser57, DYRK1A affecte la liaison entre cette histone et les protéines HP1 α , β et λ . Ceci antagonise l'action de la HP1 conduisant à l'activation anormale de gènes codants pour des cytokines telles que l'IL1- α ([Jang, Azebi et al. 2014](#)).

Enfin DYRK1A a été identifiée comme régulateur physiologique de l'équilibre entre lymphocytes T régulateurs (T_{reg}) et effecteurs (Th17). L'homéostasie immunitaire est particulièrement sensible à l'équilibre entre lymphocytes Th17 et T_{reg}. Dans cette étude, l'inhibition de DYRK1A augmente la différenciation en T_{reg} au détriment des Th17. Par cette action, les auteurs observent une atténuation de l'inflammation dans de multiples modèles expérimentaux inflammatoires médiés par l'inhibition de DYRK1A ([Khor, Gagnon et al. 2015](#)).

iv. Régulation de la protéine DYRK1A dans la MA

L'implication de DYRK1A dans la MA est intéressante par la nature de ses substrats protéiques (Tau, ASF, APP, PS1, NFATC ou STAT3). Il est cependant à noter que la plupart des études révélant les cibles de DYRK1A, ont été réalisées dans un contexte de surexpression génique de *Dyrk1A* conduisant à un déséquilibre dès les stades *in utero* de la protéine DYRK1A. Dans les formes sporadiques de la MA, son rôle pourrait être bien différent en fonction de son niveau protéique par exemple.

Pour l'heure, peu d'études rapportent le niveau de DYRK1A dans le tissu cérébral de patients atteints de MA. En plus, les seules études connues illustrent des données contradictoires. L'une d'entre elles, publiée au tout début de ce projet de thèse, doit cependant être mentionnée et pourrait figurer comme LA référence de ce travail, tant elle a orienté ma réflexion. Il s'agit d'une étude biochimique associant observations chez le patient et tests *in vitro*. Les auteurs ont tout d'abord analysé le niveau protéique de DYRK1A dans le cortex frontal de sujets diagnostiqués atteints de MA (Braak V-VI / Tangle score 14), d'âge moyen de 80 ans et de sujets contrôles appariés en âge, tous originaires des Etats-Unis. Dans cette étude, le niveau protéique de DYRK1A est diminué chez les patients MA comparés aux contrôles. Cette diminution est associée à l'augmentation de formes DYRK1A « tronquées » de poids moléculaire proche de 50 kDA,

s'expliquant par l'augmentation de l'activation de la protéase : Calpaïne I. Cette dernière, clive DYRK1A préférentiellement au niveau de la séquence PEST (partie C-terminal) ([Jin, Yin et al. 2015](#)) (**Figure 50**).

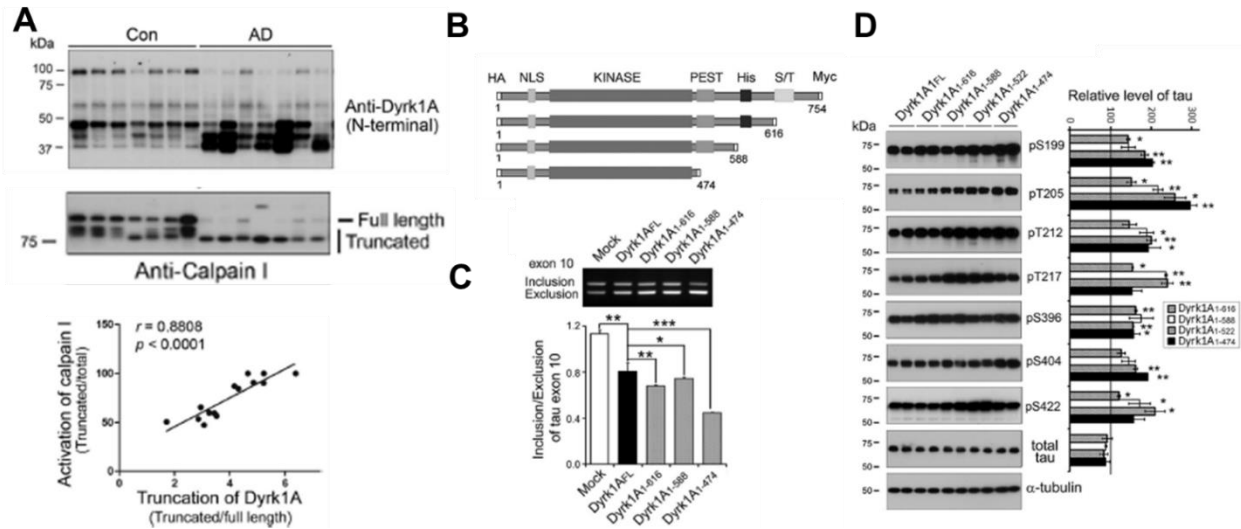


Figure 50 : Identification du mécanisme de troncation de la kinase DYRK1A dans la MA.

(A) Western Blots illustrant la baisse de formes DYRK1A entières et l'augmentation de formes tronquées médiées par l'augmentation de l'activation de la Calpaïne-I dans le cortex frontal de patients MA comparé aux sujets contrôles. (B) Illustration des mutants DYRK1A. (C) Le clivage de la partie C-terminale produit une protéine DYRK1A augmentant sa capacité à exclure l'exon 10 de Tau *in vitro*. (D) Le clivage de la partie C-terminale produit une protéine DYRK1A augmentant sa capacité à phosphoryler Tau *in vitro* ([Jin, Yin et al. 2015](#)).

Dans un second temps, les auteurs ont réalisé des essais fonctionnels de mutants de DYRK1A plus ou moins raccourci de leurs parties C-terminales non-catalytiques. *In vitro*, les formes tronquées en C-ter de DYRK1A augmentent l'inclusion de l'exon 10 (augmentant le ratio 3R/4R) et la phosphorylation de Tau sur certains épitopes (Thr212, Ser 396, Ser422) comparé à la forme native. Cette étude suggère que la troncation de la kinase dans la MA conduit à favoriser la pathologie Tau (**Figure 50**).

Finalement, la baisse de la forme entière de DYRK1A dans le cortex frontal de la cohorte américaine est associée à une baisse plus générale de DYRK1A. En effet, le dosage dans le plasma de DYRK1A grâce à un anticorps ciblant un épitope dans la partie C-terminale est montré diminué dans deux cohortes européennes indépendantes ([Janel, Sarazin et al. 2014](#), [Janel, Alexopoulos et al. 2017](#)). Les auteurs observent une diminution du niveau de DYRK1A plasmatique de patients MA à un stade de démence très léger (basé sur l'indice clinique de démence (CDR = à 0,5)). Combiné au dosage du BDNF, un facteur neurotrophique, et à

l'homocystéine, les auteurs identifient le taux de DYRK1A plasmatique comme un biomarqueur de la MA (Janel, Alexopoulos et al. 2017).

5. Stratégies thérapeutiques ciblant DYRK1A

La protéine kinase, via son activité kinase sur certaines protéines clés dans le développement de la MA, semble être une cible thérapeutique intéressante pour contrecarrer précocement la progression de cette pathologie. Les stratégies visant à diminuer ou à inhiber son activité kinase sont ainsi considérées comme prometteuses et ont d'abord été entreprises dans le contexte pathologique de la trisomie 21.

Nous pouvons principalement identifier deux stratégies. La première passe par l'intermédiaire d'ARN interférant (RNAi). Cette technologie a émergé ces vingt dernières années et consiste à délivrer *in vivo* des vecteurs viraux codant de petits ARNs dégradant l'ARNm de *Dyrk1A*. En conséquence, une diminution importante de protéine DYRK1A est observée dans la région tissulaire comportant le vecteur viral. Une étude utilisant des AAVs (Adeno virus-associated) codants pour des RNAi *Dyrk1A*, montre que la normalisation de la quantité de DYRK1A dans l'hippocampe, suffit pour rétablir la fonction mnésique hippocampe-dépendante chez la souris Ts65Dn, un modèle de trisomie 21 ([Ortiz-Abalia, Sahun et al. 2008](#)). Malgré une efficacité préclinique démontrée, cette stratégie apparaît comme peu compatible avec la clinique. L'administration de ces virus dans le cerveau reste en effet une méthode invasive et coûteuse. De plus, une fois réalisée, leur contrôle n'est plus possible. La seconde stratégie est basée sur l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques. Ces composés pharmacologiques sont sélectionnés en fonction de leurs spécificités, leurs niveaux d'activité inhibitrice et leurs absences d'effets secondaires adverses pour le sujet. Ils doivent, dans l'idéal, être administrable dans l'eau de boisson et passer les barrières intestinales et hématoencéphaliques. Au cours des dix dernières années, nous pouvons lister 4 ou 5 composés très utilisés dans les études chez l'animal de laboratoire. Particulièrement intéressants, ils diffèrent aux niveaux de leur structures, leurs sélectivité, leur puissance ou encore par le fait qu'ils soient soumis ou non à des brevets industriels (**Figure 51**).

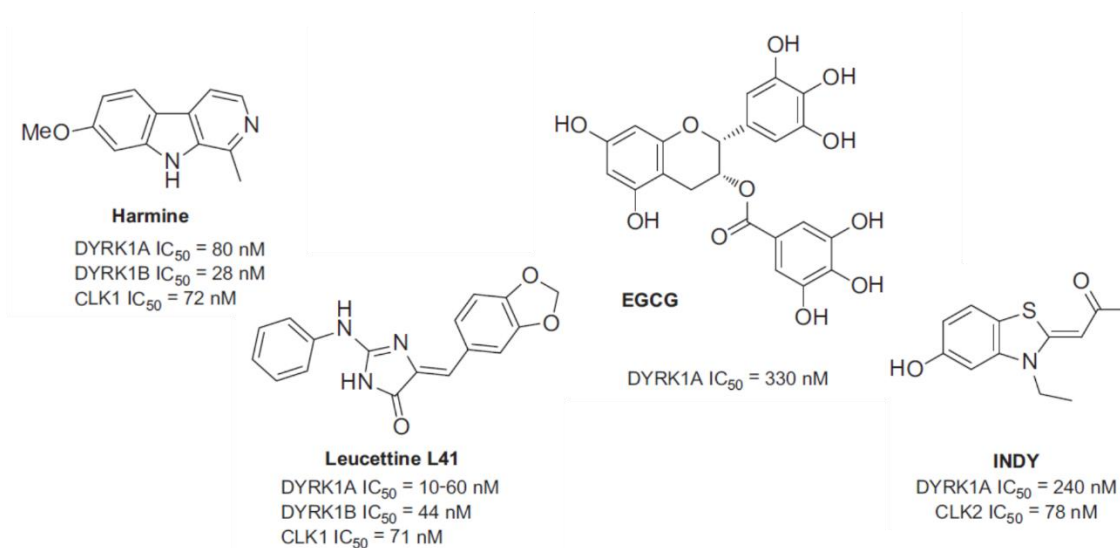


Figure 51 : Exemples d'inhibiteurs de DYRK1A : structures et propriétés pharmacologiques

Structures et propriétés pharmacologiques des principaux composés décrits comme inhibiteurs de l'activité kinase de DYRK1A (Nguyen, Fruit et al. 2017)

i. Famille des β-carbolines et l'exemple de l'Harmine

En 2007, l'université de Dundee (Grande Bretagne) a revendiqué par la communication d'un brevet, l'existence de quatre composés naturels (harmine, harmaline, harmane et harmanol) issus de la famille des alcaloïdes β-carboline, capables d'inhiber l'activité kinase de DYRK1A. Parmi eux, l'harmine (7-methoxy-1-methyl-β-carboline) est décrit comme l'inhibiteur le plus puissant vis-à-vis de DYRK1A (IC₅₀= 80nM) et sélectif si l'on compare la quantité nécessaire pour une concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de son activité à celles de ses principaux homologues (IC₅₀= 900 et 800 nM pour DYRK2 et DYRK3 respectivement).

L'harmine agit comme un inhibiteur compétitif à l'ATP. Plusieurs études réalisées sur des cultures cellulaires font état d'une inhibition dose dépendante de la phosphorylation de plusieurs substrats de DYRK1A par l'harmine avec un blocage total de son activité de phosphorylation à une concentration de 1 μM (Bain, McLauchlan et al. 2003).

L'utilisation de l'harmine *in vivo* n'est pourtant pas souhaitable, puisqu'en plus de son action sur DYRK1A, elle possède un effet inhibiteur important de la monomamine oxydase (IC₅₀=5 nM) et antagonise la sérotonine. Chez l'homme, elle possède un effet hallucinogène, utilisé dans les préparations rituelles et médicinales en Amérique du Sud, Asie centrale ou moyen Orient (Kim, Sablin et al. 1997). Dans le but de supprimer ces effets psychoactifs et délétères, plusieurs

groupes de chimistes travaillent sur la génération d'homologues synthétiques hétérocycles ou dérivés acridine de l'harmine.

ii. Le polyphénol de thé vert : l'EGCG

L'EGCG (épigallocatechine gallate) est un composant majeur des feuilles de thé vert et a été identifié comme un inhibiteur de DYRK1A, cependant moins puissant que l'harmine ($IC_{50}=330$ nM contre 80 nM respectivement) ((Bain, McLauchlan et al. 2003). Sa spécificité est également moindre puisque l'EGCG est capable d'inhiber également une protéine kinase appelée PRAK ou MAPK5 ($IC_{50}= 1000$ nM). Par une série de mutants de DYRK1A, Adeyev et collaborateurs ont identifié le lieu de liaison de l'EGCG sur DYRK1A. Le site de liaison se situerait au niveau des sous-domaines X et XI du domaine catalytique de DYRK1A (lieu des mutations de la kinase de synthèse invalidant son inhibition par l'EGCG). Ainsi, et contrairement à l'harmine, l'EGCG inhiberait DYRK1A par un mécanisme non-compétitif à l'ATP([Adayev, Wegiel et al. 2011](#)).

Compte tenu de sa spécificité moindre par rapport à l'harmine par exemple, les cibles protéiques de l'EGCG sont débattues. Son utilisation est malgré tout efficace d'un point vue biochimique, anatomique et/ou fonctionnelle chez un modèle surexprimant uniquement *Dyrk1A* ou d'autres surexprimant de 5 à plus de 200 gènes supplémentaires du HSA21 ([Guedj, Sebrie et al. 2009](#), [Souchet, Guedj et al. 2015](#), [Stagni, Giacomini et al. 2015](#), [McElyea, Starbuck et al. 2016](#)). Ces études précliniques ont été suivies par un essai clinique chez des adolescents atteints de SD. L'EGCG apparait ici comme bien tolérée par les participants et sans effets adverses. De façon intéressante, elle est associée à une amélioration de certaines fonctions cognitives ([de la Torre, de Sola et al. 2016](#))(**Figure 52**).

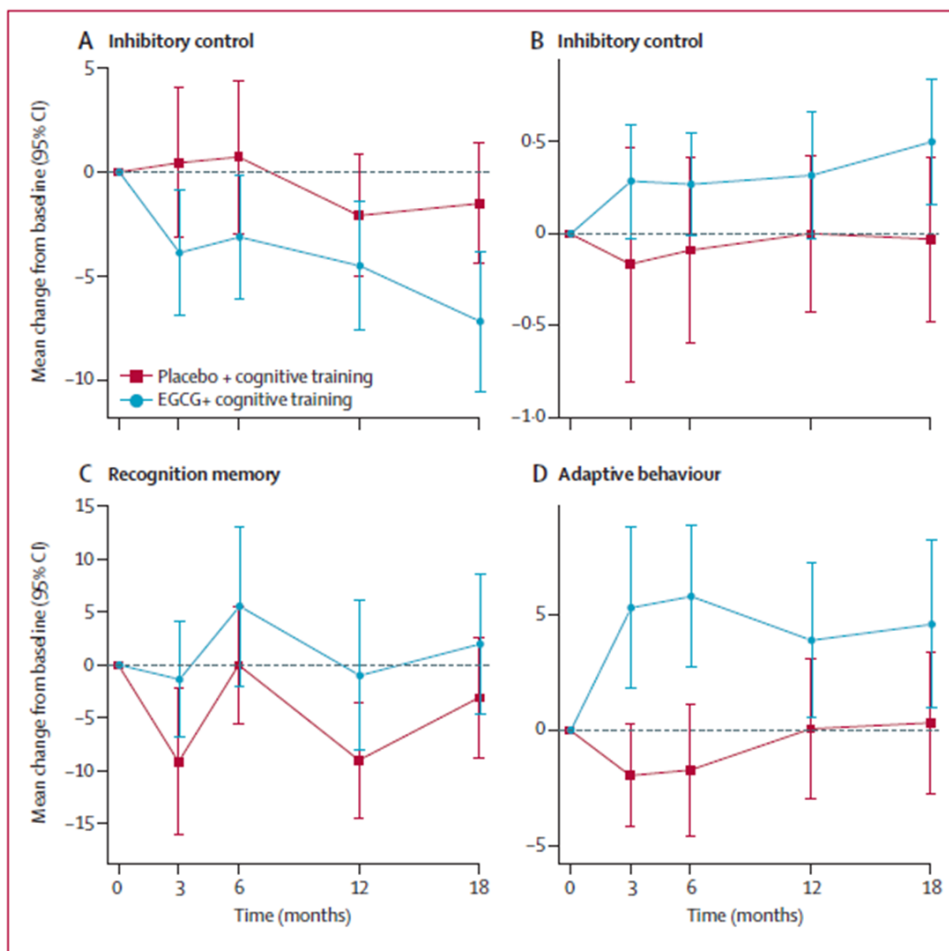


Figure 52 : Utilisation de l'EGCG pour traiter les déficits cognitifs de personnes porteuses de T21

Effets bénéfiques de l'EGCG associée à un entraînement des facultés cognitives sur les performances neurocognitives et le comportement adaptatif d'adolescent avec SD (de la Torre, de Sola et al. 2016).

Le potentiel thérapeutique de l'EGCG dans la MA a été développé dans une revue parue récemment ([Cascella and Bimonte 2017](#)). Pour les auteurs, l'EGCG est considéré comme une molécule d'intérêt dans la prévention et le traitement de cette maladie via ses propriétés anti-inflammatoires, anti-oxydatives et ses effets protecteurs contre les dommages neuronaux et cérébraux. En particulier, l'EGCG est capable de supprimer l'expression de TNF- α , IL-1 β et IL-6 microgliale induite par l'ajout de peptides A β *in vitro*. *In vivo*, l'EGCG module le métabolisme de l'APP conduisant à diminuer la charge en plaques amyloïdes cérébrales. Son impact sur l'activité kinase de DYRK1A n'est cependant pas énoncé preuve que son manque de spécificité envers cette kinase est un inconvénient majeur. Un point est malgré tout à noter. Il semblerait que l'EGCG

soit rapidement métabolisé après administration orale étant donné qu'il n'a jamais été identifié au niveau cérébral. Une hypothèse voudrait que l'EGC (epigallocatechine) soit le métabolite le plus représentatif. Dès lors, des études visant à déterminer l'IC₅₀, la spécificité et le site de liaison à DYRK1A de ce métabolite devraient être entreprises dans un futur proche.

iii. La famille des imidazolones : exemple de la Leucettine L41

En 2009, des chimistes de l'université de Rennes et du CNRS ont déposé un brevet sur la synthèse d'imidazolones dérivés des Leucettamine B, un alcaloïde d'origine naturel isolé d'éponge marine. Parmi plusieurs homologues de synthèse, la Leucettine L41 a été sélectionnée ([Debdab, Carreaux et al. 2011](#), [Tahtouh, Elkins et al. 2012](#)). La Leucettine L41 inhibe DYRK1A, DYRK1B, DYRK2 et une autre protéine nommée CLK1 avec des IC₅₀ égales à 10-60, 44, 73 et 71 nM respectivement. Elle apparaît comme un inhibiteur compétitif à l'ATP au même titre que l'harmine, par exemple.

Dès le début de ma thèse, des effets bénéfiques associés à l'utilisation de la Leucettine L41 ont été reportés dans certains modèles physiopathologiques. Ainsi, son utilisation en traitement chronique d'une durée d'un mois est associée à la prévention des défauts de mémoire de travail chez un modèle de souris surexprimant *Dyrk1A* (Meijer L, données en cours de publication). En 2015, Naert et collaborateurs ont souligné l'efficacité de la L41 dans un modèle de souris non-transgénique, produit par injection intra-cérébrale de peptides amyloïdes de synthèse (Aβ₂₅₋₃₅). L'apoptose neuronale, le stress oxydatif et la perte synaptique résultant de ces injections toxiques sont prévenus par co-administration de Leucettine L41. Fonctionnellement, les souris injectées à l'Aβ₂₅₋₃₅ et traitées à la Leucettine L41 montrent une mémoire de travail et une mémoire à long terme proche des souris contrôles au contraire de leurs congénères injectés sans Leucettine L41 ([Naert, Ferre et al. 2015](#)).

iv. Dérivés de benzothiazole et le composé INDY

Les cycles benzothiazole sont présents dans de nombreux composés naturels ou synthétiques. INDY (inhibitor of DYRK1A) pour [(Z)-1-(3-Ethyl-5-hydroxy-2(3H)-benzothiazolylidene)-2-propanone]] est l'un des plus puissants dérivés des benzothiazoles connus et analogue structural du TG003. Ces deux molécules ont initialement été décrites et brevetées comme des inhibiteurs de CLKs (CLK2 IC₅₀= 20 et 78 nM pour TG003 et INDY respectivement). En 2010, Kinopharma (Japon) et Sirtris Pharmaceuticals, Inc. (Etats-Unis) ont publié une étude décrivant le développement des INDY comme nouveaux inhibiteurs sélectifs de DYRK1A (IC₅₀=240 nM). Le proINDY, INDY interagit sur le site catalytique de la kinase comme compétitif à

l'ATP mais inhibe DYRK1B ($IC_{50}=220nM$). INDY reverse la phosphorylation aberrante des protéines Tau et diminue la répression de NFAT, induite par la surexpression de *Dyrk1A in vitro*. *In vivo*, ces phénotypes sont associés à une embryogenèse normale chez le Xenopus. L'avantage majeur de l'INDY, comparé à l'Harmine, est qu'il ne cible pas la monoamine oxydase ([Ogawa, Nonaka et al. 2010](#)).

v. *Inhibiteur de DYRK1A post-transcriptionnel*

Enfin, un dernier composé est à évoquer compte-tenu de son originalité. Il s'agit de la molécule FINDY, sélectionnée par un groupe japonais qui, contrairement aux inhibiteurs de l'activité kinase de DYRK1A cités plus haut, supprime l'autophosphorylation du résidu Ser⁹⁷ de la kinase. Cette autophosphorylation est nécessaire à la maturation de la kinase. Ainsi, FINDY active la dégradation de DYRK1A via le protéasome par suppression de son autophosphorylation. Ce composé a une spécificité relative puisque DYRK1B et DYRK2 ne sont pas affectées par FINDY. Cependant, FINDY n'inhibe pas l'activité kinase de DYRK1A mais montre une activité inhibitrice sur différentes kinases incluant GSK3- β , MARK4, PIM1, PIM3 et PLK3. Fonctionnellement, FINDY restaure les défauts d'embryogénèse chez le Xenope via la répression de NFAT médiée par la surexpression de *Dyrk1A* de la même façon que INDY par exemple (**Figure 53**) ([Kii, Sumida et al. 2016](#)).

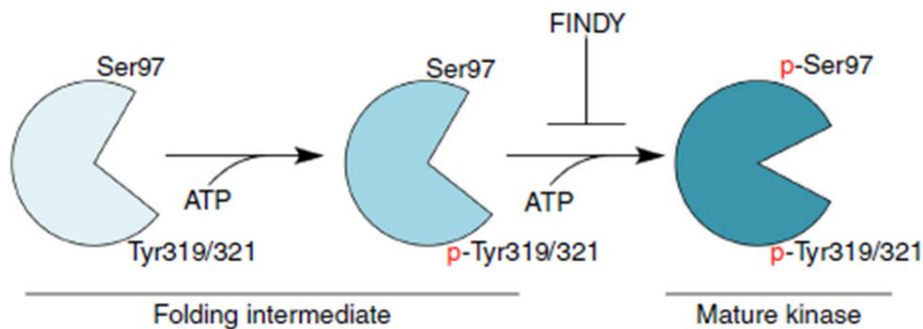


Figure 53 : Modèle d'inhibition sélective de DYRK1A en ciblant son processus de repliement.

Le processus de maturation de DYRK1A est tel que la kinase s'autophosphoryle sur ses résidus Tyr319 et 321 puis sur sa Ser97. FINDY intervient comme supprimeur de l'autophosphorylation en Ser97, stoppant la maturation de la kinase et activant sa dégradation dépendante du protéasome (Kii, Sumida et al. 2016).

Cette dernière partie nous renseigne sur l'intérêt de DYRK1A comme cible thérapeutique pour le traitement de maladies neurodégénératives et en particulier de la MA. De nombreux inhibiteurs ont été identifiés et montrés comme efficaces dans plusieurs études in vitro et in vivo le plus souvent dans un contexte biologique de surexpression de Dyrk1A. Nous avons noté certaines différences en fonction de leurs structures, leurs modes d'inhibition mais également leurs puissances et leurs spécificités vis-à-vis de DYRK1A.

Dans ce travail de thèse, le choix du composé utilisé pour étudier l'implication de DYRK1A dans la MA est crucial. Aucun de ces composés ne semble parfait, nous notons que la plupart d'entre eux possèdent une compatibilité clinique toute relative, si l'on exclut l'EGCG. Ils ne sont pas solubles dans l'eau, ne passent pas la barrière intestinale et l'un d'entre eux (l'harmine) produit même de graves effets secondaires. In vivo, ils doivent être administrés par injection intrapéritonéale (ip) et additionnés de solvants permettant leurs solubilités. L'EGCG, bien que très bien tolérée et cliniquement compatible, n'est pas idéale pour une étude précise du rôle de DYRK1A dans la MA compte tenu du manque de spécificité vis-à-vis de notre protéine d'intérêt. Ainsi, la spécificité du composé constitue un second critère d'intérêt et doit être considéré en fonction de la région tissulaire étudiée. Les autres kinases cibles de ces molécules ne sont pas toutes présentes dans le tissu cérébral. Par exemple, DYRK1B ou DYRK2 sont souvent inhibées par les mêmes composés ciblant DYRK1A mais ne sont pas exprimées dans le cerveau au contraire de GSK3- β ou certaines MAPKs ou PARKs.

En fonction de ces critères, le choix de molécules synthétiques issues des Leucettamine B, comme la Leucettine L41, semble relevant dans notre cas. En plus de DYRK1A, elles inhibent également la DYRK1B, DYRK2 et CDK1, dont le niveau

d'expression protéique cérébral est nul (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CLK1&keywords=CLK>). En plus, la puissance d'inhibition de ce composé vis à vis de DYRK1A est importante et deux études montrent une bonne tolérance chez l'animal.

TRAVAIL DE THESE

L'espérance de vie a considérablement augmenté ces dernières décennies en raison des améliorations générales du mode de vie et du développement de thérapies salvatrices. Cette transition démographique caractérisée par un vieillissement de la population conduit à une prévalence accrue de maladies telles que les cancers et les démences. Pour le traitement des cancers, de nombreuses options existent, telles que la chirurgie, la radiothérapie, la pharmacologie et les traitements hormonaux. Une véritable médecine personnalisée est maintenant rendue possible par le développement d'imagerie médicale poussée et l'identification de biomarqueurs des premières cellules cancéreuses. Aujourd'hui, la prise en charge idéale d'un cancer se traduit par l'identification précoce de cellules cancéreuses et leurs traitements avant même l'apparition de conséquences symptomatiques.

Nous l'avons souligné dans cette introduction, la prise en charge médicamenteuse de la démence de type Alzheimer est bien différente. Elle est actuellement limitée à des effets symptomatiques trop peu efficaces en dépit d'un nombre non-négligeable d'essais cliniques coûteux. Plusieurs raisons sont évoquées pour expliquer leurs échecs : (i) un manque de connaissances des mécanismes impliqués dans la progression de la MA – en particulier sur le rôle de facteurs accentuant ou limitant les deux pathologies de la MA connues : l'A β et Tau et (ii) une prise en charge trop tardive des patients – expliquée par l'absence d'outils permettant leur identification bien avant l'apparition des premiers signes cliniques.

Comme avancé dans cette introduction, de nombreuses preuves soutiennent l'idée que la protéine kinase DYRK1A intervient dans la progression de la MA en interagissant avec les pathologies de l'A β et de Tau, mais son rôle précis dans cette maladie est encore très mal compris. Mon travail de thèse vise donc à comprendre son rôle dans la longue progression de la pathologie Alzheimer : de sa phase préclinique, où les éléments toxiques s'expriment dans le cerveau sans effet fonctionnel quantifiable chez l'Homme, jusqu'à sa phase clinique, où son expression clinique est définie par des éléments toxiques agrégés associés à de graves problèmes comportementaux caractéristiques de la démence Alzheimer telle qu'elle a été historiquement décrite. Ce travail est composé de trois objectifs intermédiaires, que j'ai souhaité présenter dans ce manuscrit sous la forme de trois articles.

(Article 1) L'analyse de la phase préclinique de la pathologie Alzheimer nous est aujourd'hui impossible. Dans une première étude, nous tâcherons donc de :

- caractériser la régulation de DYRK1A dans le cerveau de patients atteints de MA, à un stade clinique et de sélectionner, au regard des résultats obtenus, le composé pharmacologique le plus pertinent,

- évaluer les conséquences de ce composé chez un modèle murin reproduisant, en partie, la phase clinique de la MA.

(Article 2) Le développement d'outils diagnostiques permettant l'identification des patients atteints de la forme « asymptomatique à risque » de la MA sporadique pourrait ouvrir la voie à une prise en charge thérapeutique précoce. L'une des stratégies pour atteindre ce but, passe par la modélisation chez l'animal de la pathologie Alzheimer dans son ensemble et en particulier de sa phase préclinique. En se basant sur la preuve de concept obtenue chez la souris AAV-APP/PS1, obtenue par l'équipe, nous proposerons de :

- valider cette modélisation par transfert de gènes chez le rat, un animal exprimant de nombreux avantages par rapport à la souris,
- réaliser une étude longitudinale pour étudier l'effet du vieillissement sur la pathologie que nous apportons de manière exogène.

(Article 3) En se positionnant de manière complémentaires aux modèles murins transgéniques, ce nouvel outil permettra dans le futur d'évaluer des thérapies potentiellement efficaces pour stopper la MA bien avant son expression clinique. Cette phase préclinique humaine a ici été appelée « phase silencieuse ». Ainsi, la troisième et dernière étude aura pour objectif de :

- caractériser la régulation de DYRK1A lors de la phase silencieuse de la MA,
- évaluer les conséquences potentielles de la modulation pharmacologique de DYRK1A lors de la phase préclinique de la MA.

RESULTATS

I. Article 1 : Compréhension et modulation pharmacologique de l'homéostasie de DYRK1A lors de la phase clinique de la MA



Journal:	<i>Brain</i>
Manuscript ID	BRAIN-2018-00974
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	01-Jun-2018

Inhibition of DYRK1A proteolysis modifies its kinase specificity and rescues Alzheimer phenotype in APP/PS1 mice

Benoît Souchet^{1,2#}, Mickael Audrain¹, Jean Marie Billard³, Julien Dairou⁴, Romain Fol¹, Nicola Salvatore Orefice¹, Satoru Tada¹, Yuchen Gu³, Gaelle Dufayet-Chaffaud¹, Emmanuelle Limanton⁵, François Carreaux⁵, Jean-Pierre Bazureau⁵, Sandro Alves¹, Laurent Meijer⁶, Nathalie Janel⁷, Jérôme Braudeau^{1,8*#}, and Nathalie Cartier^{1,2*#}

¹ INSERM UMR1169, Fontenay-aux-Roses, 92265, France.

² Université Paris Saclay, Saclay, France.

³ INSERM UMR894, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

⁴ UMR 8601 CNRS, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, 75270, Paris, France

⁵ Université de Rennes 1, Laboratoire Sciences Chimique de Rennes, UMR CNRS 6226, Groupe ICMV, Rennes, 35042, France.

⁶ ManRos Therapeutics, Hôtel de Recherche, Centre de Perharidy, 29680, Roscoff, France.

⁷ Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité, Adaptive Functional Biology, UMR CNRS 8251, Paris, France.

⁸ CEA, DRF Institut François Jacob, MIRCen, Fontenay-aux-Roses, 92265, France

* Indicates joint last authors

Correspondence should be addressed to BS (benoit.souchet@gmail.com), JB (jerome.braudeau@agent-biotech.com) and NC (nathalie.cartier@inserm.fr)

Abstract

Recent evidences suggest the involvement of DYRK1A (dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1 A) and of its kinase activity in Alzheimer's disease (AD). We show that DYRK1A undergoes a proteolytic processing in AD patients hippocampus. The resulting truncated forms accumulate in astrocytes. Interestingly, we show that this cleavage does not change DYRK1A global kinase activity. However truncated forms of DYRK1A exhibit strongly increased affinity towards STAT3 α , a regulator of inflammatory process. These findings were confirmed in APP/PS1 amyloid model of AD, suggesting that this DYRK1A cleavage is a consequence of the amyloid pathology. We identified *in vitro* the Leucettine L41 as a compound able to prevent DYRK1A proteolysis in both human and mouse protein extracts. We then show that intraperitoneal injections of L41 in aged APP/PS1 mice were able to inhibit STAT3 α phosphorylation and reduce the levels of pro-inflammatory cytokines (IL1- β , TNF- α and IL-12), with consequent increased microglial recruitment around amyloid plaques and decreased amyloid- β plaque burden. Importantly, L41 treatment improved synaptic plasticity and rescued memory functions in APP/PS1 mice. Collectively, our results suggest that DYRK1A may contribute to AD pathology through its proteolytic process, reducing its kinase specificity. Further evaluation of inhibitors of DYRK1A truncation promises a new therapeutic approach for AD.

Introduction

Despite considerable academic and pharmaceutical investments during the last three decades, there is still no effective treatment for Alzheimer's disease (AD). AD neuropathology is mostly defined by the accumulation of amyloid-beta ($A\beta$) plaques and neurofibrillary tangles (NFTs) in patient brains. Extracellular $A\beta$ plaques are mainly formed by the aggregation of amyloid peptides ($A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$) whose production and accumulation are key elements in AD development ([Hardy and Selkoe 2002](#)). Intracellular NFTs are composed of aggregated hyper- and abnormal phosphorylated Tau proteins. Accumulating data from preclinical and clinical studies have established that several immune system-mediated factors, mainly driven by glial cells, also contribute to AD pathogenesis. Astrocytes and microglia surround amyloid plaques and release cytokines leading to inflammatory processes whose dysregulation contribute to and aggravate AD pathology ([Serpente, Bonsi et al. 2014](#)) ([Simard, Soulet et al. 2006](#)) ([Heneka, Carson et al. 2015](#)).

Dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A), encoded by a gene localized in the Down syndrome critical region of chromosome 21, is a serine/threonine protein kinase which contributes to various biological processes in the embryonic and adult central nervous systems ([Smith, Medda et al. 2012](#)). In AD, DYRK1A is especially known to phosphorylate Tau at several sites including Thr181, Thr212, and Thr231, which are all observed in NFTs of AD brains ([Woods, Cohen et al. 2001](#), [Liu, Liang et al. 2008](#), [Rudrabhatla, Jaffe et al. 2011](#)) and the amyloid precursor protein (APP) at Thr-668 ([Ryoo, Cho et al. 2008](#)), the presenilin 1 (PS1) at Thr-354 ([Ryu, Park et al. 2010](#)). DYRK1A also phosphorylates several immune response mediators associated with AD, including calcineurin-nuclear factor of activated T cells (NFAT) ([Arron, Winslow et al. 2006](#)) and signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) ([Kurabayashi, Nguyen et al. 2015](#)). Recent study showed that DYRK1A inhibition reduces APP phosphorylation and insoluble Tau phosphorylation and thereby reverse cognitive deficits in AD mice ([Branca, Shaw et al. 2017](#)). However, DYRK1A protein levels in AD brain are unclear ([Ferrer, Barrachina et al. 2005](#), [Jin, Yin et al. 2015](#)) while level of its kinase activity is unknown. Thus, the relevance of inhibiting kinase activity of DYRK1A in AD remains a matter of debate.

Here, we show that DYRK1A is truncated in the AD context. This increase of truncated forms of DYRK1A (DYRK1A_T) is associated with a decrease of full-length form of DYRK1A (DYRK1A_{FL}) confirming previous report by Jin and colleagues ([Jin, Yin et al. 2015](#)). This was observed in hippocampus from AD patients and APP/PS1 mice, an amyloid mouse model of AD ([Jankowsky, Fadale et al. 2004](#)). We demonstrated for the first time that this proteolysis is located

in astrocytes and that it is not associated with a modification of the global DYRK1A kinase activity in AD. *In vitro*, we show that, compared to DYRK1A_{FL}, DYRK1A_T exhibit stronger affinity toward STAT3α. We identified Leucettine L41, derived from the marine sponge alkaloid Leucettamine B ([Debdab, Carreaux et al. 2011](#), [Tahtouh, Elkins et al. 2012](#)), as an appropriate compound to inhibit DYRK1A proteolysis. To decipher the effects of DYRK1A proteolysis and its inhibition *in vivo*, we treated APP/PS1 mice with the Leucettine L41. We show that L41 prevents DYRK1A proteolysis and reduces the level of STAT3α phosphorylation in APP/PS1 mice. Neuroinflammation, amyloid plaque load, synaptic plasticity and cognitive functions are improved. Altogether, our results confirm the involvement of DYRK1A_T in AD pathology and demonstrate the relevance of inhibitors of DYRK1A cleavage as a potentially relevant therapeutic strategy.

Material and Methods

Human brain samples. Postmortem samples were obtained from brains collected as part of the Brain Donation Program of the GIE-Neuro-CEB Brain Bank. Autopsies were carried out by accredited pathologists after receiving informed consent from the relatives, in accordance with French Bioethics laws. Hippocampal samples from four patients with sporadic forms of AD (male and female; (Braak V-VI, Thal IV-V); aged between 69 and 89 years, with a postmortem interval (PMI) of 30 to 59 hours) and four age-matched control subjects (male and female, aged between 69 and 89 years, PMI of 6 to 63 hours) were used in this study (See below Table 1).

Gender	Age (yrs)	PMI (hrs)	Clinical AD status	Diagnosis
M	73	54	Braak V, Thal IV, CAA	AD
F	89	59	Braak VI, Thal V, CAA	AD
M	70	30	Braak VI, Thal V, CAA	AD
M	69	30	Braak VI, Thal V, CAA	AD

Mean	M (75%)	75,25	43,25	Braak VI, Thal V, CAA	AD
------	---------	-------	-------	-----------------------	----

M	58	6	Braak I-II	Ctrl
M	82	63	Braak II, Thal I	Ctrl
F	89	12	/	Ctrl
M	69	6	/	Ctrl

Mean	M (75%)	74,5	21,75	Braak I, Thal I	Ctrl
------	---------	------	-------	-----------------	------

Animals. Fourteen APP^{swe}/PS1^{ΔE9} mice (referred to as APP/PS1; Jackson Laboratories) and 12 age-matched littermate control mice were used for behavioral (Morris Water Maze), pathology, and biochemistry studies. A second cohort composed of 14 APP/PS1 and nine littermates were used for behavioral (Y-maze) and electrophysiological analysis. APP/PS1 mice

express the human APP gene carrying the Swedish double mutation (K595N/M596L). In addition, they express the human PS1 Δ E9 variant lacking exon 9 ([Jankowsky, Fadale et al. 2004](#)). Only male mice were used. The ages at treatment and analysis/sacrifice are given in the Results section. All experiments were conducted in accordance with the ethical standards of French, German, and European regulations (European Communities Council Directive of 24 November 1986). The supervisor of in vivo studies (J Braudeau) received official authorization from the French Ministry of Agriculture to carry out research and experimentation on animals (authorization number APAFIS#4449-2016031012491697).

Tissue collection and sample preparation. Mice were anesthetized with ketamine/xylazine and decapitated. One hemisphere was post-fixed by incubation for 72 h in 4% PFA, cryoprotected in 30% sucrose in PBS, and cut into 40 μ m sections with a freezing microtome (Leica) for histological analyses. The contralateral hemisphere was dissected for isolation of the hippocampus. Samples were homogenized in a lysis buffer (150 mM NaCl and 1% Triton in Tris-buffered saline) containing phosphatase (Pierce) and protease (Roche) inhibitors and centrifuged for 20 min at 15000 x g. The same procedure was applied to human samples.

Leucettine L41 treatment. The pre-weighed compound was dissolved in DMSO/PEG300/water (5/35/60) to a final concentration of 2 mg/mL for a dose of 20 mg/kg. The formulation was prepared on the day of the in vivo experiment. The mice received five intraperitoneal injections per week for four weeks.

DYRK1A in vitro proteolysis. Human hippocampus tissue and 4 months-aged mouse (C57Bl6) hippocampus were homogenized in 9 volumes of buffer consisting of 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 8.5% sucrose, 10 mM β -mercaptoethanol, 2.0 mM EDTA, followed by centrifugation at 16,000 x g at 4 °C for 10 min. The supernatants were incubated in the presence or absence of various concentrations of Ca²⁺ with or without Harmine, Leucettine Leul or Leucettine L41 at various concentrations for 10 min at 30 °C. The reactions were terminated by the addition of 4-fold concentrated SDS-PAGE sample buffer, followed by heating in boiling water for 5 min. The products of proteolysis were analyzed by Western blots developed with antibody to DYRK1A.

Identification of DYRK1A interactions. Homogenized total proteins from mouse hippocampus tissue were incubated with 2 mM EDTA, 0 or 2 mM of Ca²⁺ and 0 or 1 μ M of Leucettine L41 during 10 minutes at 30°C. 200 μ g of total proteins were incubated with 2 μ g of α -DYRK1A-Nter antibody (DYRK1A D1694) overnight at 4°C. The proteins interacting with DYRK1A

were revealed by Western blots developed with STAT3 (1/1000, Cell Signaling), NFATc1 (1/1000, Cell Signaling), APP, Tau and PS1.

Western blotting. Equal amounts of protein (30 µg) were separated by electrophoresis in NuPAGE Bis-Tris Gels (Life Technologies) and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were hybridized with various primary antibodies (DYRK1A 7D10 (1/250, Abnova), DYRK1A D1694 (1/500, Sigma), GFAP (DAKO, 1/4000), Vimentin (1/1000, Abcam), pSTAT3(Y705) (1/1000, Cell Signaling), STAT3 (1/1000, Cell Signaling), IBA1 (1/2000, Wako), CD68 (1/1000, BioLegend), IDE (1/200, Santa Cruz), TREM2 (R&D Systems, 1/500), GAPDH (1/1000, Abcam)). Various secondary antibodies were also used (ECL Anti-mouse horseradish peroxidase linked, 1/2000, GE Healthcare; ECL Anti-rabbit horseradish peroxidase linked, 1/2000, GE Healthcare). Membranes were developed using enhanced chemiluminescence (Thermo Fisher Scientific). Signals were detected with Fusion FX7 (Vilber Lourmat) and analyzed and quantified using ImageJ (NIH).

ELISA. For quantification of inflammatory cytokines and interleukin concentrations, we used the MSD Mouse V-PLEX Plus Proinflammatory Panel 1 kit (Meso Scale Diagnostics). Extracted soluble Aβ forms were quantified with the MSD Human and rodents V-Plex Plus Aβ Peptide Panel 1 (4G8) (Meso Scale Diagnostics). ELISA was performed according to the kit manufacturer's instructions in each case.

Calpain activity. Calpain activity was measured using the fluorogenic peptide N-Succinyl-Leu-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin as described by Kohli et al. ([Kohli, Gao et al. 1997](#)). Briefly, 60 µg brain extract in a final volume of 40 µL was added to 160 µL 50 µM N-Succinyl-Leu-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin dissolved in dimethyl sulfoxide and Tris buffer (100 mM Tris-HCl, 145 mM NaCl at pH 7.3). Proteolysis of the substrate was monitored for 21 min at room temperature with a FlexStation3 multi-mode microplate reader (excitation: 380 nm, emission: 460 nm; Molecular Devices) either in the presence of 10 mM Ca²⁺ or 10 mM EGTA to determine calcium-independent activity, thus excluding cathepsin activity.

DYRK1A kinase activity assay. Catalytic activity of total and endogenous DYRK1A was assessed using high-performance liquid chromatography (HPLC), based on the separation and quantification of specific fluorescent peptides (substrate and phosphorylated product), as previously described ([Bui, Tabouy et al. 2014](#)).

Immunohistochemistry and image acquisition. Cryosections were washed with 0.25% Triton in 0.1M PBS, incubated in an 88% formic acid solution for 15 min (antigen retrieval), and

saturated by incubation in 0.25% Triton in 0.1 M PBS/5% goat serum. They were then incubated with primary antibodies (DYRK1A 7D10 (1/100, Abnova), DYRK1A D1694 (1/100, Sigma), GFAP (DAKO, 1/2000), APP 4G8-Biotin, (1/1000, Covance), IBA1 (1/500, Wako). For non-fluorescent immunostaining, endogenous peroxidase was quenched with PBS containing 3% H₂O₂ for 5 min, followed by amplification using the ABC system (VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Horseradish peroxidase conjugate and 3,3'-diaminobenzidine were then used according to the manufacturer's manual (Vector® DAB, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The sections were mounted, dehydrated by passing twice through ethanol and toluol solutions, and cover-slipped with Eukitt (O. Kindler). Images were captured with a Leica DM6000 microscope and analyzed using ImageJ software (NIH). For fluorescent immunostainings, slices were incubated with secondary Alexa Fluor conjugated antibodies (Invitrogen). Slices were stained with DAPI (1/5000, Sigma), mounted in Vectashield fluorescent mounting media (Vector laboratories) and conserved at 4°C. Images were captured with a Leica SP8 confocal microscope (Leica) and analyzed using ImageJ software (NIH). Laser power, numeric gain, and magnification were kept constant between animals to avoid potential technical artefacts. Images were first converted to 8-bit gray scale and binary thresholded to highlight positive staining. At least three sections per mouse (between -1.7 mm to -2.3 mm caudal to Bregma) were quantified. The average value per structure was calculated for each mouse. For quantification of Iba1 and GFAP immunoreactivity around plaques, a region of interest (ROI) was drawn around the center of the plaque. The diameter of the circular ROI was set to two times the diameter of the plaque. Mean fluorescence intensity values were measured for either DYRK1A (7D10) (α -DYRK1A-Cter), DYRK1A (D1694) (α -DYRK1A-Nter) Iba1, or GFAP immunoreactivity and were processed using Icy software (Institut Pasteur, Paris, France). Experiments and data analysis were performed blind with respect to treatments and genotypes.

Behavioral assessment. Y-maze. Experiments were performed in a maze consisting of three transparent plastic arms, 46 x 11 x 25 cm each, set at a 120° angle relative to each other. During the first trial, mice could freely explore two arms, called familiar arms (FA), for 3 min, whereas the third arm was blocked by an opaque door. Assignment of arms was counterbalanced randomly within each experimental group to avoid any preference-related bias. Mice were then returned to their home cage for 5 min. Finally, mice were returned to the maze and allowed to explore all three arms, including the novel arm (NA), for 3 min. The maze was carefully cleaned with a 70% ethanol solution between each exploration phase to remove any olfactory cues. EthoVision software was used for recording and analysing each exploration trial.

Morris Water Maze. Experiments were performed in a tank 180 cm in diameter and 50 cm deep, filled with opaque water maintained at 21°C, equipped with a platform of 18 cm in diameter, submerged 1 cm below the surface of the water. Visual clues were positioned around the pool and luminosity was maintained at 350 lux. The mice were initially exposed to a learning phase, which consisted of daily sessions (three trials per session) on five consecutive days. The starting position varied pseudo-randomly, between the four cardinal points. There was a mean interval of 20 min between trials. The trial was considered to have ended when the animal reached the platform. Long-term spatial memory was assessed 72 and 120 hours after the last training trial in a probe trial in which the platform was no longer available. Animals were monitored with EthoVision software.

Ex vivo electrophysiology. Slice preparation. Mice were anesthetized with halothane and decapitated. The brain was rapidly removed from the skull and placed in chilled (0-3°C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing 124 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.5 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 26.2 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄, and 11 mM glucose. Transverse slices (300-400 μm thick) were cut with a vibratome and placed in ACSF in a holding chamber, at 27°C, for at least one hour before recording. Each slice was individually transferred to a submersion-type recording chamber and submerged in ACSF continuously superfused and equilibrated with 95% O₂, 5% CO₂.

Extracellular field recordings. Electrically induced long-term potentiation (LTP) was studied. Theta-burst stimulation (TBS), mimicking the natural stimulation at the theta frequency from the medial septum to the hippocampus, consisting of five trains of four 100 Hz pulses each, separated by 200 ms, was applied at the test intensity. The sequence was repeated three times, with an interburst interval of 10s. Testing with a single pulse was then performed for 60 min (TBS) or 75 min (3 x 100 Hz), to determine the level of LTP.

Statistical analysis. Data are expressed as the mean ± SEM. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism (GraphPad Soft-ware, La Jolla, CA, USA) or Statistica (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) software. Statistical significance was set to a P-value < 0.05 for all tests. One-way ANOVA and Tukey's post-hoc tests were used to determine the significance of differences between groups. Student's t test was used when only two groups were analyzed.

Results

DYRK1A_T is detected in astrocytes of Alzheimer's disease patients.

We evaluated DYRK1A proteolysis in hippocampal biopsies from AD patients (Braak V-VI, Thal IV-V) (n = 4) and age-matched controls (n = 4). Using the anti-DYRK1A antibody 7D10 (named after α -DYRK1A-Cter) targeting the C-terminal region of DYRK1A, we observed decreased levels of DYRK1A in AD patients compared to controls ($p < 0.05$) (**Fig. 1A, B**). DYRK1A can be cleaved by calpains ([Jin, Yin et al. 2015](#)), calcium-activated cysteine proteases highly activated in AD brain ([Lee, Kwon et al. 2000](#)). Here, we found that calpain activity was two-fold higher in AD cases compared to controls ($p = 0.0571$) (**Fig. 1C**) and significantly correlated with DYRK1A protein levels (correlation coefficient $r = -0.94$, $p < 0.0005$) (**Fig. 1D**). However, we observed no difference in total endogenous DYRK1A catalytic activity using high-performance liquid chromatography (HPLC) ([Bui, Tabouy et al. 2014](#)) (**Fig. 1E**). Next, we performed western blots using the D1694 antibody targeting the N-terminal region of DYRK1A (named after α -DYRK1A-Nter). We observed decreased levels of the full-length form of DYRK1A (DYRK1A_{FL}, 90 kDa) associated to an increase of the truncated form (DYRK1A_T, 50 kDa) in the hippocampus of AD patients (**Fig. 1F**). We then further characterized expression of the different forms of DYRK1A by immunohistochemistry on hippocampal slices. Combining α -DYRK1A-Cter and α -DYRK1A-Nter antibodies (detailed in Supplementary Figure 1) we evidenced decreased DYRK1A staining intensity using both antibodies in AD cases compared to controls (**Fig. 1G, H**). In addition, an astrocytic staining by the α -DYRK1A-Nter antibody was observed, as confirmed by double-immunofluorescence and confocal laser (**Fig 1I**). Altogether, these results indicate that DYRK1A undergoes a proteolytic processing in human AD hippocampus leading to the decrease of DYRK1A_{FL} and the accumulation of DYRK1A_T in astrocytes without affecting the level of DYRK1A kinase activity.

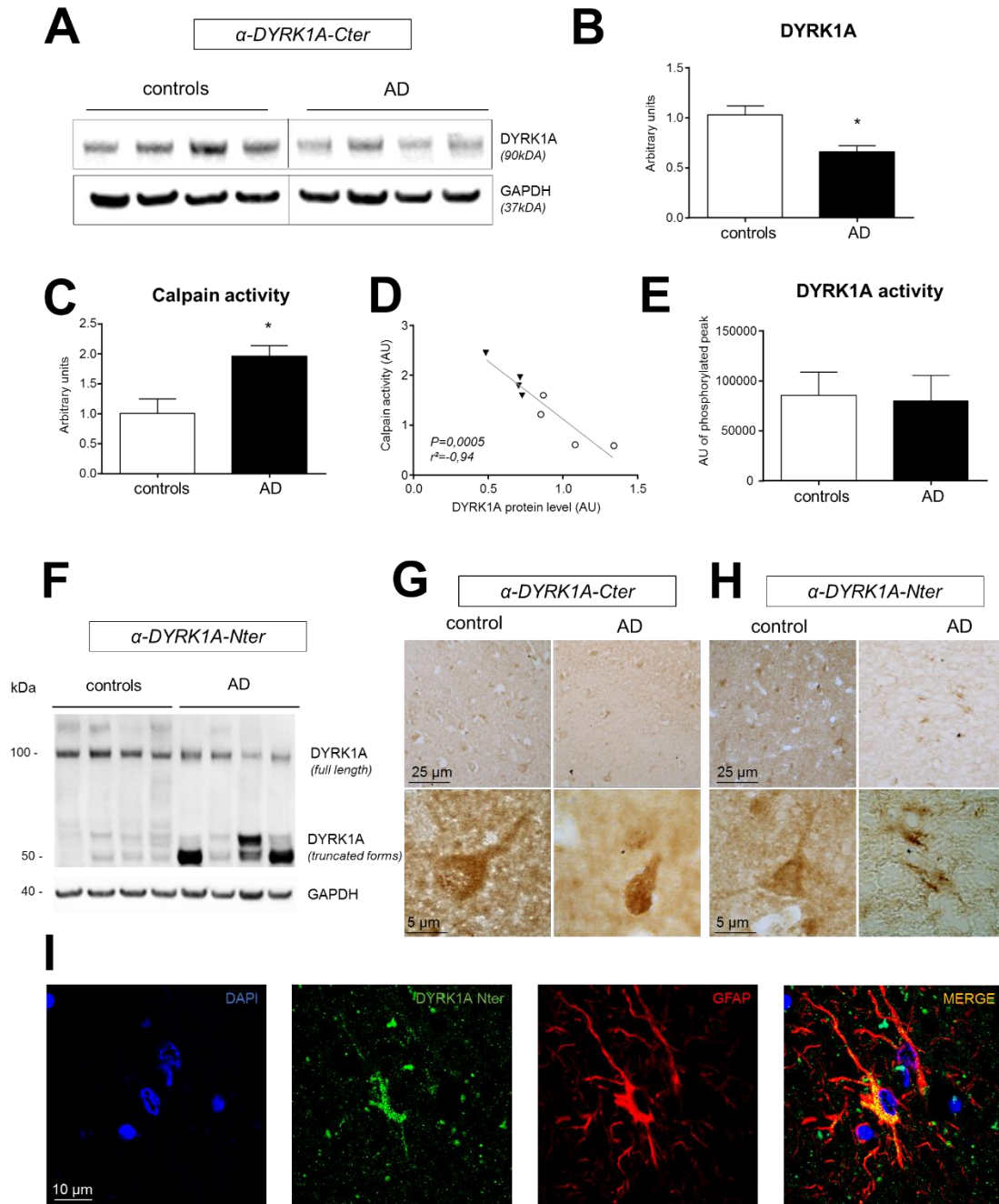


Figure 1: Identification of proteolytic processing of DYRK1A in the hippocampus of Alzheimer's disease patients.

(A, B) Western blot of hippocampal biopsies from AD patients (Braak V-VI, Thal IV-V) ($n = 4$) and healthy controls ($n = 4$) using the α -DYRK1A-Cter antibody and showing decreased levels of DYRK1A (90 kDa) (t -test, $p < 0.05$). (C) Calpain activity assessed by a fluorescent method show higher levels in hippocampal biopsies from AD patients ($n = 4$) compared to controls ($n = 4$) (t -test $p = 0.0571$). (D) DYRK1A protein levels are negatively correlated with calpain activity ($r^2 = 0.94$, $p < 0.0005$). (E) HPLC assay for total endogenous DYRK1A activity, showing no differences between hippocampal biopsies from AD patients ($n = 4$) and controls ($n = 4$) (t -test,

ns). (F) Western blot of hippocampal biopsies from AD patients (Braak V-VI, Thal IV-V) ($n = 4$) and healthy controls ($n = 4$) using the α -DYRK1A-Nter antibody, showing decreased levels of DYRK1A (90 kDa) and increased levels of DYRK1A (50 kDa). (G) Diaminobenzidine (DAB)-staining of hippocampal slices from AD patients and controls using the α -DYRK1A-Cter antibody, showing neuronal staining (see enlargement at the bottom part). (H) Diaminobenzidine (DAB)-staining of hippocampal slices using the α -DYRK1A-Nter antibody, showing neuronal and astrocytic staining in controls and AD patients respectively (see enlargement at the bottom part). (I) Laser confocal microscopy using DAPI (blue), α -DYRK1A-Nter antibody (green) and anti-GFAP (red) identifying α -DYRK1A-Nter staining in astrocytes of hippocampal slice from AD patient. Data represent the mean \pm SEM and were analyzed using Student's t -test. * $p < 0.05$ for the comparison between controls and AD patients.

Leucettine L41 prevents in vitro DYRK1A proteolysis limiting its interaction with STAT3 α .

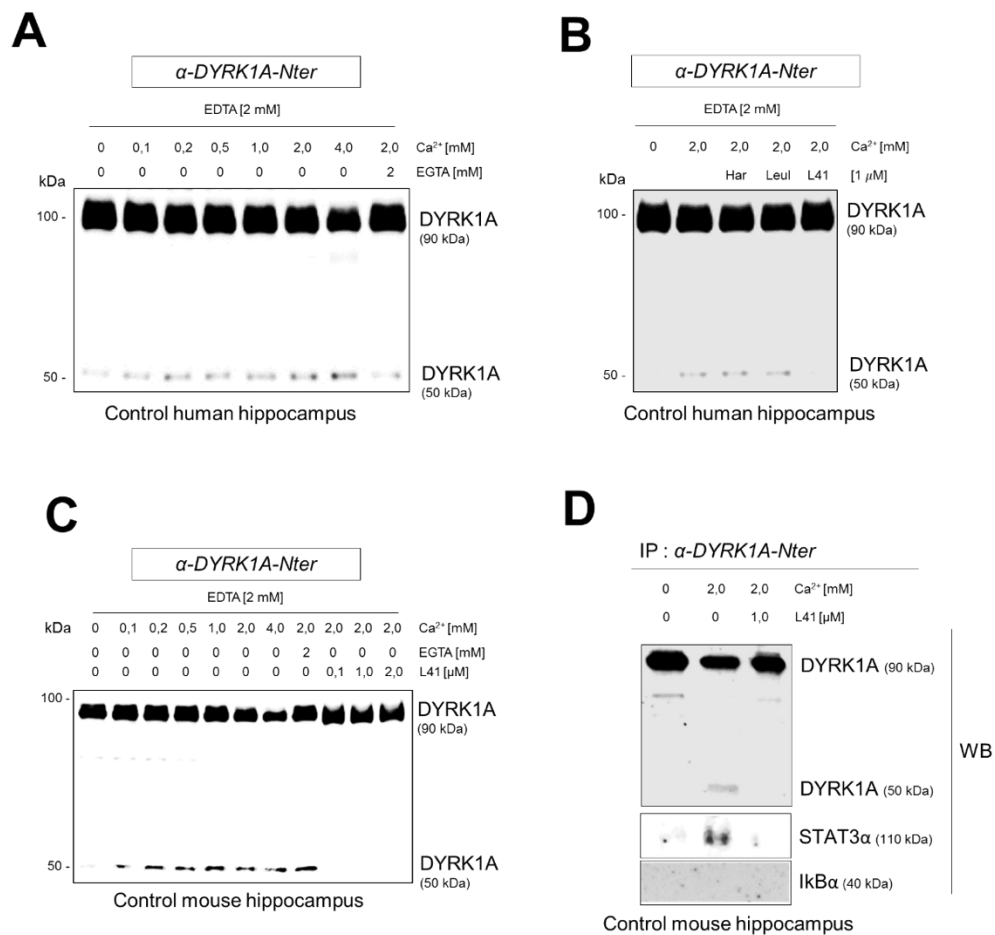


Figure 2: Identification of Leucettine L41 as a DYRK1A proteolysis inhibitor.

(A) Control human hippocampus extract was incubated at 30°C during 10 min with various concentrations of CaCl₂ (0 to 4,0 mM) or with 2 mM of EGTA. Proteins were then analyzed by western blot using the α -DYRK1A-Nter antibody. (B) Control human hippocampus extract was incubated with 0 mM of CaCl₂ or 2 mM of CaCl₂ and various pharmacological compounds including Harmine (har), Leucettine Leul (Leul) or Leucettine L41 (L41). Proteins were analyzed by western blot using the α -DYRK1A-Nter antibody. (C) Control mouse (C57Bl6) hippocampus

extract was incubated at 30°C during 10 min with various concentrations of CaCl₂ (0 to 4,0 mM) or/with 2 mM of EGTA or/with 2 mM of CaCl₂ and various concentrations of Leucettine L41 (L41) (0,1 to 2 μM). Proteins were analyzed by western blot using the α-DYRK1A-Nter antibody.

(D) Control mouse hippocampus extract was incubated at 30°C during 10 min with 0 mM of CaCl₂ or 2 mM of CaCl₂ or 2 mM of CaCl₂ with L41 at 1 μM. Protein extracts were then immunoprecipitated with the α-DYRK1A-Nter antibody overnight at 4°C and immunoprecipitated protein extract were analyzed by western blot using α-DYRK1A-Nter, STAT3α and IκBα antibodies.

We then tested known DYRK1A inhibitors including Harmine ([Gockler, Jofre et al. 2009](#)), Leucettine Leul and Leucettine L41 (also named L41) for their capacity to alter DYRK1A proteolysis. *In vitro* assays were performed as previously described ([Jin, Yin et al. 2015](#)). Human hippocampus extracts were incubated with different concentrations of calcium. A Ca²⁺ dose-dependent decrease of DYRK1A_{FL} and increase DYRK1A_T were observed while the Ca²⁺ chelating agent EGTA was used as a control (**Fig. 2 A**). Only L41 (1 μM) efficiently inhibited DYRK1A proteolysis, maintaining DYRK1A_{FL} levels and preventing DYRK1A_T formation (**Fig. 2B**). Similar results were obtained using mouse hippocampus extracts (**Fig. 2C**) suggesting that Leucettine L41 is able to prevent *in vitro* the DYRK1A proteolysis in both human and mouse proteins extracts.

In AD hippocampus, DYRK1A proteolysis does not modify its global kinase activity (see **Fig. 1E**). To assess whether DYRK1A C-terminal fraction is necessary for its selectivity, we performed DYRK1A immunoprecipitation using the α-DYRK1A-Nter antibody on mouse extracts incubated or not with Ca²⁺ (2 mM) and L41. We then performed western-blots using STAT3α and IκBα antibodies (**Fig. 2D**). No binding between both DYRK1A forms and IκBα was revealed. In contrast, we observed a modest interaction between DYRK1A_{FL} and STAT3α in absence of Ca²⁺. This interaction increased in presence of Ca²⁺ and was altered by the addition of L41 (**Fig. 2D**). These compelling data suggest that DYRK1A_T has a higher affinity toward STAT3α compared to DYRK1A_{FL}.

Leucettine L41 treatment prevents proteolytic processing of DYRK1A in APP/PS1 mice.

We then aimed to determine whether L41 could modify DYRK1A proteolysis *in vivo* with potential consequences on AD phenotype. We used 14-month-old APP/PS1 mice with severe and established AD pathology. These mice present a positive correlation between Aβ accumulation and calpain activity ([Trinchese, Fa et al. 2008](#)). The treated group received intraperitoneal injections of L41, 5 days a week during one month. Littermates and another cohort of APP/PS1 mice received injections of the vehicle solution. Vehicle-treated APP/PS1 mice had two-fold lower DYRK1A_{FL} levels than their wild type littermates by western blot analysis using α-DYRK1A-Cter ($p < 0.005$) (**Fig. 3A, B**). They showed a corresponding two-fold increase in calpain activity ($p <$

0.005) (**Fig. 3C**), leading to a negative Spearman correlation with DYRK1A_{FL} protein levels (correlation coefficient $r = -0.65$, $p < 0.021$) (Supplementary data 2A). L41 treatment fully restored DYRK1A_{FL} protein levels in APP/PS1 mice to wild-type levels ($p < 0.005$ vs vehicle-treated APP/PS1) (**Fig. 3A, B**), independently of a change in calpain activity ($p < 0.005$ vs vehicle-treated littermates) (**Fig. 3C**). Thus, there was no significant correlation between DYRK1A_{FL} protein levels and calpain activity (correlation coefficient -0.43 , ns) (**Fig. 3D**). In contrast, protein levels of various kinases including GSK3 β exhibited no change between littermates, vehicle-treated APP/PS1 and L41-treated APP/PS1 (Supplementary data 2B). No differences in total DYRK1A kinase activity was observed among the three experimental groups (**Fig. 3E**). Levels of phosphorylated forms of Tau protein at Thr 212 or Thr 231 and APP protein at Thr 668 which are described as epitopes targeted by DYRK1A were not decreased by Leucettine L41 treatment (Supplementary data 3A and B).

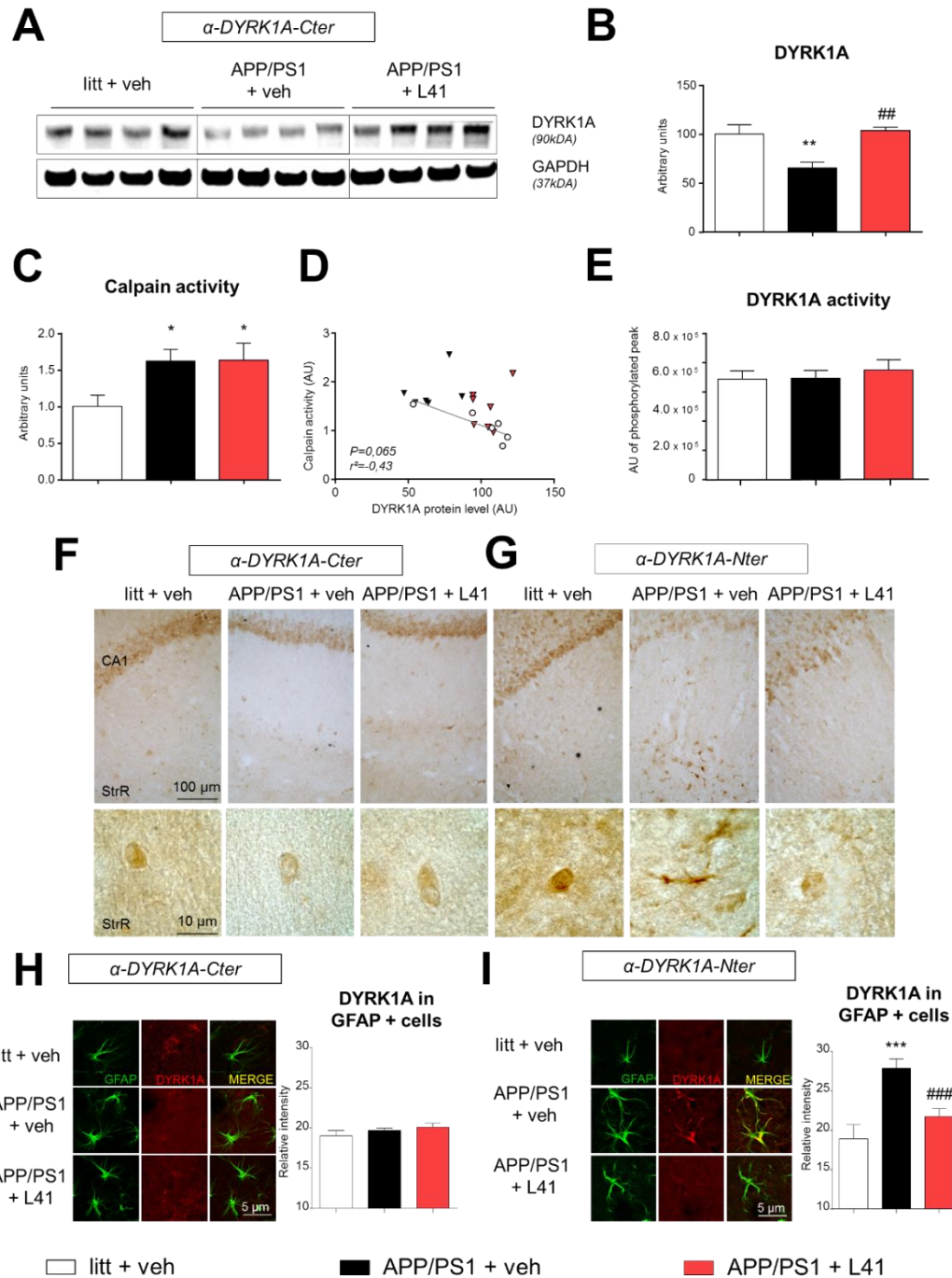


Figure 3: L1 treatment prevents DYRK1A proteolysis in APP/PS1 mice hippocampus.
 (A, B) Western blot of hippocampal biopsies from APP/PS1 mice or littermates treated with vehicle or L1, showing lower levels of DYRK1A (90kDa) immunoblotting with the α -DYRK1A-Cter antibody in vehicle-treated APP/PS1 mice ($n = 6$) compared to littermates ($n = 6$) (One-way ANOVA, $p < 0.005$). DYRK1A protein levels in L1-treated APP/PS1 mice ($n = 7$) were higher than in vehicle-treated APP/PS1 mice (One-way ANOVA, $p < 0.005$) and similar to what observed in littermates (One-way ANOVA, ns). (C) Calpain activity assessed by a fluorescent

method, showing higher calpain activity in hippocampal biopsies from both vehicle-treated ($n = 6$) and L41-treated APP/PS1 mice ($n = 7$) compared to littermates ($n = 6$) (One-way ANOVA, $p < 0.05$ for both). There was no significant difference between L41-treated and vehicle-treated APP/PS1 mice (One-way ANOVA, *ns*). **(D)** DYRK1A protein levels did not correlate with calpain activity ($r^2 = 0.43$; *ns*). **(E)** HPLC assay for total endogenous DYRK1A activity showing no differences between hippocampus biopsies from littermates ($n = 9$) and vehicle- or L41-treated APP/PS1 mice ($n = 9$ and 8 , respectively) (One-way ANOVA, *ns*). **(F)** Representative images from immunohistochemical staining using the α -DYRK1A-Cter antibody, of hippocampal slices from littermates, vehicle- and L41-treated APP/PS1 mice, showing neuronal staining in the CA1 and Stratum Radiatum (StrR) regions (see enlargement at the bottom). **(G)** Representative images from immunohistochemical staining, using the α -DYRK1A-Nter antibody, of hippocampal slices, showing neuronal staining for L41-treated APP/PS1 mice and littermates in the CA1 and Stratum Radiatum (StrR) regions. Neuronal staining was observed in both the CA1 and StrR regions, whereas additional astrocyte staining was mostly observed in the Stratum Radiatum (StrR) region of vehicle-treated APP/PS1 mice. **(H)** Laser confocal microscopy showing double staining using α -DYRK1A-Cter (red) and anti-GFAP (green) antibodies. There were no differences in α -DYRK1A-Cter staining in GFAP positive cells between littermates ($n = 6$, astrocytes = 73), vehicle- ($n = 6$, astrocytes = 90), and L41-treated APP/PS1 mice ($n = 6$, astrocytes = 85) (One-way ANOVA, *ns*). **(I)** Laser confocal microscopy showing double staining using α -DYRK1A-Nter antibody (red) and anti-GFAP (green). α -DYRK1A-Nter staining was higher in the GFAP positive area in vehicle-treated APP/PS1 mice ($n = 6$, astrocytes = 105) compared to littermates ($n = 6$, astrocytes = 50) (One-way ANOVA, $p < 0.0005$). α -DYRK1A-Nter immunoreactivity was lower in the GFAP positive area of L41-treated ($n = 6$, astrocytes = 83) than vehicle-treated APP/PS1 mice (One-way ANOVA, $p < 0.0005$). Data represent the mean \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Significant differences between littermates and vehicle-treated APP/PS1 mice are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.0005$. Significant differences between vehicle- and L41-treated APP/PS1 mice are indicated by # $p < 0.05$, ## $p < 0.005$ and ### $p < 0.0005$.

Immunohistochemical analysis using both antibodies (α -DYRK1A-Cter and α -DYRK1A-Nter) showed lower DYRK1A staining in the hippocampi of vehicle-treated APP/PS1 mice compared to littermates for both antibodies, confirming biochemical analysis. Strikingly, treatment of APP/PS1 mice with L41 restored DYRK1A staining levels in the hippocampus to those of wild-type mice. Most pyramidal neurons in the CA1 region and interneurons in the Stratum Radiatum (StrR) exhibited DYRK1A staining in littermates and APP/PS1 mice treated or not with L41 (**Fig. 3F** and **Fig. 3G**, respectively). In contrast, additional staining by the α -DYRK1A-Nter antibody was observed in the cytosol of hippocampal astrocytes of vehicle-treated APP/PS1 mice (**Fig. 3G**). This was confirmed by double-immunofluorescence and confocal microscopy using both anti-DYRK1A antibodies and an anti-GFAP antibody (**Fig. 3H and I**). The α -DYRK1A-Cter antibody, which targets only the DYRK1A_{FL} forms, showed only marginal co-localization between GFAP and DYRK1A_{FL} in all mice groups, as revealed by the level of DYRK1A_{FL} in GFAP-positive cells, which was the same for all three groups (**Fig. 3H**). The α -DYRK1A-Nter antibody, which targets both DYRK1A_{FL} and DYRK1A_T, showed strong co-localization between GFAP and DYRK1A_{FL}/DYRK1A_T in the hippocampi of vehicle-treated APP/PS1 mice. In contrast, there was

only negligible co-localization in wild-type littermates and Leucettine L41-treated APP/PS1 mice. The level of DYRK1A in GFAP-positive cells of vehicle-treated APP/PS1 mice was higher than that in GFAP-positive cells of littermates and L41-treated APP/PS1 mice ($p < 0.0005$ for both) (**Fig. 3I**). These findings confirm our previous results in human samples and indicate that L41 can prevent *in vivo* DYRK1A processing without changing DYRK1A or calpain activities.

Leucettine L41 treatment prevents phosphorylation of STAT3 α and reduces pro-inflammatory cytokines release in APP/PS1 mice.

Because of the increased affinity of DYRK1A_T toward STAT3 α evidenced *in vitro* (see **Fig. 2**), we further evaluated L41 influence on astrocytes and STAT3 α phosphorylation state in APP/PS1 mice. We first assessed GFAP and vimentin protein levels in the hippocampus by western blot. As expected, both GFAP and vimentin levels were increased in APP/PS1 mice hippocampi but were not affected by L41 treatment ($p < 0.05$ and $p < 0.005$ respectively) (**Fig. 4A**). We confirmed no alteration of astrocyte recruitment around the amyloid plaques in APP/PS1 treated with L41 (**Fig. 4B**). STAT3 α as its phosphorylated form [phospho- STAT3 α (Tyr705)] were increased in vehicle-treated APP/PS1 relative to littermates mice ($p < 0.05$ and $p < 0.0005$ respectively). Interestingly, L41-treated APP/PS1 exhibited lower phospho-STAT3 α levels compared to vehicle-treated APP/PS1 mice ($p < 0.0005$), thereby leading to a restored ratio pSTAT3 α /STAT3 α similar to littermates (Fig. 4C). STAT3 is an important signaling molecule for cytokines and growth factor receptors production (Heim 1999, Chiba, Yamada et al. 2009) and has been associated with pro-inflammatory cytokines expression such as IL-1 β and TNF- α (Chen, Xu et al. 2013).

We measured by ELISA these pro-inflammatory cytokines levels released in part by reactive astrocytes. Higher concentrations of IL-1 β , IL-12 and TNF- α were measured in APP/PS1 mice compared to littermates ($p < 0.05$, $p < 0.005$, and $p < 0.05$, respectively). These levels were reversed by L41 treatment ($p < 0.05$, $p < 0.005$, and $p < 0.05$, respectively, for L41 vs vehicle-treated APP/PS1 mice) (**Fig. 4D**). Collectively, these data demonstrate that DYRK1A_T forms participate to astrocyte production of inflammatory cytokines through a STAT3 α pathway activation.

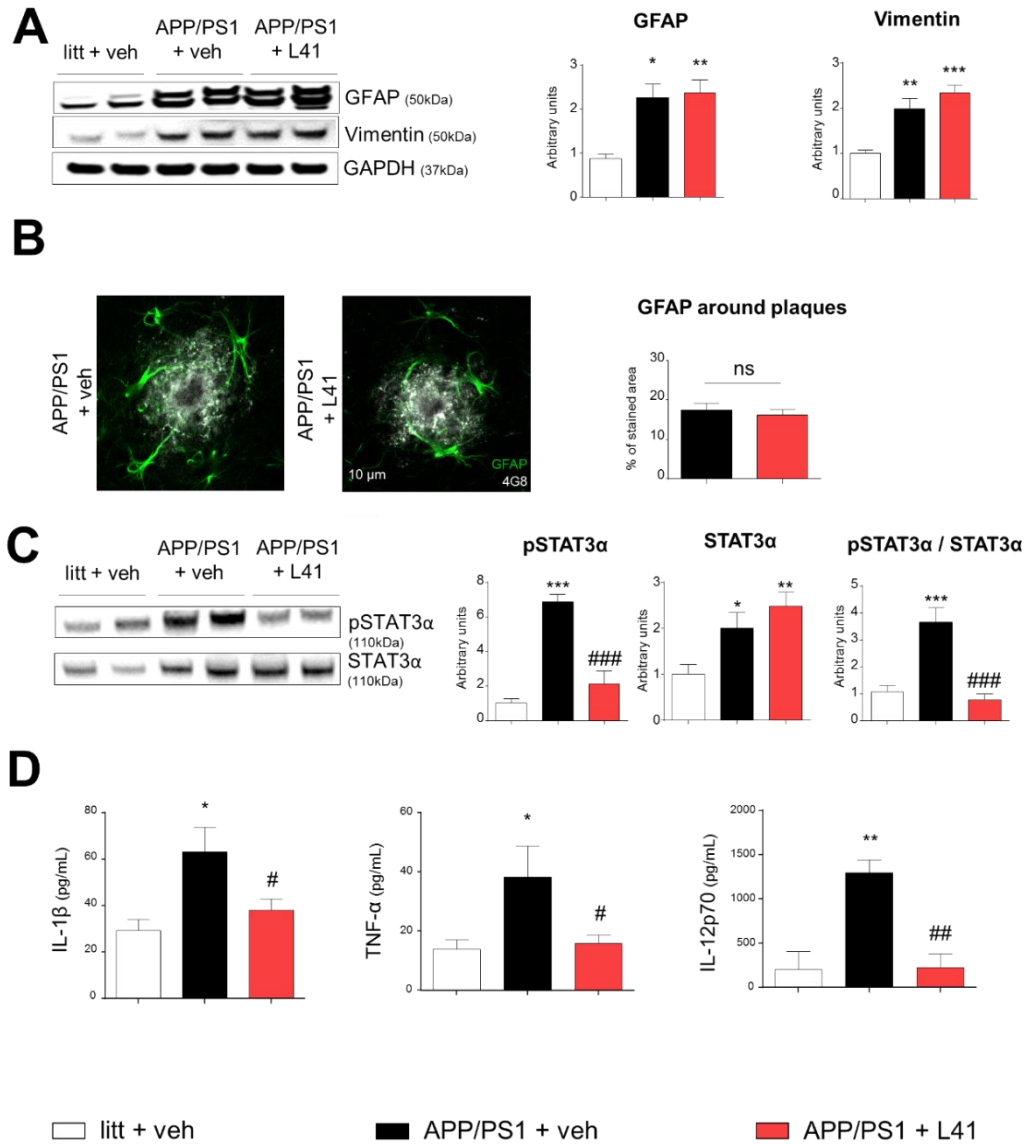


Figure 4: L41 treatment prevents DYRK1AT accumulation in astrocytes and decreases phosphorylation of STAT3 α and the release of pro-inflammatory cytokines.

(A) Representative western blot of mouse hippocampal biopsies showing higher levels of GFAP and vimentin in vehicle- (n = 6) and L41- (n = 7) treated APP/PS1 mice than in littermates (n = 6) (One-way ANOVA; GFAP: p < 0.05 and p < 0.005, respectively; vimentin: p < 0.005 and p < 0.0005, respectively). There were no statistical differences between L41- and vehicle-treated APP/PS1 mice (One-way ANOVA, ns and ns). (B) Laser confocal microscopy showing double staining, using anti-4G8 (white) and anti-GFAP (green) antibodies, of hippocampal slices from vehicle- (n = 6, plaques = 39) or L41- (n = 6, plaques = 38) treated APP/PS1 mice. There were no differences in GFAP (green) immunoreactivity around amyloid plaques (white) between vehicle- and L41-treated APP/PS1 mice (t-test, ns). (C) Representative western blot of hippocampal biopsies from mice showing higher phospho-STAT3 α / STAT3 α ratio in vehicle- treated

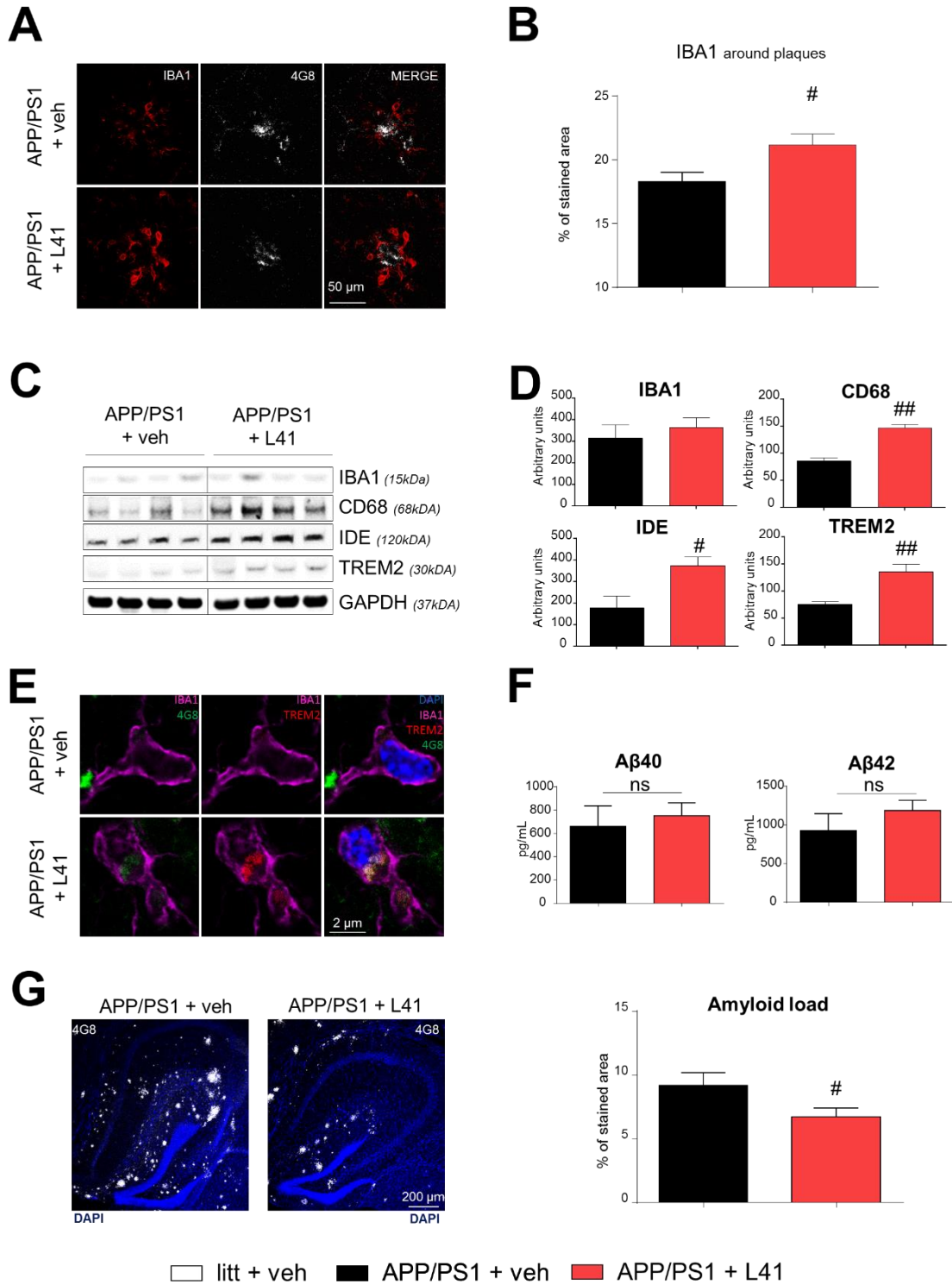
APP/PS1 mice compared to littermates and L41-treated APP/PS1 mice (One-way ANOVA; pSTAT3 α : p < 0.0005 and p < 0.0005, respectively; STAT3 α : p < 0.05 and ns, respectively; pSTAT3 α / STAT3 α : p < 0.0005 and p < 0.0005, respectively) (D) ELISA quantification (MSD immunoassay) in samples from hippocampus of littermates, vehicle- and L41-treated APP/PS1 mice (n = 4, 6, and 7 mice per group, respectively). Vehicle-treated APP/PS1 mice had higher IL-1 β , IL-12 (IL-12p70) and TNF- α concentrations than in littermates (One-way ANOVA: IL-1 β and TNF- α , p < 0.05; IL-12p70, p < 0.005). L41-treated APP/PS1 mice had lower IL-1 β , IL-12 and TNF- α concentrations than vehicle-treated APP/PS1 mice (One-way ANOVA: IL-1 β , and TNF- α , p < 0.05; IL-12p70, p < 0.005). Data represent the mean \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test or Student's t-test. Significant differences between littermates and vehicle-treated APP/PS1 mice are indicated by *p < 0.05, **p < 0.005 and ***p < 0.0005. Significant differences between vehicle- and L41-treated APP/PS1 mice are indicated by #p < 0.05, ##p < 0.005 and ###p < 0.0005.

Leucettine L41 treatment promotes microglia recruitment around amyloid plaques in APP/PS1 mice.

In response to brain injury, crosstalk between astrocytes and microglial cells is driven in part by inflammatory mediators ([Liddelow, Guttenplan et al. 2017](#)). Using confocal microscopy and double-immunofluorescence, we observed increased activated microglia (IBA1 staining) around amyloid- β plaques in L41-treated APP/PS1 mice compared to vehicle-treated APP/PS1 mice (p < 0.05) (**Fig 5A-B**). Western blot analysis did not reveal differences in IBA1 protein levels. However, levels of CD68, IDE and TREM2, microglial markers involved in amyloid- β clearance, were increased in L41-treated APP/PS1 mice (p < 0.0005, p < 0.05, and p < 0.05, respectively) (**Fig. 5C-D**). TREM2 increase was confirmed in microglial cells of L41-treated APP/PS1 mice by immunohistochemistry and was associated with an amyloid staining suggesting that L41 promotes amyloid- β clearance by microglia (**Fig. 5E**). Because of the well-known roles of CD68, IDE and TREM2 in A β phagocytosis and degradation ([Simard, Soulet et al. 2006](#), [Heneka, Carson et al. 2015](#)), we evaluated the effects of L41 on soluble and aggregated forms of A β in APP/PS1 mice hippocampi. Neither soluble A β ₄₀ and A β ₄₂ concentrations were significantly different between L41- and vehicle-treated APP/PS1 mice (**Fig. 5F**). In contrast, we observed a significant decrease of the amyloid- β load in the hippocampi of L41-treated APP/PS1 mice (p = 0.049) (**Fig. 5G**). Altogether, these results demonstrate that L41 treatment promotes microglia recruitment around A β plaques, increases levels of proteins involved in amyloid- β clearance and leads to decreased amyloid load.

Figure 5: L41 treatment promotes microglial cells recruitment leading to a decrease in aggregated amyloid load.

(A) Laser confocal microscopy showing double staining, using 4G8 antibody (white) and anti-IBA1 (red), of hippocampal slices from vehicle- (n = 6, plaques = 79) or L41- (n = 6, plaques = 77) treated APP/PS1 mice. (B) Increased IBA1 immunoreactivity around amyloid plaque of L41-treated APP/PS1 mice, compared to vehicle-treated APP/PS1 mice, was observed (*t*-test, $p < 0.05$). (C) Western blot of hippocampal biopsies from vehicle (n = 6) or L41 (n = 7) treated APP/PS1 mice, showing levels of IBA1, CD68, IDE, and TREM2. (D) IBA1 protein levels were not statistically different in L41- and vehicle-treated APP/PS1 mice (*t*-test, *ns*). CD68, IDE, and TREM2 protein levels were increased in L41-treated compared to vehicle-treated APP/PS1 mice (CD68: *t*-test, $p < 0.005$; IDE: *t*-test, $p < 0.05$; TREM2: *t*-test, $p < 0.005$). (E) Laser confocal microscopy showing IBA1 positive cells with increased TREM2 protein and colocalization with A β species (4G8) in L41-treated compared to vehicle-treated APP/PS1 mice. (F) ELISA quantification of soluble A β_{40} and A β_{42} (MSD immunoassay) in vehicle- and L41-treated APP/PS1 mice hippocampus (n = 6/7 mice per group). There was no statistical differences between L41- and vehicle-treated APP/PS1 mice. (G) Laser confocal microscopy showing double staining with 4G8 antibody (white) and DAPI (blue), of hippocampal slices from vehicle- (n = 6) or L41- (n = 6) treated APP/PS1 mice. Area covered by the plaques was decreased in the hippocampus of L41-treated compared to vehicle-treated APP/PS1 mice (*t*-test, $p < 0.05$). Data represent the mean \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test or Student's *t*-test. Significant differences between vehicle- and L41-treated APP/PS1 mice are indicated by # $p < 0.05$, ## $p < 0.005$, and ### $p < 0.0005$.



Leucettine L41 treatment rescues synaptic and memory impairments in APP/PS1 mice.

APP/PS1 mice exhibit decreased long-term potentiation (LTP) of synaptic transmission associated with impaired learning and memory ([Fol, Braudeau et al. 2015](#)). It has been reported that neuroinflammation mechanisms and in particular immune diffusible mediators such as cytokines influences synaptic transmission and plasticity and thereby memory ([Di Filippo, Sarchielli et al. 2008](#), [Bardou, Brothers et al. 2013](#)). We explored whether L41 treatment (daily injection from age 13 to 14 months) could rescue LTP and cognitive deficits. As expected, APP/PS1 treated with vehicle (n = 13 slices/N = 5 mice) exhibited impaired LTP relative to littermates treated with the vehicle solution (n = 11 slices/N = 4 mice) ($p < 0.0005$) (**Fig. 6A, B**). L41-treated APP/PS1 mice exhibited significantly improved LTP ($p < 0.0005$) relative to APP/PS1 mice that received vehicle injections. LTP generated in L41-treated APP/PS1 mice was still significantly lower compared to littermates ($p < 0.0005$), suggesting that synaptic plasticity measured by the LTP was partially rescued by the L41 treatment. To evaluate whether improved synaptic plasticity was also reflected at the behavioral level, we tested the mice by the Morris water-maze and the Y-maze tasks (**Fig. 6C-F**). Spatial learning and long-term memory were assessed using the Morris water maze paradigm (**Fig. 6C-E**). All mice progressively learned the platform position during the learning sessions, as demonstrated by a decrease in the time required to reach the platform over the five days of training. Vehicle-treated APP/PS1 mice exhibited a reduced learning ability relative to littermates ($p = 0.02$), whereas L41-treated APP/PS1 mice were statistically undistinguishable from littermate controls (ns) (**Fig. 6C, D**). During the 72-h probe test, vehicle-treated APP/PS1 mice spent less time in the target quadrant than littermates ($p = 0.07$) (**Fig. 6E**). In contrast, L41-treated APP/PS1 mice spent more time in the target quadrant compared to vehicle-treated APP/PS1 mice ($p < 0.005$) but not different compared to littermates (ns). We also used the Y-maze paradigm to evaluate the spatial working memory which is mediated by hippocampus but also prefrontal cortex ([Yoon, Okada et al. 2008](#))(**Fig. 6F**). Vehicle-treated APP/PS1 mice did not travel more distance in the new arm compared to the familiar starting arm, suggesting an impaired working memory (ns). In contrast, vehicle-treated littermates and L41-treated APP/PS1 mice exhibited a spatial preference for the new arm ($p < 0.05$ and $p = 0.0573$, respectively) (Fig. 6F). Taken together, these results suggest that L41 treatment alleviates synaptic plasticity impairments and rescues memories defects in aged APP/PS1 mice (14-month-old) with well-established cognitive deficits.

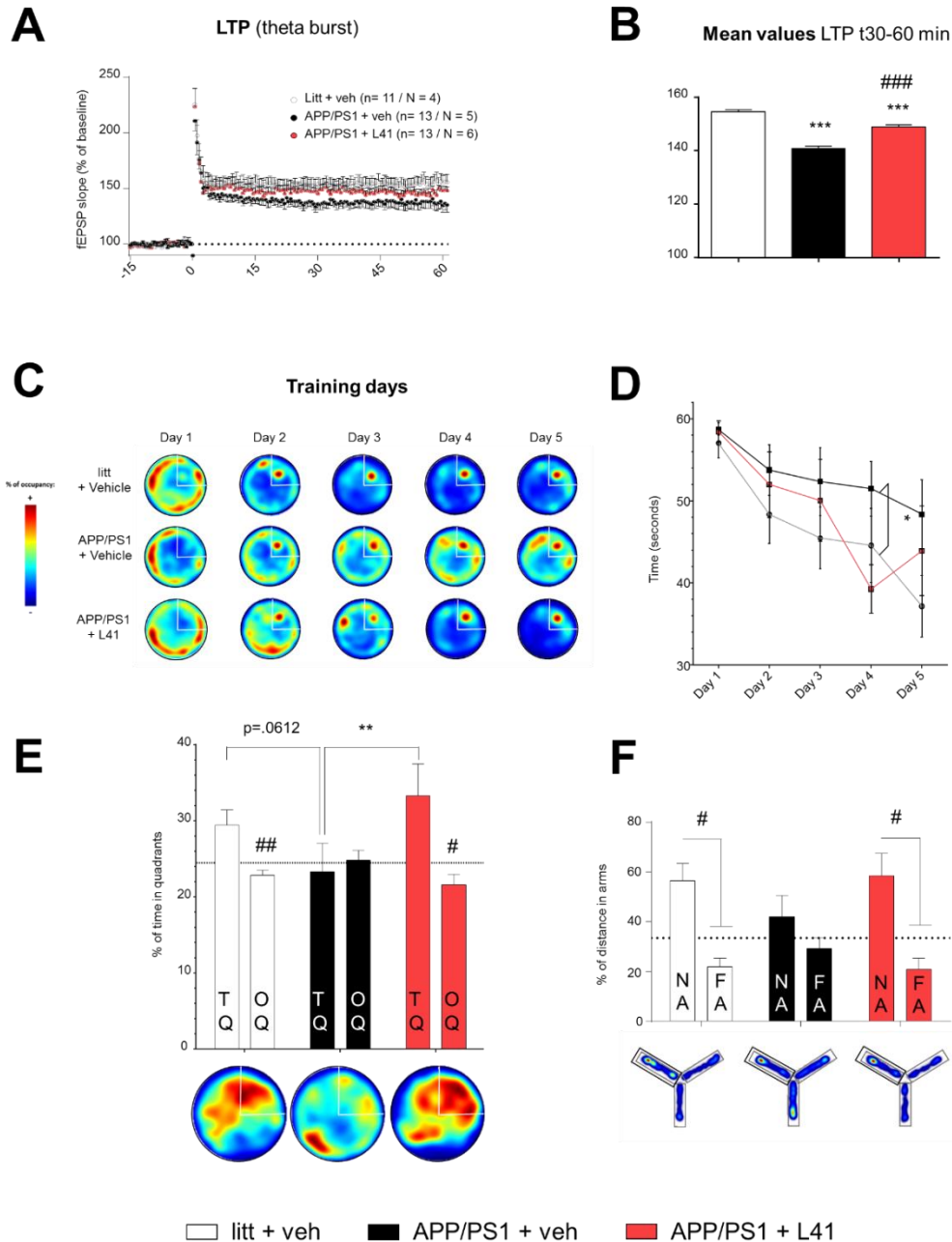


Figure 6: L41 treatment improves synaptic plasticity and prevents behavioral deficits in APP/PS1 mice.

(A, B) Long-term potentiation (LTP) was induced by delivering theta-burst stimulations to hippocampal CA3-CA1 synapses after 20 min of baseline recordings. Slices from vehicle-treated APP/PS1 mice exhibited deficits in LTP expression relative to littermates. The magnitude of LTP observed in L41-treated APP/PS1 mice was higher than that in vehicle-treated APP/PS1 mice, but lower than in littermates. (B) Summary bar graph showing the average potentiation represented as the percentage from 30 to 60 minutes after theta-burst stimulation. Slices from vehicle-treated APP/PS1 mice showed a mean deficit of LTP (137.7 ± 0.163) relative to that of

littermates (153.5 ± 0.211) (One-way ANOVA, $p < 0.0005$). The mean LTP of L41-treated APP/PS1 mouse slices (146.8 ± 0.243) was higher than that of vehicle-treated APP/PS1 mice (One-way ANOVA, $p < 0.0005$), but lower than that of littermates (One-way ANOVA, $p < 0.0005$). n = number of slices, N = number of mice. Significant differences between littermates and APP/PS1 injected with vehicle are indicated by *** $p < 0.0005$. Significant differences between vehicle- and L41-treated APP/PS1 mice are indicated by ### $p < 0.0005$. (C, D, E) Spatial learning and long-term memory were evaluated using the Morris water maze paradigm on littermates ($n = 12$), vehicle- ($n = 7$) and L41- ($n = 7$) treated APP/PS1 mice. (C) Representative occupancy plots during acquisition show a more random search strategy for vehicle- than L41-treated APP/PS1 mice and littermates. (D) Escape latency of vehicle-treated littermate controls or vehicle- or L41-treated APP/PS1 mice. The time to reach the platform was different between the groups (Two-way ANOVA: Group effect: $F_{2,110} = 3.68$, $p = 0.028$; Time effect: $F_{4,110} = 7.23$, $p < 0.0001$; Group x Time interaction: $F_{8,110} < 1$, *ns*). Vehicle-treated APP/PS1 mice were impaired relative to vehicle-treated littermate controls ($p = 0.02$). L41-treated APP/PS1 mice were statistically indistinguishable from littermate controls ($p = ns$). Significant differences between littermates and vehicle-treated APP/PS1 mice are indicated by * $p < 0.05$. (E) Probe trial performance at 72h. (Two-way ANOVA, Group effect: $F_{2,50} < 1$, $p = ns$; quadrant effect: $F_{1,50} = 8.199394$, $p = 0.006$; Group x quadrant interaction effect: $F_{2,50} = 3.43$, $p = 0.04$). Vehicle-treated APP/PS1 mice were impaired relative to vehicle-treated littermates ($p = 0.0612$). L41 treatment rescued this memory impairment ($p < 0.005$), confirmed by a preference for the trained target quadrant. Target quadrant (TQ) and other quadrants (OQ). Bottom: representative occupancy plots during 72h-probe test show a random search strategy for vehicle-treated APP/PS1 mice, in contrast to both vehicle-treated littermates and L41-treated APP/PS1 mice.

Significant differences between the groups are indicated by * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$. Significant differences between the quadrants are indicated by # $p < 0.05$ and ## $p < 0.005$. Data represent the mean \pm SEM and were analyzed by one-way or two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. (F) Working memory was evaluated using the Y-maze paradigm in littermates ($n = 9$) and vehicle- ($n = 8$), or L41- ($n = 5$) treated APP/PS1 mice. The distance covered by the mice in the arms during the evaluation phase was different between each arm (Two-way ANOVA: Group effect: $F_{2,19} = 1.232$; *ns*; Arm effect: $F_{1,19} = 15.31$, $p < 0.005$; Group x Arm interaction: $F_{2,19} = 1.232$, *ns*). Vehicle-treated APP/PS1 mice did not cover significantly more distance in the NA (new arm) than the OA (other arms, including starting and familiar arms) (Two-way ANOVA, *ns*). Littermates and L41-treated APP/PS1 mice covered more distance in the new arm than in the other arms ($p < 0.05$ for both). Significant differences between distance covered in the arms are indicated by # $p < 0.05$.

Discussion

The present study provides compelling evidence for DYRK1A involvement in AD and describes a new mechanism through which DYRK1A modulation contributes to AD pathology. We first describe a proteolytic processing of DYRK1A in the hippocampus of AD patients and APP/PS1 mice reducing level of full-length form of DYRK1A (DYRK1A_{FL}) and producing truncated forms (DYRK1A_T). The increase of DYRK1A kinase activity was suspected to contribute to AD. However, we demonstrate that this proteolysis is not associated with modification of the global DYRK1A kinase activity but affect its specificity. DYRK1A_T forms exhibit increased affinity toward STAT3 α , an activator of neuroinflammation. We then show that inhibiting DYRK1A proteolysis through the peripheral administration of Leucettine L41 in APP/PS1 mice is associated with increased number of phagocytic-microglia around amyloid- β deposits and reduction of the plaque load. This lead to improved synaptic plasticity and reduced cognitive and memory deficits in APP/PS1 mice. Specific inhibitors of DYRK1A proteolysis could be therapeutic interest for AD.

The *DYRK1A* gene is located on chromosome 21 (21q22.2), a region known as the Down-Syndrome Critical Region (DSCR) ([Delabar, Theophile et al. 1993](#)). People living with Down Syndrome (DS) have higher prevalence to develop AD pathology primarily due to overexpression of the *APP* gene on chromosome 21 ([Head, Lott et al. 2016](#)). In addition, various evidence supports DYRK1A as a potential key player in AD progression and as a valid therapeutic target for AD ([Ryoo, Jeong et al. 2007](#), [Branca, Shaw et al. 2017](#)). However, no direct link has been shown between the kinase activity of DYRK1A and AD. Recently, decreased DYRK1A_{FL} and increased DYRK1A_T forms have been reported in the frontal and temporal cortex of AD patients (Braak V-VI/Tangles score = 14) through upregulated calpain I activity, the major calpain isoform in brain ([Jin, Yin et al. 2015](#)). We confirm this observation in hippocampus biopsies from severely affected AD patients (Braak V-VI, Thal IV-V). We show for the first time decreased levels of DYRK1A_{FL} forms in APP/PS1 mice, together with increased DYRK1A_T forms and increased calpain activity.

DYRK1A has a long kinase domain, followed by a PEST region, and histidine-repeat and serine/threonine-rich domains ([Kentrup, Becker et al. 1996](#)). PEST sequences are rich in the amino acids proline (P), glutamate (E), serine (S) and threonine (T), and their presence is correlated with rapid protein turnover due to proteasome-mediated destruction ([Rechsteiner and Rogers 1996](#)). Proteolysis of DYRK1A by calpains probably occurs within the PEST domain ([Jin, Yin et al. 2015](#)) as shown in other proteins ([Rechsteiner and Rogers 1996](#)). Beyond the PEST sequence, the C-terminus domain is the target of other kinases which negatively modulate

DYRK1A kinase activity ([Zou, Lim et al. 2003](#)). In numerous protein kinases, non-catalytic domains participate in the kinase specificity ([Ubersax and Ferrell 2007](#)). In our study, we provide evidences that the deletion of the C-terminal region does not affect kinase activity of DYRK1A but increases its affinity toward STAT3 α .

Several molecules able to reduce DYRK1A kinase activity have been developed ([Nguyen, Fruit et al. 2017](#)). One of them, Leucettine L41 (L41) is a synthetic analogue of the marine sponge alkaloid Leucettamine B, identified as an inhibitor of DYRKs/CLKs ([Debdab, Carreaux et al. 2011](#), [Tahtouh, Elkins et al. 2012](#)). Although L41 prevents DYRK1A proteolysis in APP/PS1 mice hippocampus, we showed that this compound does not alter DYRK1A (and Calpain) activity. Thus, several hypothesis can be envisaged to explain L41 effect on DYRK1A: (i) L41 could prevent the interaction between DYRK1A and calpains by inducing a conformational change in the kinase, (ii) the DYRK1A/L41 complex could change its intracellular location and thereby be isolated from calpains, or (iii) the catalytic activity of DYRK1A could be required for calpain-mediated cleavage. Further experiments are still needed to better understand the action of L41 on DYRK1A regulation.

Consequently to the prevention of DYRK1A, we show a decrease of STAT3 α phosphorylation (pSTAT3 α) in APP/PS1 mice. STAT3 α is a transcription factor and a major regulator of cytokine production ([Heim 1999](#)). The tyrosine phosphorylation is required for its activation and STAT3 α are remarkably activated in APP/PS1 mice ([Chiba, Yamada et al. 2009](#)). Inhibition of phosphorylation of STAT3 α attenuates A β -induced neuronal death ([Wan, Fu et al. 2010](#)). Our results indicate that a normalization of pSTAT3 α levels by L41 restores the ratio pSTAT3 α /STAT3 α and may participate to the following events: (i) decreased release of key inflammatory mediators such as IL-1 β , TNF- α and IL-12, (ii) increased microglial cells recruitment around amyloid plaques, and (iii) decrease of the amyloid- β burden. The immune system, driven by inflammatory mediators, influences AD progression ([Heneka, Carson et al. 2015](#)). In particular, TNF- α has been described to have a major impact in AD. Indeed, increased TNF- α in serum is associated with a worsen cognitive decline in AD ([Holmes, Cunningham et al. 2009](#)) and elevated concentrations of TNF- α in CSF increase the probability to evolve from a mild cognitive impairment (MCI) stage to dementia ([Tarkowski, Andreasen et al. 2003](#)). In addition, these molecules have a strong impact on microglial dysfunction ([Burda and Sofroniew 2014](#), [Sofroniew 2014](#)). Emerging evidences suggest that microglial activation plays a crucial role in AD ([Haure-Mirande, Audrain et al. 2017](#)). Activated microglia have receptors that can uptake and clear A β and this may limit the formation of plaques through phagocytosis of A β species ([Simard, Soulet et al. 2006](#)). In APP/PS1

mice, proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) increase in concentration with age and down regulate genes involved in amyloid- β clearance ([Hickman, Allison et al. 2008](#)). Therefore, microglia become progressively dysfunctional and display altered activation as the disease progresses. Our data show that L41 treatment in APP/PS1 mice promotes a moderate reduction of the amyloid load, which may be explained by the induction of an activated microglia phenotype expressing increased levels of TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) and IDE (insulin degrading enzyme), two microglial proteins that have been demonstrated to regulate A β deposition in AD mouse models ([Guerreiro, Wojtas et al. 2013](#), [Fol. Braudeau et al. 2015](#), [Zhao, Wu et al. 2018](#)). A previous study reported that inhibition of calpains mitigate AD pathology and cognitive decline in 3xTgAD mice ([Medeiros, Kitazawa et al. 2012](#)). We show that L41 has no effect on calpains activity which remains elevated in APP/PS1 mice. Interestingly, selective effect on DYRK1A proteolysis by Leucettine L41 improved synaptic plasticity measured by LTP and rescued spatial learning, working memory and long term memory impairments in APP/PS1 mice tested with the Y-maze and the Morris water maze tasks at 14 months of age. These findings suggest that preventing DYRK1A proteolysis is sufficient to observe disease-modifying effects in this mouse model. This is supported by comparative evaluation of another synthetic analogue of Leucettamine B, the Leul in APP/PS1 mice at the same age. As showed *in vitro* (see Fig 2B), Leul is unable to prevent DYRK1A proteolysis. Using similar experimental conditions, we compared Leul and L41-treated APP/PS1 mice (Supplementary Fig 4). No rescue of DYRK1A_{FL} levels and DYRK1A_T in astrocytes or no significant decrease of pro-inflammatory cytokines were observed in Leul treated animals (Supplementary Fig 4A-C). Moreover, no decrease of the amyloid plaque burden and no improvement of the spatial / long-term memory were measured (Supplementary Fig 4D-F). These data confirm the role of DYRK1A proteolysis in AD progression and the potential interest of this mechanism as a new therapeutic target to counteract the disease.

In summary, we provide several converging lines of evidence that DYRK1A is proteolyzed in both AD patients and APP/PS1 mouse hippocampus. We show that truncated forms of DYRK1A accumulate in astrocytes and that its global kinase activity remains unchanged. However, kinase specificity of truncated DYRK1A is reduced leading to increase its affinity toward STAT3 α , a major regulator of inflammation We demonstrate that decreasing production of truncated forms of DYRK1A by Leucettine L41 in an AD-like mouse model, reduces levels of inflammatory cytokines, improves clearance of amyloid- β plaques through microglia recruitment and activation, and consequently improves synaptic plasticity and memory. Inhibitors of DYRK1A proteolysis could be of interest as a novel therapeutic strategy for AD.

Acknowledgments & fundings

We thank Françoise Fouquet for mouse genotyping. This work was supported by Fonds Unique Interministériel (FUI TRIAD) and a grant from “Investissement d'Avenir - ANR-11-INBS-0011” - NeurATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences. Human postmortem samples were obtained from the GIE-Neuro-CEB brain bank, which is run by a consortium of patient associations. LM was supported by the Fondation Jérôme Lejeune and by “Fonds Unique Ministériel” and a Conseil Régional de Bretagne (FUI TRIAD) grant.

Authors' contributions

BS, JB and NC carried out the design of the study and wrote the manuscript. JMB, LM and NJ helped to design the study and contributed to writing of the manuscript. BS, MA, and JB performed *in vivo* experiments and biochemical, histological, and statistical analyses. BJM performed the electrophysiological recordings. JD, YG and NJ performed the calpain and DYRK1A activity measurements. RF, NSO, ST, GDC, and SA participated in the biochemical and histological analyses. The compounds Leucettine L41 and Leul were synthesized by EL, FC, and JPB and provided by ManRos Therapeutics. All authors read and approved the final manuscript.

II. Article 2 : Modélisation de la phase préclinique de la pathologie Alzheimer chez le rat.

OXFORD

Cerebral Cortex, 2017; 1–18

doi: 10.1093/cercor/bhx260
Original Article

ORIGINAL ARTICLE

β APP Processing Drives Gradual Tau Pathology in an Age-Dependent Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease

Mickael Audrain^{1,2,3}, Benoit Souchet^{1,3,4}, Sandro Alves^{1,3}, Romain Fol^{1,2,3}, Arthur Viode⁵, Alexis Haddjeri⁶, Satoru Tada^{1,3}, Nicola S. Orefice^{1,3}, Charlène Joséphine^{3,7}, Alexis-Pierre Bemelmans^{3,7}, Thierry Delzescaux^{3,7}, Nicole Déglon^{8,9}, Philippe Hantraye^{3,7,10}, Yvette Akwa¹¹, François Becher⁵, Jean-Marie Billard⁶, Brigitte Potier⁶, Patrick Dutar⁶, Nathalie Cartier^{1,3} and Jérôme Braudeau^{1,3}

¹INSERM UMR1169, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay 94100, France, ²Université Paris Descartes, Paris, France, ³CEA, DRF, Institut François Jacob, MIRCen, Fontenay-aux-Roses 92265, France, ⁴Université Paris Saclay, Paris, France, ⁵CEA, Institut Frédéric Joliot, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, 91191, Gif-sur-Yvette, France, ⁶INSERM UMR894, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, ⁷CNRS UMR9199, Fontenay-aux-Roses 92265, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay 94100, France, ⁸Department of Clinical Neurosciences, Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland, ⁹Neuroscience Research Center, Laboratory of Cellular and Molecular Neurotherapies, Lausanne University Hospital, Lausanne, Switzerland, ¹⁰INSERM UMS27, Fontenay-aux-Roses 92265, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay 94100, France and ¹¹INSERM U1195 and Université Paris Sud and Université Paris-Saclay, 80 rue du général Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France

Address correspondence to Jérôme Braudeau. Email: jerome.braudeau@agent-biotech.com.

Mickael Audrain and Benoit Souchet are joint first authors.

Jean-Marie Billard, Brigitte Potier and Patrick Dutar are contributed equally to this work. Nathalie Cartier and Jérôme Braudeau are contributed equally to this work.

Abstract

The treatment of Alzheimer's disease (AD) remains challenging and requires a better in depth understanding of AD progression. Particularly, the link between amyloid protein precursor (APP) processing and Tau pathology development remains poorly understood. Growing evidences suggest that APP processing and amyloid- β ($A\beta$) release are upstream of Tau pathology but the lack of animal models mimicking the slow progression of human AD raised questions around this mechanism. Here, we described that an AD-like β APP processing in adults wild-type rats, yielding to human APP, β CTF and $A\beta$ levels similar to those observed in AD patients, is sufficient to trigger gradual Tauopathy. The Tau hyperphosphorylation begins several months before the formation of both amyloid plaques and tangle-like aggregates in aged rats and without associated inflammation. Based on a longitudinal characterization over 30 months, we showed that extrasynaptic and emotional impairments appear before long-term potentiation deficits and memory decline and so before $A\beta$ and Tau aggregations. These compelling data allowed us to (1) experimentally confirm the causal relationship between β APP processing and Tau pathology in vivo and without Tau transgene overexpression, (2) support the amyloidogenic cascade and (3) propose a 4-step hypothesis of prodromal AD progression.

Key words: Alzheimer's disease, amyloid pathology, hippocampus, pre-clinical AD, Tau pathology

Introduction

Alzheimer's disease (AD), the most common cause of dementia, is characterized by a progressive accumulation of β -amyloid peptide (A β), Tau hyper-, and abnormal phosphorylation, and displays a decline in cognitive functions followed by senile plaques and tangles formation. A large body of evidence suggest that there is a long infra-clinical phase of AD, in which pathological changes begin decades before classical hallmarks (senile plaques and neurofibrillary tangles)([Rajan, Wilson et al. 2015](#)). Evidence suggests that soluble A β peptides play a pivotal role during this infra-clinical phase ([Ferreira, Lourenco et al. 2015](#)). Toxicity of soluble A β directly affects synaptic plasticity even before amyloid plaque deposition and the formation of neurofibrillary tangles ([Selkoe 2002](#), [Selkoe and Hardy 2016](#)). This infra-clinical phase has been poorly studied, despite increasing interest, largely due to the absence of pertinent animal models. Early stage animal models with a wide therapeutic window before amyloid and Tau deposition are highly needed, and would be more relevant in terms of human AD pathology than current transgenic models. Such models must fulfil specific requirements. First, the period prior to reaching an AD-like pathology is as essential as the full-blown disease. AD is an age-related disorder and models that display amyloid plaques or tangles too early in the life of the animal may not be relevant in terms of disease progression in humans ([Kitazawa, Medeiros et al. 2012](#)). Furthermore, most currently used AD models, generated over the last 20 years, are transgenic mice ([Lee and Han 2013](#)) and are based on very high transgene expression that hugely exceeds human levels ([Audrain, Fol et al. 2016](#)). Such overproduction is especially responsible for the supra-physiological release of amyloid peptides resulting in the early onset of histological brain lesions such as senile plaques, one of the hallmarks of AD. Several transgenic AD rat models have more recently been reported ([Abbott 2004](#)). Not only are rats widely used in toxicity studies, but their longer lifespan and their cognitive abilities makes them ideal for investigating the mechanisms of age-dependent neurodegenerative disease. The larger size of their brains (relative to mice) also facilitates translational procedures such as surgical procedures, magnetic resonance imaging, or positron emission tomography. Biological fluid collection such as plasma and cerebrospinal (CSF) is also simplified, reflecting the growing interest in the use of such models ([Do Carmo and Cuello 2013](#)). Strikingly, the gradual emergence of AD rat models has followed the same pattern as that for the prior development of transgenic mice in that they mostly focus on amyloid plaque formation. The first AD rat models did not develop senile plaques and were not considered to reproduce an AD phenotype ([Echeverria, Ducatenzeiler et al. 2004](#), [Ruiz-Opazo, Kosik et al. 2004](#), [Folkesson, Malkiewicz et al. 2007](#)). A few years later, 2 transgenic Sprague

Dawley rat models were developed in which amyloid plaques were triggered at 17 and 7 months of age ([Flood, Lin et al. 2009](#)). More recently, McGill-R-Thy1-amyloid protein precursor (APP) rats have been shown to display senile plaques as early as 6 months of age ([Leon, Canneva et al. 2010](#)). A drawback of these more recently developed models is that they form senile plaques relatively early in life. In this study, we developed and characterized an original rat model generated by AAV-mediated gene transfer (the AAVAD rat) to induce the production of amyloid derivatives with levels as close as those found in human AD hippocampi and without a significant transgene overexpression. Soluble A β 42 levels and the A β 42/40 ratio gradually increased in rat hippocampi and decreased in CSF. Moreover, amyloid plaque deposition as cerebral amyloid angiopathy (CAA) progressively occurred until very late in the life of the animals, that is, 2.5 years after injection. More importantly, endogenous Tau was progressively both hyper- and abnormally phosphorylated over time, and associated with increased levels of GSK3 β and DYRK1A kinases, resulting finally in phosphorylated Tau aggregate formation (AT8 and AT100 positive) in old rats. The biochemical, histological, electro-physiological, and behavioural evaluation of the AAV-AD rat highlighted the critical phases during infra-clinical disease progression implicated in AD and allowed us to propose a sequential AD progression hypothesis during infra-clinic stages, especially regarding β APP processing and Tau pathology links before inflammation processes and misfolded protein pathologies (senile plaques and tangles).

Material and Methods

Plasmid Design and Vector Production. We used a human double-mutant APP751 cDNA containing the Swedish and London mutations (codon optimized and containing a Kozak sequence; GeneArt, Life Technologies, Saint Aubin, France), and a human PS1 cDNA containing the M146L mutation (pENTR4-PS1-S182M146L). The APPSL and the PS1M146L sequences were cloned into an AAV2 plasmid with a CAG promoter to generate AAV2-CAG-APPSL or -CAG-PS1M146L. AAV vectors were produced as previously described (Berger et al. 2015), except that the AAV packaging plasmid was replaced with a plasmid construct containing the rep gene of AAV2 and the cap gene of AAV9.

Animals. We used 130 male Wistar rats (8-week-old; SARL JanvierLabs, Le Genest Saint Isle, France) in this study. All experiments were conducted in accordance with the ethical standards of French and European regulations (European Communities Council Directive 2010/63/EU, authorization number APAFIS#4449-2016031012491697).

Bace 1 Inhibitor Study. Bace1 inhibitor LY2886721 was purchased from ApexbioTechnology LLC, suspended in a DMSO/water mix (1:9) at 15 mg/mL, and orally administered by gavage in 1-month postinjected rats (15 mg/kg). Animals were killed 4 h later and tissues were collected as previously described. DMSO/water mix without the LY2886721 was used as vehicle for the control group.

Stereotactic Injections of AAVs. Rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine and placed in a stereotactic frame (Stoelting). Stereotactic intracerebral injections of AAVs into the hippocampi of both hemispheres were performed, using the following coordinates: antero-posterior: -3.6mm, lateral: ± 2.5 mm, ventral: -3.3mm relative to bregma. We injected 4 μ L of viral preparation into each site (2.5×10^{10} vg/site and 5×10^{10} vg/site for PS1 and APP, respectively) at a rate of 0.25 μ L/min. Two groups of animals were initially created, according to the viral vectors injected or co-injected: AAVCAG-PS1M146L (control rats), and AAV-CAG-APPSL + AAVCAG-PS1M146L (AAV-AD rats).

Human Brain Samples. Postmortem samples were obtained from brains collected as part of the Brain Donation Program of the GIE-Neuro-CEB Brain Bank, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France. Autopsies were carried out by accredited pathologists, after informed consent had been obtained from the relatives, in accordance with French Bioethics laws. Five hippocampal samples from 5 patients with sporadic forms of AD (male and female; Braak 6/Thal 5; aged between 69 and 89 years, with a postmortem interval (PMI) of 30–59 h) and 5 hippocampus samples from 5

age-matched control subjects (male and female, aged between 69 and 92 years, PMI of 6–63 h) were used in this study (Table 1).

Table 1 Details of human brain samples used.

	Gender	Age (years)	PMI (hours)	Clinical AD status	Diagnosis
	M	73	54	Braak V, Thal IV, CAA	AD
	F	89	59	Braak VI, Thal V, CAA	AD
	M	70	30	Braak VI, Thal V, CAA	AD
	M	69	30	Braak VI, Thal V, CAA	AD
	M	72	44	Braak VI, Thal V	AD
Mean	M (80%)	74.6	43.4	Braak VI, Thal V, CAA	AD
	F	92	21	Braak I	Ctrl
	M	58	6	Braak I-II	Ctrl
	M	82	63	Braak II, Thal I	Ctrl
	F	89	12	/	Ctrl
	M	69	6	/	Ctrl
Mean	M (60%)	74.5	21.75	Braak I, Thal I	Ctrl

Tissue Collection and Sample Preparation. Rats were anesthetized with ketamine/xylazine and were first placed in a stereotactic frame to collect CSF by puncturing the cisterna magna with a low dead space syringe. One hemisphere was postfixed by incubation for 72 h in 4% PFA, cryoprotected in 30% sucrose in PBS, and cut into 40 μ m sections with a freezing microtome (Leica) for histological analyses. The contralateral hemisphere was dissected for isolation of the hippocampus and cortex. Samples were homogenized in a lysis buffer (150mM NaCl and 1% Triton in Tris-buffered saline) containing phosphatase (Pierce) and protease (Roche) inhibitors and centrifuged for 20 min at 15 000 \times g. The same procedure was applied to human samples.

ELISA. Extracted A β was quantified using the MSD Human A β 42 VPLEX Kit and the triplex A β Peptide Panel 1 (6E10) V-PLEX Kit (Meso Scale Diagnostics). Rat endogenous A β 42 was assessed using the IBL Mouse/Rat Amyloid-beta (1-42) ELISA (IBL International GmbH). β CTF was quantified using the IBL APP β CTF Assay Kit (IBL International GmbH). Hyperphosphorylated Tau was quantified using the Innogenetics Phospho-Tau 181 P kit (Fujirebio Europe) and the MSD Phospho (Thr231)/Total Tau Kit (Meso Scale Diagnostics). The ELISA was performed according to the kit manufacturer's instructions in each case.

Western Blotting. Equal amounts of protein (30 μ g) were separated by electrophoresis in NuPAGE Bis-Tris Gels (Life Technologies) and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were hybridized with various primary antibodies: APP 6E10 (1/500, Covance), PS1 (1/1000, Millipore), APP C-ter (1/500, Millipore), GAPDH (1/1000, Abcam), P-Tau Thr 212 (1/1000, Invitrogen), P-Tau Thr 422 (1/1000, Invitrogen), CDK5 (1/1000, Abcam), GSK3 β (1/1000, Abcam), DYRK1A (1/250, Abnova), P-CamkII Thr 286 (1/1000, Abcam), GFAP (1/500, DAKO). Various secondary antibodies were also used: ECL horseradish peroxidase linked anti-rabbit, ECL

horseradish peroxidase linked Anti- mouse, ECL horseradish peroxidase linked anti-rat (all 1/2000, GE Healthcare) (Table 2).

Table 2. Table of used antibodies.

Detected antigen	Antibodies	Dilution/technique	Suppliers
Human APP (6E10)	Purified anti- β -Amyloid, 1-16 Antibody	1:500/WB	Biologend
Total APP (APP Cter)	Anti-APP A4 Antibody, a.a. 66–81 of APP [NT], clone 22C11	1:500/WB	Millipore
PS1	Anti-Presenilin-1 Antibody, loop, a.a. 263–378, CT, clone PS1-loop	1:1000/WB	Millipore
GAPDH	Anti-GAPDH antibody [6C5] (ab8245)	1:1000/WB	Abcam
p-CAMKII Thr286	Anti-CaMKII (phospho T286) ab32678	1:500/WB	Abcam
rodent APP (4 G8)	Purified anti- β -Amyloid, 17–24 Antibody	1:250/IH	Covance
Human APP (6E10)	Purified anti- β -Amyloid, 1–16 Antibody	1:250/IH	Covance
BAM10	beta Amyloid Monoclonal Antibody (BAM10)	1:250/IH	Thermo Scientific
CD31	Anti-CD31 antibody [EPR3094] (ab76533)	1:100/IH	Abcam
p-TAU Ser422	Phospho-Tau (Ser422) Polyclonal Antibody 44-764 G	1:1000/WB	Thermo Scientific
p-TAU Thr212	Phospho-Tau (Thr212) Antibody (44-740 G)	1:1000/WB	Thermo Scientific
AT8	Phospho-Tau (Ser202, Thr205) Monoclonal Antibody (AT8)	1:500/WB	Millipore
AT100	Phospho-Tau (Thr212, Ser214) Monoclonal Antibody (AT100)	1:500/WB	Millipore
GSK3 β	Anti-GSK3 beta antibody (ab73173)	1:500/WB	Abcam
DYRK1A	DYRK1A monoclonal antibody (M01), clone 7D10	1:250/WB	Abnova
CDK5	Anti-Cdk5 antibody [EP715Y] (ab40773)	1:1000/WB	Abcam
AT8	Phospho-Tau (Ser202, Thr205) Monoclonal Antibody (AT8)	1:250/IH	Millipore
AT100	Phospho-Tau (Thr212, Ser214) Monoclonal Antibody (AT100)	1:100/IH	Millipore

Immunohistochemistry and Image Acquisition. Cryosections were washed with 0.25% Triton in PBS and saturated by incubation (0.25% Triton in PBS/5% goat serum). They were then incubated with one or more of the following primary antibodies: APP C-ter, (1/500, Millipore), 4G8-Biotin (1/1000, Covance), 6E10 (1/500, Covance), BAM10 (1/500, ThermoFisher), CD31 (1/200, Abcam), AT8 P-Tau pSer202/Thr205 (1/1000, ThermoFischer), and AT100 P-Tau pThr212/Ser214 (1/1000, ThermoFisher). For nonfluorescent immunostainings, endogenous peroxidase was quenched with PBS containing 3% H₂O₂ for 5 min followed by amplification using the ABC system (VECTASTAIN Elite ABC HRP Kit, Vector Laboratories). Horseradish peroxidase conjugate and 3,3'-diaminobenzidine were then used according to the manufacturer's manual (Vector® DAB, Vector Laboratories). Images were captured using a Nikon Eclipse Ti Microscope or a Leica TCS SP8 confocal microscope and analysed using ImageJ software (NIH).

LC-MS/MS Analyses. Sample preparation was adapted from Barthelemy et al. (2016). Briefly, 20 μ L of 70% perchloric acid were added to 20 μ L of hippocampal extracts for protein precipitation. Samples were kept on ice for 15 min before centrifugation (15 min, 4 °C, and 16 000 g). Supernatants were collected and mixed with 40 μ L of 1% trifluoroacetic acid (TFA) before μ SPE extraction on Oasis HLB sorbent. Samples were loaded and washed with 500 μ L of 0.1% TFA in 10% acetonitrile on the sorbent, previously conditioned and equilibrated. Tau proteins were eluted with 100 μ L of 27.5% acetonitrile in 0.1% TFA. Extracts were evaporated to dryness with a Turbovap instrument (Biotage) (10 psi of nitrogen, 50 °C, 2 h). Samples were reconstituted with

35 μL of 50mM ammonium bicarbonate and digested overnight at 37 °C with 5 μL of 100 ng/ μL trypsin solution (sequencing grade modified trypsin, Promega, Madison, WI) in 50mM ammonium bicarbonate. Finally, the digest was acidified with 5 μL of 1M chloridric acid and used for subsequent LC-MS/MS analyses following addition of 2.5 ng of the 3 labeled PEPotec peptides. Capillary LC-HRMS was performed on an Ultimate 3000 chromatography system coupled to a Q-Exactive Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Ten microliters of the sample extract were injected and loaded for 3min at a flow rate of 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ on a $\mu\text{Precolumn}$ C18 Pepmap100 (0.3mm \times 5mm, 5 μm) (Thermo Scientific). Peptide separation was achieved in 60 min using an Acclaim Pepmap RSCL C18-100A column (0.3mm \times 150mm, 2 μm) (Thermo Scientific) at a flow rate of 6 $\mu\text{L}/\text{min}$. The column oven temperature was set to 35 °C. The mobile phases were (A) 0.1% formic acid in water and (B) 0.1% formic acid in 80% MeOH. After an isocratic step of 3 min at 4% phase B, a linear gradient from 4% to 55% B was run for 30 min, then increased to 90% B. An equilibration step was performed at 4% B for 20 min. Data were acquired in the positive ion mode with an ion spray voltage of 4 kV, a capillary temperature set to 320 °C, and sheath gas at 5. S-lens RF were set at 60. The AGC target was set to 1e6 and Orbitrap resolution to 70 000 at 200 m/z for all experiments. A time-scheduled sequential PRM method was established targeting the following p-Tau peptides corresponding to Tau protein phosphorylation on residues Ser202, Thr217, Thr231/Ser235 (Table 3).

Table 3. MS parameters for LC-MS/MS analysis of Ser 202, Thr 217 and Thr231/Ser235 as well as their corresponding labeled peptides.

Peptide sequence	Precursor ion m/z	Product ion m/z	Normalized collision energy %	Retention time (min)
SGYSSPGSPGTPGSR	737.30 (z = 2)	1166.4838 (y12)	22	17.7
		1079.4517 (y11)		
		992.4197 (y10)		
		895.3669 (y9)		
		838.3455 (y8)		
		671.3471 (y7)		
		416.2252 (y4)		
		496.7135 (y10 + 2)		
		308.1241 (b3)		
		308.1241 (b3)		
SGYSSPGSPGTPGSR [¹³ C _{13k} , ¹⁵ N _{15l}]	742.31 (z = 2)	1176.4920 (y12)	22	17.7
		1089.4600 (y11)		
		1002.4280 (y10)		
		905.3752 (y9)		
		848.3537 (y8)		
		761.3217 (y7)		
		426.2335 (y4)		
		501.7176 (y10 + 2)		
		308.1241 (b3)		
		308.1241 (b3)		
TPSLPFPITREPK	500.92 (z = 3)	1399.6981 (y12)	22	23.2
		1102.5293 (y9)		
		824.4625 (y7)		
		727.4097 (y6)		
		630.3570 (y5)		
		529.3093 (y4)		
		700.3527 (y12 + 2)		
		651.8263 (y11 + 2)		
		608.3103 (y10 + 2)		
		551.7683 (y9 + 2)		
467.2376 (y12 + 3)				
TPSLPFPITREPK [¹³ C _{13k} , ¹⁵ N _{15l}]	504.26 (z = 3)	1409.7064 (y12)	22	23.2
		1112.5375 (y9)		
		834.4707 (y7)		
		737.4180 (y6)		
		640.3652 (y5)		
		539.3175 (y4)		
		705.3568 (y12 + 2)		
		656.8304 (y11 + 2)		
		613.3144 (y10 + 2)		
		556.7724 (y9 + 2)		
470.5736 (y12 + 3)				
VAVVRtPPKsPSSAK	561.95 (z = 3)	978.4656 (y9)	22	16.5
		792.8810 (y14 + 2)		
		743.8925 (y14-98 + 2)		
		757.3624 (y13 + 2)		
		708.3740 (y13-98 + 2)		
		489.7364 (y9 + 2)		
		440.7480 (y9-98 + 2)		
		706.3648 (b6)		
		706.3648 (b6)		
		796.8881 (y14 + 2)		
747.8996 (y14-98 + 2)				
761.3695 (y13 + 2)				
712.3811 (y13-98 + 2)				
493.7435 (y9 + 2)				
444.7551 (y9-98 + 2)				
706.3648 (b6)				

The signal of up to 11 major and noninterfered fragment ions identified with high resolution from a common peptide precursor were summed up to provide one extracted ion chromatogram (XIC) for each p-Tau peptide (**Fig. 7C**). Isotope-labeled synthetic peptides with labeled amino acids lysine (K, label 13C615N2) or arginine (R, label 13C615N4) were used for signal

normalization and relative quantification of p-Tau peptides. Raw mass spectrometry data were exported to Skyline 3.7 for verification of the transitions ratio of unlabeled and labeled peptides. Xcalibur 2.2 software (Thermo Fisher Scientific) was used for quantitative data analysis.

Behavioural Assessment.

Open-field: The apparatus consisted of an open-topped, clear plexiglas box measuring 90 × 90 × 70cm placed in a room with controlled dim lighting (40 lux) and constant white noise at 40 dB. The rats were placed in the centre of the arena and a video recording was made over a period of 5 min. The behaviour of the animals was analysed from this video. The arena was divided into a central region and a peripheral region, and the time spent in the centre and periphery of the open-field was measured.

Morris water maze: Experiments were performed in a tank of 180 cm in diameter and 50 cm deep, filled with opacified water kept at 21 °C, and equipped with a platform of 18 cm in diameter, submerged 1 cm below the surface of the water. Visual clues were positioned around the pool and the luminosity was maintained at 350 lux. The rats were initially exposed to a learning phase, which consisted of daily sessions (3 trials per session) on 5 consecutive days. The starting position varied pseudo-randomly, between the 4 cardinal points. A mean interval of 20 min was left between trials. The trial was considered to have ended when the animal reached the platform. Longterm spatial memory was assessed 72 and 120 h after the last training trial in a probe trial in which the platform was no longer available. Animals were monitored using EthoVision software.

Ex Vivo Electrophysiology. Rats were anesthetized with halothane and decapitated. The brain was rapidly removed from the skull and placed in chilled (0–3 °C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing 124mM NaCl, 3.5mM KCl, 1.5mM MgSO₄, 2.5mM CaCl₂, 26.2mM NaHCO₃, 1.2mM NaH₂PO₄, 11mM glucose. Transverse slices (300–400 µm thick) were cut with a vibratome and placed in ACSF in a holding chamber, at 27 °C, for at least 1 h before recording. Each slice was individually transferred to a submersion-type recording chamber and submerged in ACSF continuously superfused and equilibrated with 95% O₂, 5% CO₂.

Tonic current: The biophysical properties of the tonic current generated by the activation of extrasynaptic NMDA receptors with ambient glutamate were evaluated. Whole-cell patchclamp recordings of CA1 pyramidal cells were performed at room temperature, with borosilicate patch pipettes (5MΩ) filled with a buffer containing 140mM CsCH₄O₃S, 6mM CsCl, 2mM MgCl₂, 10mM HEPES, 1.1mM EGTA, 5mM QX-314, and 4mM ATP, at a pH of 7.3 at 290 mosm. Transmembrane currents were acquired and filtered through an amplifier (AxoPatch 1-D, Axon

Instruments), stored on a computer, and digitized using WinLTP software for analysis. The tonic current was recorded at a holding potential of +40 mV, in the presence of TTX (1 μ M), NBQX (10 μ M), and bicuculline (10 μ M), to isolate the NMDA component of the holding current (hc). After recording a stable control hc for 3–5 min, APV (50 μ M) was added to the superfusion medium. The hc fell to a new stable value under the effect of APV, and the difference between the control hc and its value in the presence of APV determined the amplitude of the tonic current.

Long-term potentiation (LTP) and depression (LTD): For the LTP, theta-burst stimulation (TBS), mimicking the natural stimulation at the theta frequency from the medial septum to the hippocampus, consisted of 5 trains of four 100 Hz pulses each, separated by 200 ms and delivered at the test intensity. The sequence was repeated 3 times, with an interburst interval of 10 s. Testing with a single pulse was resumed for 60 min (TBS) to determine the level of LTP. The LTD was induced by the application of low frequency stimulation (LFS): 1 Hz for 15 min or 2 Hz for 10 min. Responses were recorded for at least for 45 min after LFS.

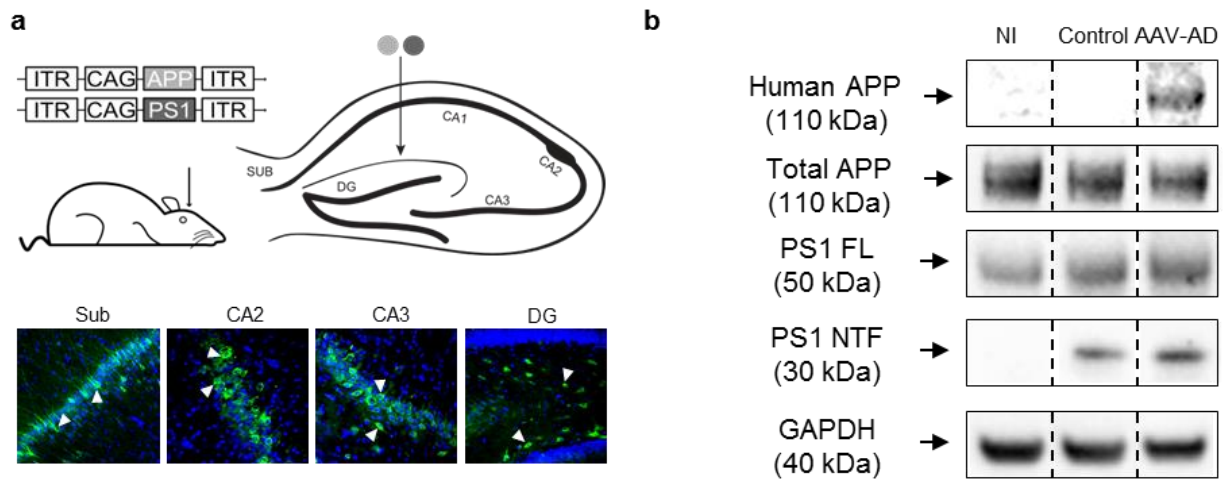
Statistical Analysis. Data are expressed as the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software) or Statistica (StatSoft, Inc.) software and the statistical significance was set to a P-value < 0.05 for all tests. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test or 2-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test were used to determine the significance of differences between groups. Student's t-test was used when only 2 groups were analyzed.

Results

AAV-AD Induction in Wild-Type Adult Rat Hippocampi

We generated AAV vectors encoding human mutant PS1M146L and human mutant APPSL (Swedish & London mutations) that were bilaterally co-injected into the stratum lacunosum of the hippocampus of 8-week-old male Wistar rats (**Fig. 1A**). We used the AAV9 capsid known to efficiently transduce the hippocampus ([Fol, Braudeau et al. 2015](#), [Alves, Churlaud et al. 2017](#)). We injected AAV-AD rats (n = 8) with both APPSL and PS1M146L AAV constructs, whereas the control group (n = 4) was only injected with the AAV-PS1 virus. We evaluated vector-mediated APP and PS1 expression in the hippocampus 1-month later. Western blot analysis of whole hippocampal extracts revealed comparable PS1 full-length (PS1 FL) levels in injected and noninjected rats. A 30-kDa PS1 N-terminal fragment (PS1 NTF) was mostly detectable in injected hippocampi, confirming the formation of the PS1 active site responsible for the formation of A β species, without PS1 FL accumulation. Similarly, human APP was expressed from 1-month after injection without a significant increase of total APP (human + rat forms; **Fig. 1B**). We assessed the engagement of the amyloidogenic pathway by first confirming the production of β CTF (C99 fragment; Control: 6.20 ± 0.97 pMol/L; AAV-AD: 11.28 ± 0.31 pMol/L; 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test: P = 0.012), the first cleavage product of APP by BACE1 (**Fig. 1C**) ([Hardy and Higgins 1992](#)). We also confirmed that AAV-AD induction resulted in the substantial release of both soluble A β 40 (Control: 1.25 ± 1.25 pg/mL; AAV-AD: 14.31 ± 1.46 pg/mL; 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test: P = 0.0001) and A β 42 peptides (Control: 0.25 ± 0.25 pg/mL; AAV-AD: 6.78 ± 0.68 pg/mL; one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test: P = 0.0001) relative to control rats (**Fig. 1D,E**). A β levels in the cerebrospinal fluid (CSF) of AD patients has a diagnostic potential as a biomarker ([Dubois, Feldman et al. 2014](#)). We evaluated the dispersion of both A β peptides from the hippocampus to the CSF 1-month after injection. Despite the expected absence of β CTF in the CSF (data not shown), AAV-AD induction led to an increase of both A β 40 (Control: 0.94 ± 0.34 pg/mL; AAV-AD: 6.00 ± 1.03 pg/mL; 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test: P = 0.007) and A β 42 (Control: 0.35 ± 0.09 pg/mL; AAV-AD: 5.46 ± 0.97 pg/mL; 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test: P = 0.009) levels in CSF (**Fig. 1F,G**). We administered the β -secretase (also known as BACE) inhibitor, LY2886721, diluted in DMSO, by gavage in 1-month postinjected AAV-AD rats to confirm the involvement of BACE in AAV-AD induction. We observed a complete inhibition of β CTF production 4 h after gavage (**Fig. 1C**; LY2886721-treated AAV-AD: 7.06 ± 0.65 pMol/L; 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test: P = 0.008) confirming BACE1-dependent β CTF production. In agreement with the amyloidogenic

cascade hypothesis ([Hardy and Higgins 1992](#)), decreasing β CTF levels also led to decreases in both A β 40 (LY2886721-treated AAV-AD: 4.40 ± 0.99 pg/mL; 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test: $P < 0.0001$) and A β 42 (LY2886721-treated AAV-AD: 2.30 ± 0.41 pg/mL; one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test: $P < 0.0001$) production (**Fig. 1D,E**). In a similar manner, both A β 40 (LY2886721-treated AAV-AD: 3.23 ± 0.49 pg/mL; one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test: $P = 0.04$) and A β 42 (LY2886721-treated AAV-AD: 2.25 ± 0.57 pg/mL; 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test: $P = 0.02$) levels decreased in CSF 4 h after gavage with LY2886721 (**Fig. 1F,G**). Altogether, these data indicate BACE1-dependent engagement of the amyloidogenic cascade from 1-month postinjection. In addition, a positive linear correlation between hippocampal and CSF A β 42 levels (Pearson correlation coefficient test: $P = 0.0051$, $r_2 = 0.56$; **Fig. 1H**) suggests that A β 42 may passively spread from the hippocampus to the CSF.



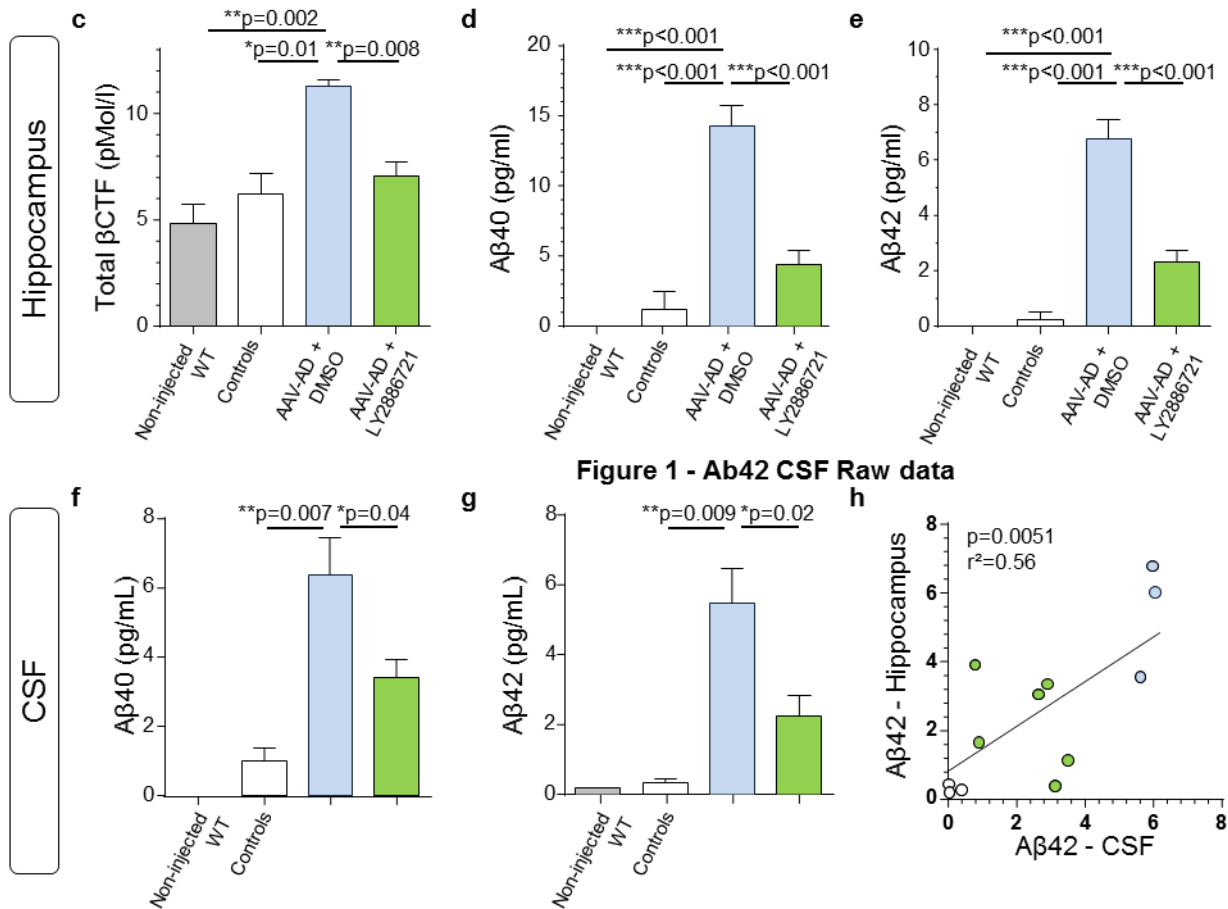


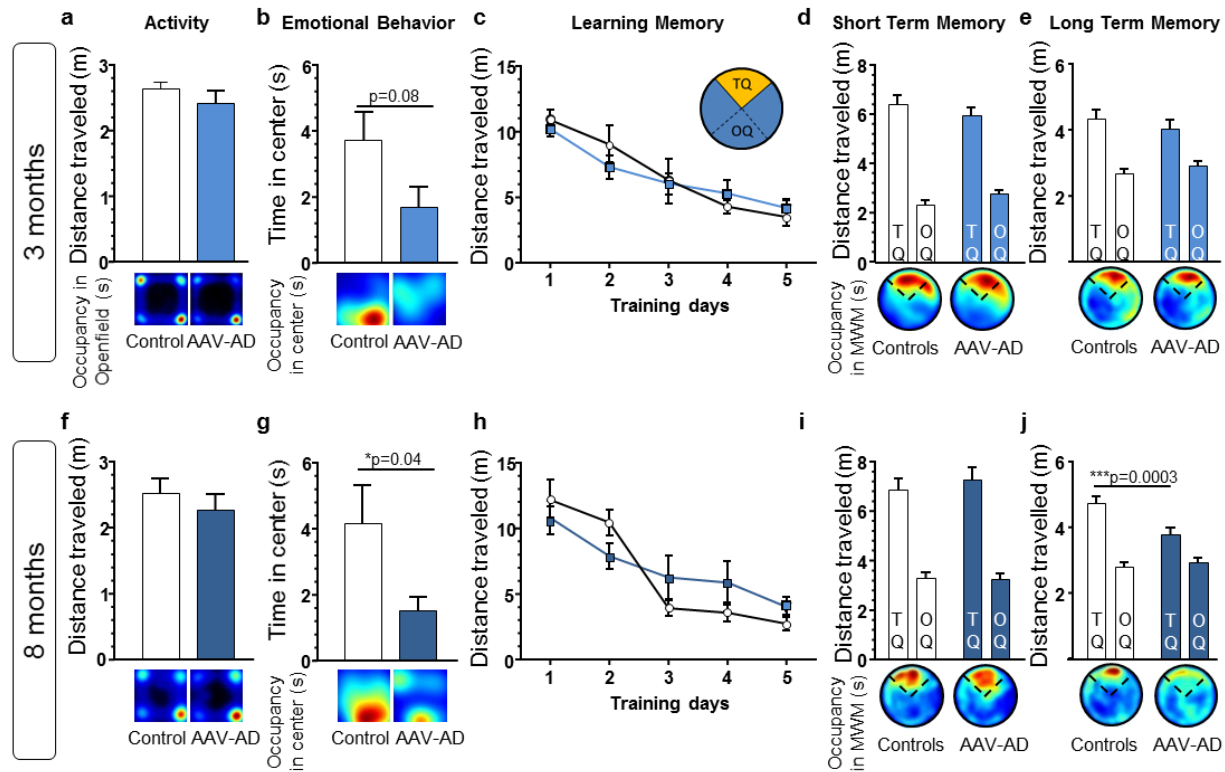
Figure 1. AAV-AD induction leads to BACE1-dependent APP processing in the hippocampus of adult rats. We generated AAV vectors encoding mutated human PS1M146L and mutated human APPSL, and injected them bilaterally into the stratum lacunosum of the rat hippocampus. Rats received either the AAV-CAG-PS1M146L vector (control, $n = 4$) or both AAV-CAG-PS1M146L and AAV-CAG-APPSL vectors (AAV-AD, $n = 8$). Rats were killed 1-month after vector injection for transgene expression analysis in the hippocampus. (A) Upper panel: schematic representation of the injection site in the rat hippocampus. Bottom panel: Confocal microscopy acquisition performed in sections from AAV-AD hippocampus: human APP (green) was expressed in sparse neurons in CA2/CA3 layers (blue) but also in the subiculum (Sub) and dentate gyrus (DG) subfields (APP C-ter antibody). (B) Representative western blots showing the expression of human APP (6E10 antibody), total APP (rat + human forms; APP C-ter antibody) and PS1 (full-length: PS1 FL and N-terminal fragment: PS1 NTF), confirming transgene expression 1-month after injection. All western blots were performed on whole hippocampal extracts (TBS-Tx soluble fraction). (C-E) Comparative analysis of TBS-Tx soluble β CTF (C), A β 40 (D) and A β 42 (E) levels by ELISA and MSD multiplex immunoassay in hippocampi from non-injected, controls and AAV-AD rats. A fourth group of AAV-AD rats treated with the Bace1 inhibitor LY2886721 has been also studied. (F-H) Comparative analysis of CSF A β 40 (F) and CSF A β 42 (G) levels by MSD multiplex in the same groups previously described. A β 42 content in hippocampus strongly correlated with CSF A β 42 (H). Bars represent the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

AAV-AD Induction Leads to Progressive Cognitive Impairment

We evaluated whether human-like APP processing in AAV-AD rats is associated with progressive cognitive and behavioural dysfunction over time, relative to controls at 3 ($n = 20$) and 8 months ($n = 20$) after AD induction. We first analysed anxiety like emotional behaviour in a new environment using the open-field task, 3 months after AAV-AD induction. The control and AAV-AD rats travelled similar total distances, confirming the absence of motor abnormalities or hyperactivity (**Fig. 2A**). We observed no significant differences in time spent in the centre of the area, despite a downward trend (Control: 3.73 ± 0.93 s; AAV-AD: 1.70 ± 0.62 s; Student's t-test: $P = 0.08$; **Fig. 2B**). We tested AAV-AD and control rats in the Y-maze and Novel Object

Recognition (NOR) tasks to evaluate their working and short-term memories. We observed no differences between the 2 groups (data not shown). Finally, we assessed spatial learning and short and long-term memories using the Morris Water Maze paradigm. There was no difference in the distance travelled to find the hidden platform or the time spent in the target quadrant (data not shown), that contains the platform, during the 5 consecutive training days (**Fig. 2C**). We then performed 3 probe trials to estimate short (4 h after the last trial) and long-term memories (mean of 72 h and 120 h probes; **Fig. 2D,E**). We detected no statistical differences between the groups. We then tested AAV-AD rats at 8 months after induction using the same approaches. Despite the absence of locomotor hypo-activity (**Fig. 2F**), AAV-AD rats spent significantly less time in the centre of the open-field apparatus (Control: 4.15 ± 1.17 s; AAV-AD: 1.50 ± 0.43 s; Student's t-test: $P = 0.04$; Fig. 2G). We detected no behaviour differences in the Y-Maze or NOR tasks (data not shown). We detected no statistical differences during the learning session and the 4 h probe test (short-term memory; **Fig. 2H,I**) of the Morris Water Maze task, but did observe a significant decrease of the mean time spent (long-term memory: Control: 22.40 ± 0.92 s; AAV-AD: 18.54 ± 0.99 s; 2-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test: $P = 0.0064$; Supplementary Fig. 1) and mean distance travelled (long-term memory: Control: 4.74 ± 0.22 m; AAV-AD: 3.81 ± 0.18 m; 2-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test: $P = 0.0003$; **Fig. 2J**) in the target quadrant during the 72 h/120 h probes. Altogether, AAV-AD rats present emotional and memory impairment between 3 and 8 months postinduction, before both amyloid and phosphorylated Tau aggregations.

Figure 2. Early emotional disturbances and progressive long-term memory impairment. We evaluated behavioural impairment in AAV-AD rats relative to controls at 3 ($n = 20$) and 8 months ($n = 20$) after AD induction. (A, B) Open-field assay of 3-months AAV-AD rats. (A) Distance travelled during the open-field task. (B) Time spent in the centre of the open-field area. (C-E) Morris water maze assay of 3-months AAV-AD rats. (C) Learning curves representing the travelled distance during the 5 training days in the 4 quadrants (TQ = target quadrant that housed the platform during the training sessions, OQ = mean of other quadrants). (D) Probe trial performance at 4 h after the last training session. (E) Probe trial performance at 72 h and 120 h after the last training session. (F-G) Open-field assay of 8-months AAV-AD rats. (F) Distance travelled during the open-field task. (G) Time spent in the centre of the open-field area showing a change in emotional behaviour when faced to a new environment in AAV-AD rats. (H-J) Morris water maze assay of 8-month AAV-AD rats. (H) Travelled distance during the 5 training days in the 4 quadrants. (I) Probe trial performance at 4 h after the last training session. (J) Probe trial performance at 72 and 120 h after the last training session showing a long-term memory impairment in AAV-AD rats. For each figure, bottom group occupancy plots allow to visualize the areas in which the animals spent the most time during the test. Bars represent the means \pm SEM. Statistical analysis were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test or 2-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test depending on the experimental design.

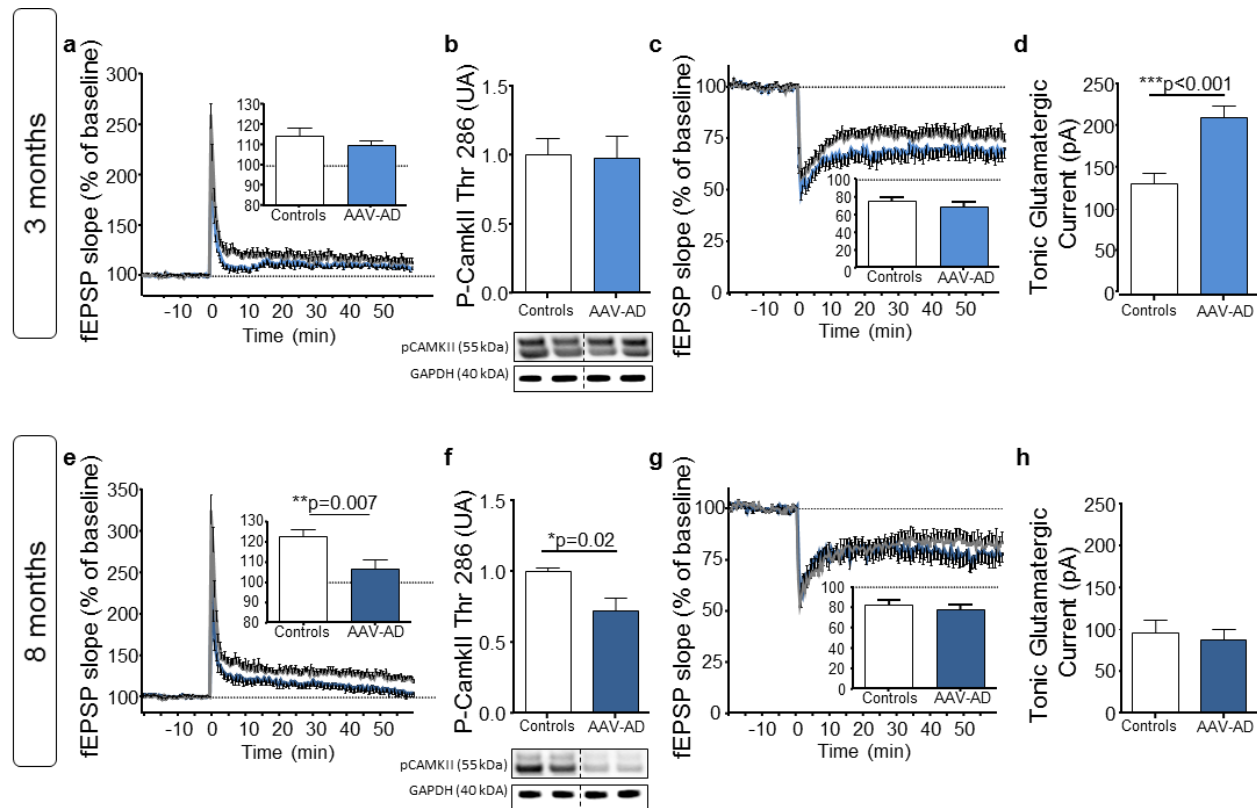


Transient Extrasynaptic Deficits Precede LTP Impairment

Here, we evaluated synaptic plasticity and extrasynaptic receptor activation essential for newly formed memories. We first induced LTP at the Schaffer collateral to CA1 pathway by TBS in control ($n = 13$) and AAV-AD ($n = 16$) rats, 3 months after induction (**Fig. 3A**). We observed no significant difference in LTP between the 2 groups (Student t-test: $P > 0.05$), confirmed by the absence of the decrease in Thr 286 phosphorylation of calcium/calmodulin-dependent kinase II (CamkII), implicated in LTP mechanisms (Fukunaga et al. 1995; Lledo et al. 1995) (**Fig. 3B**). We then performed LTD recordings and again observed no significant differences between the AAV-AD and control groups (Student's t-test: $P > 0.05$; **Fig. 3C**). In parallel, we recorded the tonic current generated in CA1 pyramidal cells by the ambient levels of glutamate acting on extrasynaptic NMDA receptors (NMDAR). The amplitude of the tonic current was significantly greater in the AAV-AD rats than in the control group (Control: 133.8 ± 11.84 pA, $n = 11$; AAV-AD: 213.0 ± 13.60 pA, $n = 16$; Student's t-test: $P = 0.0004$; **Fig. 3D**). We recorded the same parameters in 8-month postinjected rats. AAV-AD rats exhibited significantly lower induction and maintenance of LTPs compared with the control rats (Control: $122.8 \pm 3.35\%$, $n = 13$; AAV-AD: $106.6 \pm 4.41\%$, $n = 11$; Student's t-test: $P = 0.007$; **Fig. 3E**). This LTP impairment was associated with a decrease of CamkII phosphorylation (Control: 1.0 ± 0.02 ; AAV-AD: 0.72 ± 0.08 ; Student's t-test: $P = 0.007$;

Fig. 3F). In contrast, LTD, as the tonic glutamatergic current, was not impaired at this age (**Fig. 3G,H**). Altogether, these data suggest that transient extrasynaptic activation occurs before LTP impairment in the early phases.

Figure 3. Transient extrasynaptic activation preceded LTP impairment. (A-D) Electro-physiological properties of Glutamate receptors, 3 months after AAV-AD induction. The LTP (A), the P-CamKII levels (B), the long-term depression (LTD, C), and the tonic current representing the activation of extrasynaptic NMDA receptors (NMDAR, D) were evaluated in 3-month AAV-AD rats ($n = 10$) relative to control rats ($n = 10$). (E-H) Electro-physiological properties of Glutamate receptors, 8 months after AAV-AD induction: the LTP (E), the P-CamKII levels (F), the LTD (G), and the activation of extrasynaptic NMDAR (H) were quantified in 8-month AAV-AD rats ($n = 13$) compared with control rats ($n = 13$). Bars represent the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using the Student's t-test.

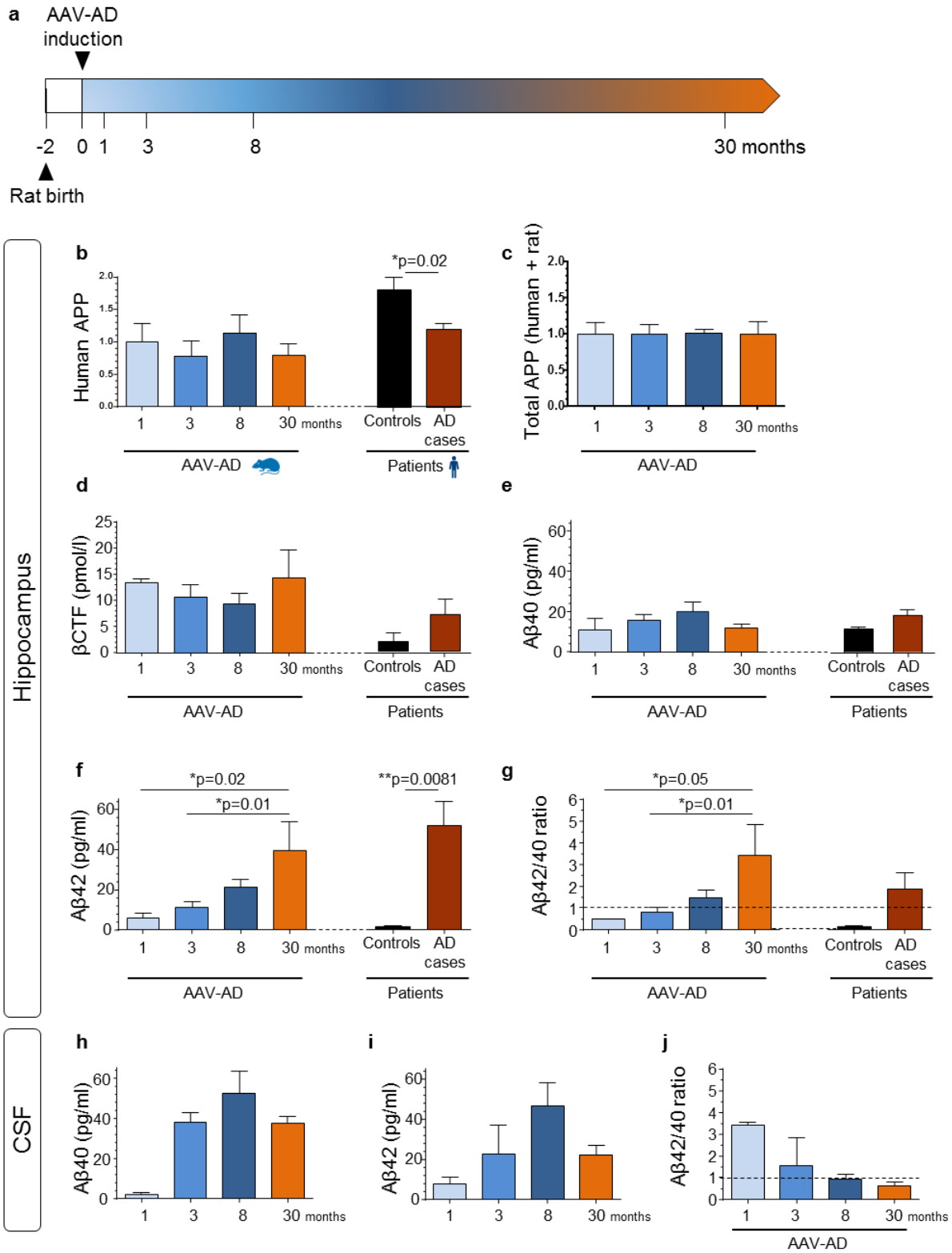


AAV-AD Rats Develop Progressive AD-Like APP Processing Over Time in the Hippocampus

We established that human APP of AAV-AD rats is processed following the amyloidogenic pathway. We next measured the levels of these metabolites in the hippocampi of AAV-AD rats 1 ($n = 4$), 3 ($n = 15$), 8 ($n = 15$), and 30 months ($n = 5$) after AD induction to evaluate their evolution over time (**Fig. 4A**). These were then compared to those measured in human AD hippocampi (5 age-matched controls + 5 AD Braak 6/Thal 5 patients), which served as a reference. Human APP as total APP levels, did not increase with time in AAV-AD rats (**Fig. 4B,C**). Human APP content was lower in AD cases than in age-matched controls (Student's t-test: $P = 0.02$) and remarkably close to the APP content in the hippocampi of AAV-AD rats (**Fig. 4B**; AAV-AD: 1 month: 1.0 ± 0.28 , 3 months: 0.78 ± 0.24 , 8 months: 1.13 ± 0.29 , 30 months: 0.79 ± 0.18 ; human controls: 1.77

± 0.19 ; AD patients: 1.17 ± 0.10). Similarly, β CTF levels did not increase over time (**Fig. 4D**). We did not observe a significant increase in A β 40 production, whereas A β 42 content progressively increased (**Fig. 4E,F**; 1 month: 5.93 ± 2.58 pmol/L; 3 months: 11.41 ± 2.75 pmol/L; 8 months: 20.94 ± 4.26 pmol/L; 30 months: 39.26 ± 14.40 pmol/L; 1-way ANOVA: time effect: $P = 0.01$), leading to a steady increase in the A β 42/40 ratio in the hippocampi of AAV-AD rats from 1 to 30 months after injection (**Fig. 4G**; 1 month: 0.47 ± 0.02 ; 3 months: 0.81 ± 0.22 ; 8 months: 1.45 ± 0.37 ; 30 months: 3.412 ± 1.41 ; 1-way ANOVA: time effect: $P = 0.02$). The A β 40 and A β 42 content, as well as the A β 42/40 ratio at 30 months Postinjection were comparable to those observed in the hippocampus of late stage AD patients (**Fig. 4E,G**). A similar analysis of the CSF confirmed an increase of both human amyloid peptides in AAV-AD rats at 1, 3, and 8 months postinjection (A β 40: 1 month: 2.14 ± 1.02 pg/mL; 3 months: 38.07 ± 4.79 pg/mL; 8 months: 52.23 ± 11.45 pg/mL; A β 42: 1 month: 7.43 ± 3.75 pg/mL; 3 months: 22.44 ± 14.54 pg/mL; 8 months: 46.37 ± 11.54 pg/mL). In contrast, both A β 40 (37.47 ± 3.65 pg/mL) and A β 42 (21.89 ± 495 pg/mL) tended to decrease in CSF samples at 30 months postinjection (**Fig. 4H,I**). The CSF A β 42/40 ratio progressed in the opposite direction relative to that of the hippocampus, decreasing over time (**Fig. 4J**; 1 month: 3.40 ± 0.13 ; 3 months: 1.54 ± 1.32 ; 8 months: 0.91 ± 0.25 ; 30 months: 0.60 ± 0.19). In summary, we showed that our model faithfully mimics human amyloid processing (A β levels and A β 42/40 ratio) without APP accumulation in either the hippocampus or CSF.

Figure 4. A β 42/40 ratio increases in hippocampus and decreases in CSF from 1 to 30 months. Metabolites resulting from the amyloidogenic pathway were released into the hippocampus of AAV-AD rats. Rats were killed at 1 ($n = 4$), 3 ($n = 15$), 8 ($n = 15$), and 30 ($n = 5$) months after AAV-AD induction. Human hippocampal samples were obtained from late-onset AD cases (Braak 6, Thal 5, $n = 5$) and age-matched controls ($n = 5$). (A) Schematic representation of the experimental design for the progressive AAV-AD rat model. (B–C) Densitometric analyses of western blots of human APP (6E10 antibody, B) and total APP (rat + human forms; 22C11 antibody, C) of the hippocampus of AAV-AD rats for each time-point and for human samples ($n = 5$ per group). (D–F) Comparative analysis of TBS-Tx soluble β CTF (D), A β 40 (E), and A β 42 (F) levels by Elisa and MSD multiplex respectively. (G) Representation of the A β 42/40 ratio determined by multiplex MSD immunoassay. (H–I) Comparative analysis of soluble A β 40 (H) and A β 42 (I) CSF levels by MSD multiplex. (J) Representation of the CSF A β 42/40 ratio over time. Bars represent the means \pm SEM. Statistical analyses were performed using 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.



Hippocampal Senile Plaques and CAA Appear at Late Stages in the AAV-AD Rat Model

Most AD animal models develop early amyloid plaques due to massive overexpression of human transgenes, resulting in A β accumulation over time that largely exceeds human pathophysiological levels. Here, we evaluated amyloid deposition in AAV-AD rats with several antibodies that detect A β . Immunostaining with 4G8, 6E10, and BAM10 antibodies revealed hippocampal amyloid plaques at 30 months post injection (**Fig. 5A**). The plaques were mostly located in the subiculum of the hippocampus (**Fig. 5B**), and were also present at the junction of different tissue layers (**Fig. 5C**). Nonetheless, we detected plaques at different stages of their formation (**Fig. 5D**) from diffuse to dense core plaques. Confocal imaging and 3D reconstruction of 4G8 immunostaining lesions confirmed the presence of amyloid lesions in the characteristic form of senile plaques (**Fig. 5E**). We used 4G8, 6E10, and BAM10 antibodies to confirm the presence of amyloid deposits in human AD tissue (**Fig. 5F**). We also carried out immunostaining and western blotting for GFAP to analyse potential astrocytic responses induced by amyloid APP processing in the AAV-AD rat model. We did not observe astrogliosis at any time-point after AAV-AD induction (Supplementary Fig. 3). In order to characterize the cerebral angiopathy in the AAV-AD rat hippocampus, we performed immunostainings with the same previously described antibodies. In 30-monthold AAV-AD rats, we observed characteristic CAA around the blood vessels layers (**Fig. 6A**). In order to better characterize the vessel-surrounding aggregation, we proceed to a double staining with both 4G8 and CD31 (a vessel marker) antibodies (**Fig. 6B**). Thus, we observed a blood vessel-surrounding amyloid sheath, observation confirmed by the 3D reconstruction (**Fig. 6C**). Altogether, these data indicate that a model exhibiting a slow progression to the AD phenotype can provide information about the initiation of amyloid deposition in the brain parenchyme as plaques and around vessels as CAA.

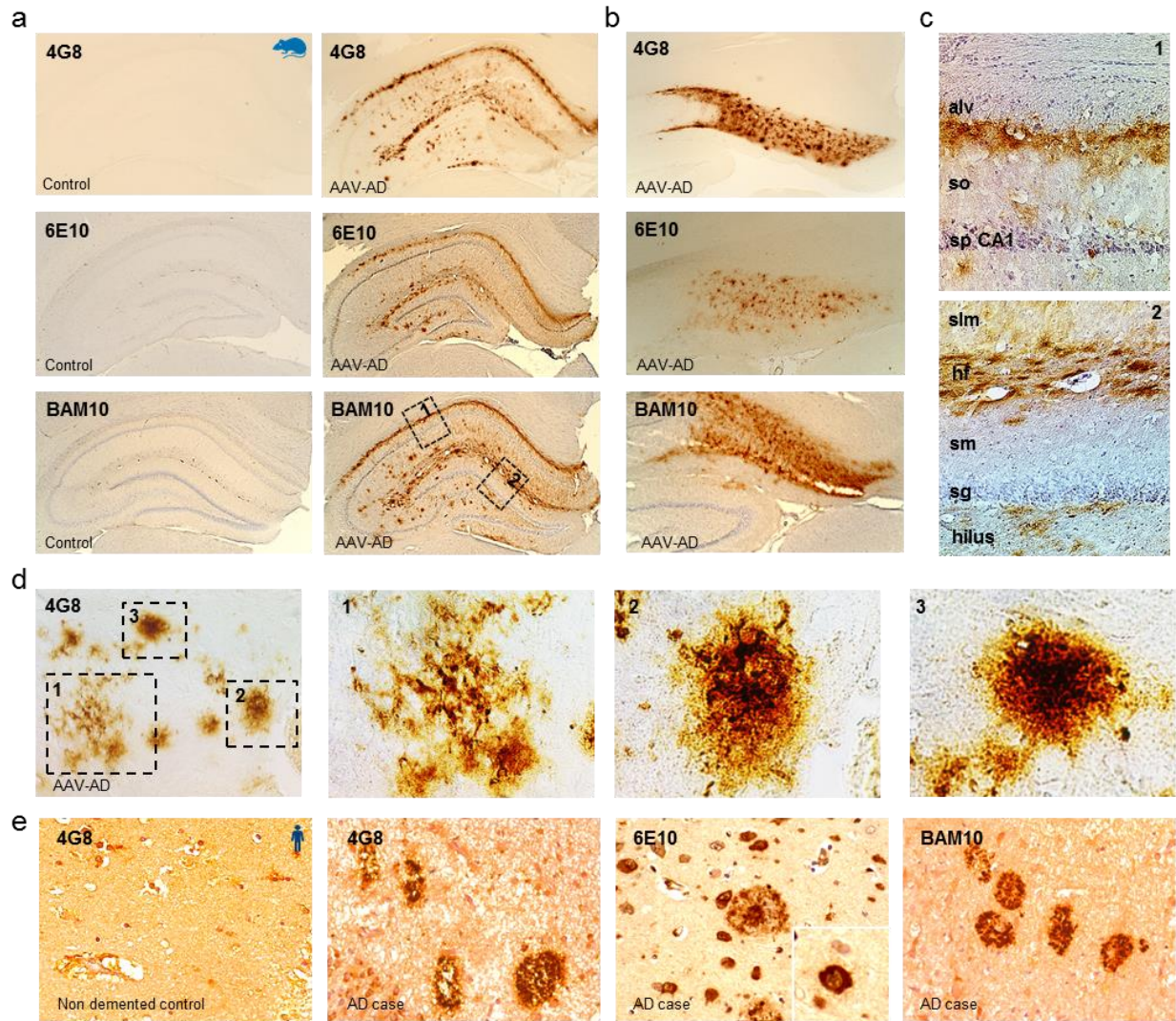
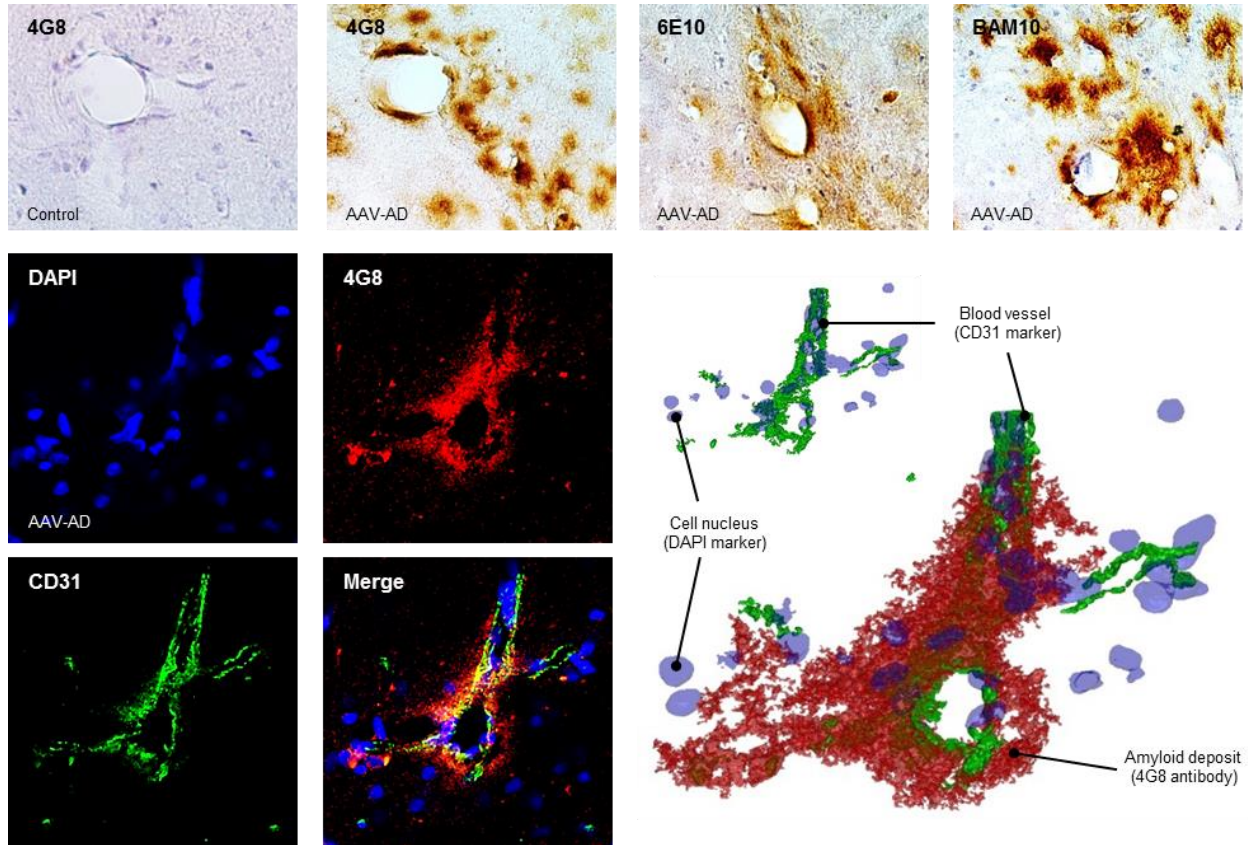


Figure 5. AD-like cerebral amyloid lesions in 30-month-old AAV-AD rats. (A) Immunohistochemistry with 4G8, 6E10, and BAM10 antibodies showing amyloid deposition in coronal sections of AAV-AD rat hippocampi. (B) Plaque pathology in the subiculum of AAV-AD rats using the antibodies described above. (C) Higher magnification of amyloid deposition at the junction of tissue layers. alv, alveus; so, stratum oriens; sp CA1, stratum pyramidale of the CA1 region; slm, stratum lacunosum moleculare; hf, hippocampal fissure; sm, stratum moleculare; sg, stratum granulosum. (D) Examples of amyloid plaques at different maturation stages from a diffuse state (box 1) to a dense morphology (box 3). (E) 3D reconstruction illustrating the typical form of a 4G8 positive senile plaque in hippocampus of AAV-AD rat. (F) Immunohistochemistry with the antibodies described above revealing amyloid plaque lesions in AD patients vs non demented controls.

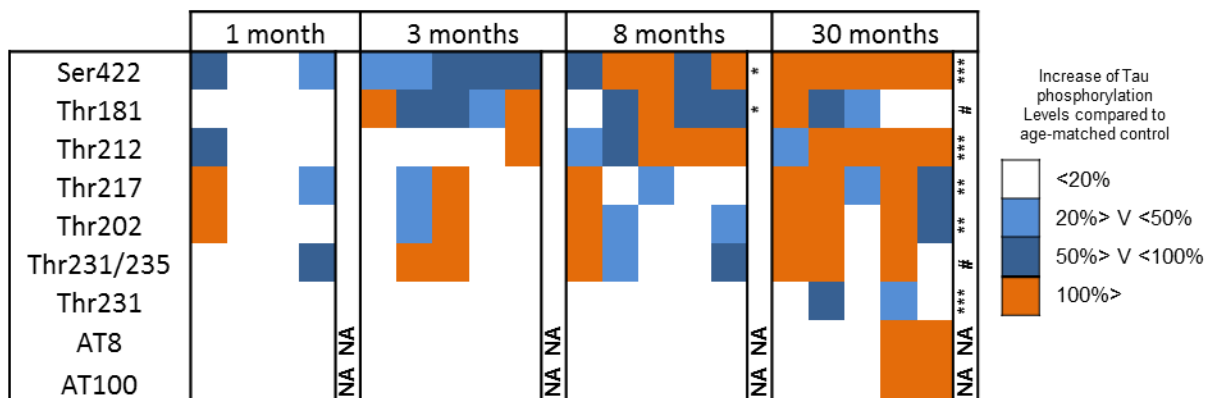
Figure 6. APP processing triggers CAA in 30-month-old AAV-AD rats. (A) Immunohistochemistry with 4G8, 6E10, and BAM10 antibodies showing respectively endogenous and exogenous CAA in coronal sections of AAV-AD rat hippocampi. (B) Laser confocal microscopy showing aggregation of endogenous amyloid (4G8) surrounding cerebral vessel identified with endothelial cells marker (CD31) in coronal sections of AAV-AD rat. (C) 3D reconstruction illustrating the CAA in sections of AAV-AD rat.



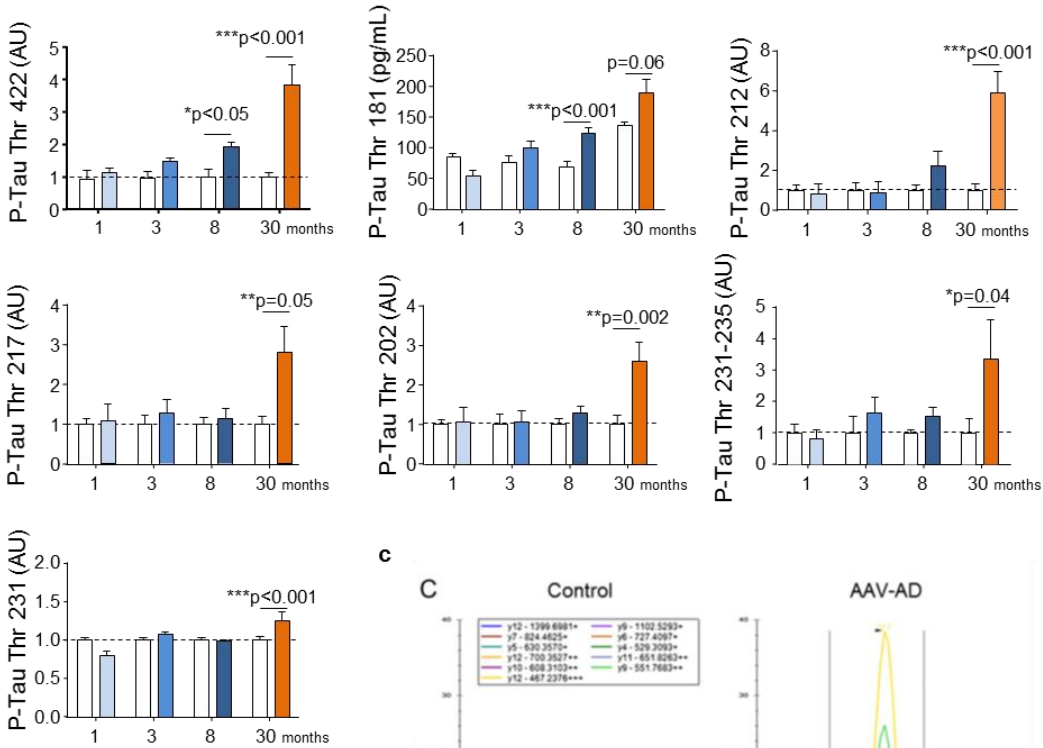
Progressive Hyper- and Abnormal Phosphorylations of the Endogenous Tau Protein

We analysed the consequences of the amyloidogenic pathway on the phosphorylation of Tau. We used 4 different approaches (ELISA, western blot, HPLC and MSD multiplex immunoassay) to evaluate the phosphorylation of the endogenous Tau protein (P-Tau) on both hyperphosphorylated (thr181, thr212, thr217, thr202, thr231/235, and thr231) or abnormally phosphorylated sites (ser 422) ([Augustinack, Schneider et al. 2002](#)) at 1 (n = 5), 3 (n = 5), 8 (n = 5), and 30 months (n = 5) post-induction. The global trend of Tau phosphorylation was equivalent for each studied phosphorylated site, and gradually increased over time relative to age-matched controls (Fig. 7A) (Time effect: thr181: $P < 0.001$, thr212: $P < 0.002$, thr217: $P = 0.07$, thr202: $P < 0.04$, thr231/235: $P = 0.21$, ser 422: $P < 0.0001$ and thr231: $P < 0.001$; Group effect: thr181: $P < 0.05$, thr212: $P < 0.001$, thr217: $P = 0.04$, thr202: $P < 0.03$, thr231/235: $P = 0.08$, ser 422: $P < 0.0001$ and thr231: ns; Interaction effect: thr181: $P = 0.05$, thr212: $P < 0.001$, thr217: $P = 0.05$, thr202: $P < 0.04$, thr231/235: $P = 0.08$, ser 422: $P < 0.0001$, and thr231: $P < 0.001$). The thr181 and ser422 epitopes early appeared to be phosphorylated by 8 months (thr181: Control: 69.8 ± 7.48 pg/mL; AAV-AD: 124.30 ± 12.01 pg/mL; 2-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test $P < 0.001$; ser422: Control: 1.00 ± 0.28 ; AAV-AD: 1.96 ± 0.14 ; 2-way ANOVA followed by Sidak's

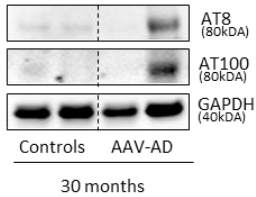
post hoc test $P = 0.017$). Moreover, the phosphorylation of all studied epitopes was higher than in age-matched controls by 30 months after AAV-AD induction (2-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test: thr181: $P = 0.06$, thr217: $P = 0.005$, thr202: $P = 0.002$, thr231/235: $P = 0.04$, ser422: $P < 0.0001$, thr212: $P < 0.001$, and thr231: $P < 0.001$) (**Fig. 7B,C**). Biochemical assessment of hippocampus samples using AT8 and AT100 antibodies confirmed the hyper- and abnormal phosphorylation of the endogenous Tau protein but only in half of 30-month-old AAV-AD rats (**Fig. 7D**). Thus, western blotting revealed characteristic bands close to 80 kDa using both antibodies in these animals. Interestingly these antibodies are currently used in clinics to deliver a definitive diagnosis in postmortem brain samples because of their capacity to mark tangles structures. Finally, we evaluated 3 kinases involved in the AD phosphorylation of Tau by western blotting: cyclin-dependent kinase 5 (CDK5), glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), and Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A). We observed a continuous increase of GSK3 β and DYRK1A levels from 1 to 30 months postinduction (2-way ANOVA: Time effect: GSK3 β : $P < 0.0036$ and DYRK1A: $P < 0.001$), whereas CDK5 levels remained stable (2-way ANOVA: Time effect: $P = 0.14$) (Fig. 7E,F; Supplementary Fig. 4).



b



d



c

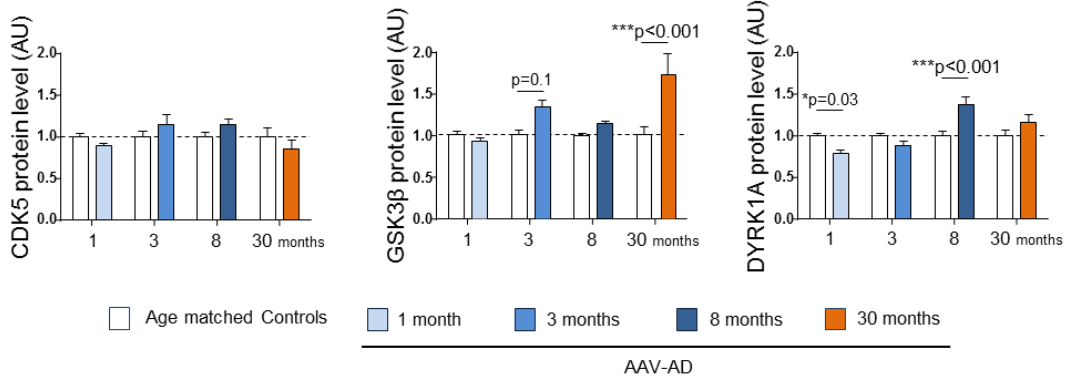
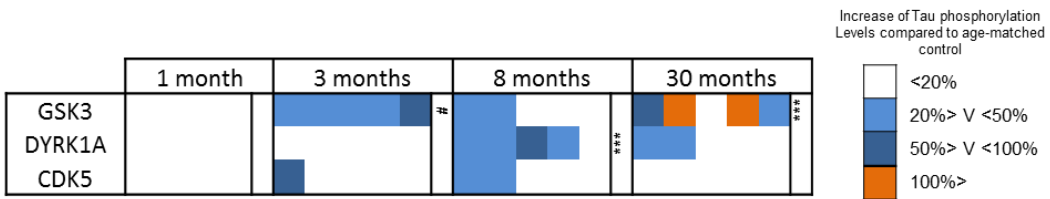
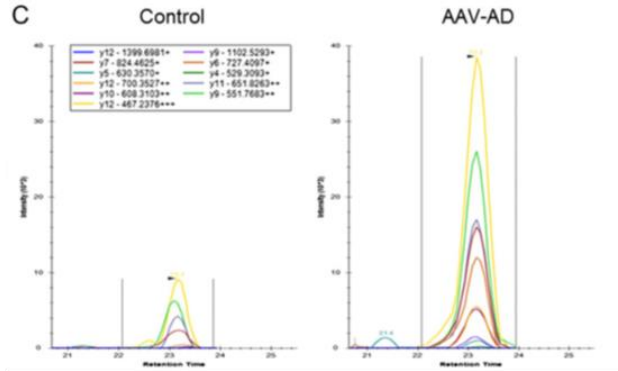
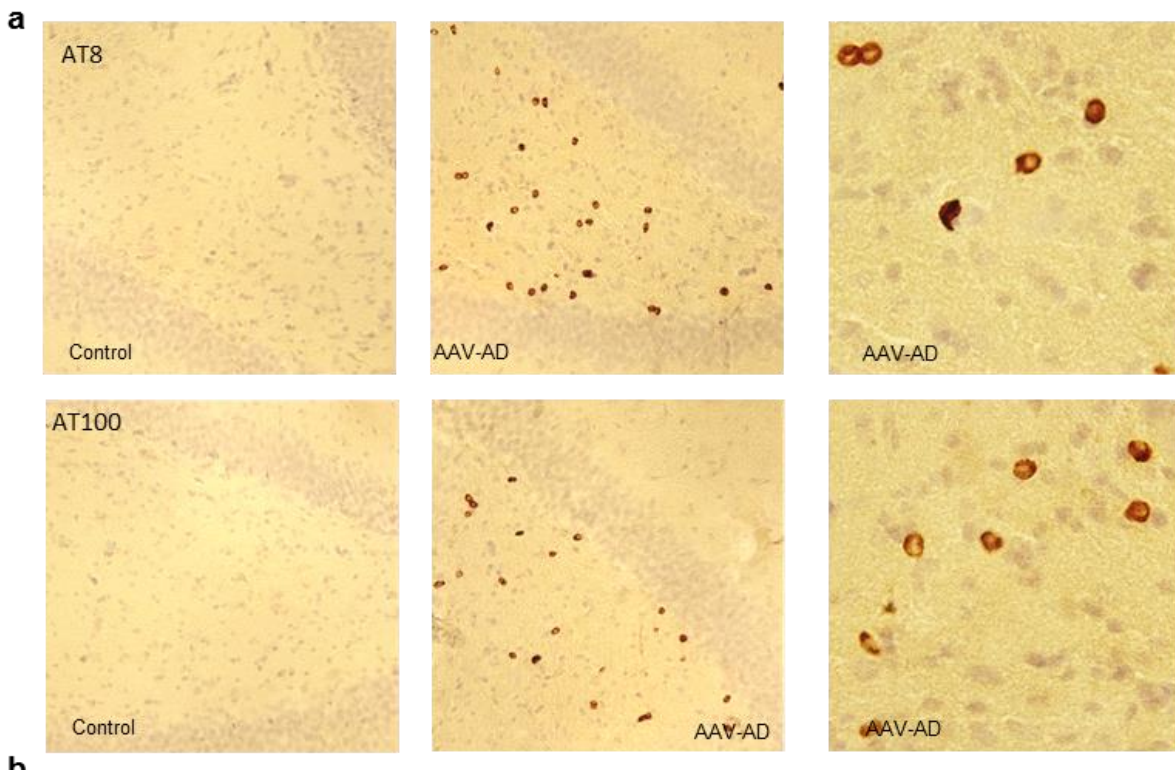


Figure 7. APP processing triggers sequential endogenous hyper- and abnormal Tau phosphorylation from 8 months postinjection. (A and B) Comparative analysis of TBS-Tx soluble rat phosphorylated Tau protein at residue Ser422, Thr212 (by western blot), Thr181 (by ELISA), Thr217, Thr, 202, 231-235 (by HPLC), and Thr231 (by MSD immunoassay). (C) LC-MS/MS signal of phosphorylated Thr 217 peptide ion fragments used for quantification in hippocampal samples from 30-month-old AAV-AD rat and age-matched control. (D) Representative western blot showing both AT8 and AT100 bands in AAV-AD rats hippocampi. (E, F) Densitometric analyses of western blots showing the expression of CDK5, GSK3 β , and DYRK1A in each group and at different time points (n = 5 rats per group). Bars represent the means \pm SEM. Statistical analyses were performed using 2-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test.

Hippocampal Tangle-Like Aggregates Appeared at Late Stages in the AAV-AD Rat Model

We performed immunohistochemistry with the AT8 (hyperphosphorylated epitopes: ser202/thr205) and AT100 (abnormal epitopes: thr212/ser214) antibodies to assess the potential aggregation of phosphorylated Tau measured in 30 months AAVAD rats. We observed AT8 and AT100 positive cells in the hilus and subiculum (**Fig. 8A**). Strikingly, we observed a very similar pattern in hippocampal slices of AD patients, displaying AT8 and AT100 positive core dense cells (**Fig. 8B**). Confocal imaging and 3D reconstruction of AT8 immunostaining confirmed the presence of hyperphosphorylated endogenous Tau surrounding nucleus in the characteristic form of misfolded protein aggregates (**Fig. 8C,D**). All these compelling data demonstrate that continuous humanlike β APP processing during years induces accretion of phosphorylated Tau protein into tangle-like aggregates.



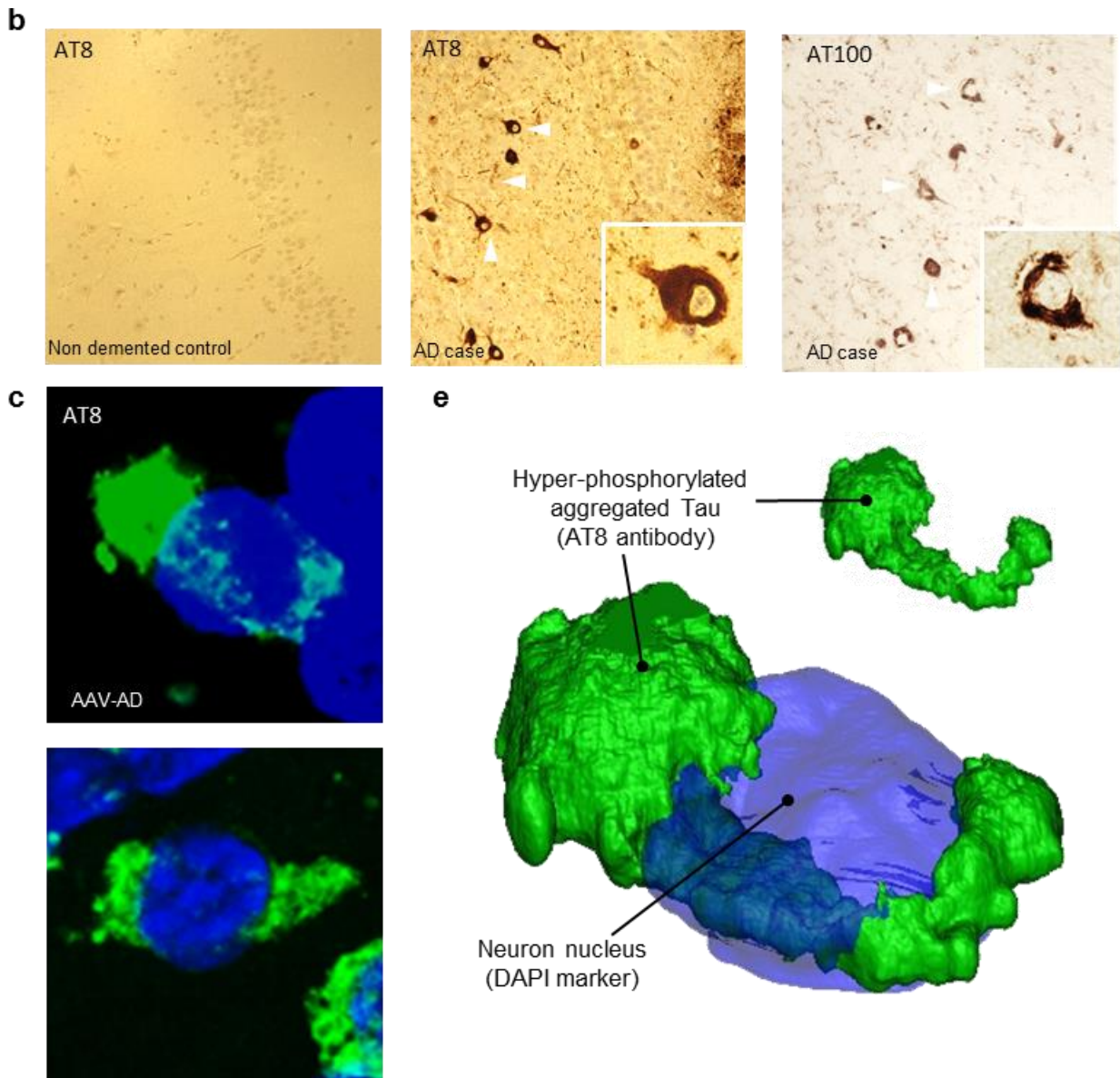


Figure 8. APP processing triggers terminal endogenous phosphorylated Tau aggregation in 30-month-old AAV-AD rats. (A) Immunohistochemistry with AT8 and AT100 antibodies showing respectively pretangle and tangle neurons located in the hilus of the DG in AAV-AD rat coronal sections. (B) Immunohistochemistry with AT8 and AT100 antibodies showing respectively pretangle and tangle lesions in AD patients. (C) Laser confocal microscopy showing AT8 positive cells in coronal sections of AAV-AD rat. (D) 3D reconstruction illustrating the typical helicoidal form of an AT8 positive pretangle neuron in hippocampus of AAV-AD rat.

Discussion

Understanding the infra-clinical phases and finding new early biomarkers will be decisive in the development of effective preventive or therapeutic molecules to counteract AD ([Langbaum, Fleisher et al. 2013](#)). It is thus essential to dispose models that closely mimic human AD whether on the evolution over time or on the amyloid peptides levels produced ([Sala Frigerio and De Strooper 2016](#)). To address this challenge, we developed an original AD rat model by co-transfer of the APPSL and PS1M146L genes using hippocampal AAV vector delivery. This model shows a specific agedependent progression pattern. Longitudinal analysis of this model has allowed us to experimentally confirm the causal relationship between human-like β APP processing and Tau pathology including Tau tangle-like aggregation in order to propose a 4-step hypothesis of prodromal AD progression (**Fig. 9**).

We generated AAV vectors encoding mutated human PS1M146L or APPSL, which were bilaterally injected into young adult rat hippocampus to generate the AAV-AD rat model. AAV-PS1M146L injected rats were used as controls. AAV-AD rats produced APP from 1-month after vector injection. Human APP immunoreactivity was found in sparse neurons of the CA2/CA3 layers, subiculum, and dentate gyrus. This pattern of expression may mimic the genomic mosaicism recently described in sporadic forms of human AD, in which an increase in copy number was observed for the APP gene in a limited subset of neurons ([Bushman, Kaeser et al. 2015](#)). The absence of APP accumulation in the hippocampus of AAV-AD rats, which was at levels similar to those in both control rats and AD patients, suggests that human APP was quickly catabolized by the β -secretase complex. This was corroborated by the rapid effect of the BACE inhibitor observed in less than 4 h. Moreover, β CTF, A β 40, and A β 42 peptides were produced in the hippocampus from 1-month after AAV-AD induction, whereas the levels of APP remained unchanged (**Fig. 9, Step 1**). Reducing A β 42 peptides levels or normalizing the A β 42/40 ratio by inhibiting amyloid APP processing appears to be the best therapeutic strategy at this first step of disease progression.

The concentration of soluble A β 42 and the A β 42/40 ratio gradually increased over time, whereas β CTF and A β 40 levels remained stable. By 30 months after induction, the relative amount of A β in the brains of the rats was similar to that found in AD patients. Analysis of the CSF revealed A β diffusion from the hippocampus to the CSF. In contrast to the increased hippocampal A β 42/40 ratio, the CSF A β 42/40 ratio progressively decreased over time (**Fig. 9, Step 1**). These data suggest that the ability of soluble A β 42 to spread from the hippocampus to the CSF decreased over time, leading to an increase in A β 42 levels in the hippocampus and a reduction in the CSF.

This may be due to progressive CAA leading to endothelial membrane modifications as we observed in 30-month AAV-AD rats: as the level of vascular angiopathy increases, so does the level of A β 42 in the hippocampus, whereas it decreases in the CSF ([Ikeda, Hirayanagi et al. 2012](#)). However, some therapeutic strategies (i.e., A β immunotherapy) developed to remove cerebral A β 42 aggregates also increase the severity of CAA ([Patton, Kalback et al. 2006](#), [Weller, Boche et al. 2009](#)). Strategies that prevent vascular amyloidosis and rebalance hippocampal and CSF A β ratios may be beneficial ([Agyare, Jaruszewski et al. 2014](#))

Emotional behaviour was altered without memory defects within 3 months after induction (**Fig. 9, step 2**). This observation suggests that there may be specific emotional neuropsychological disturbances that could be used as a potential readout in clinic practice as a very early cognitive symptom in AD patients ([McCade, Savage et al. 2011](#)).

The amplitude of the tonic current was greater in AAV-AD rats 3 months after induction as a direct consequence of AAV-AD induction. Progression of the disease resulted in secondary normalization of extrasynaptic NMDA receptor (eNMDAR) activation. Accordingly, transient extrasynaptic alterations appeared shortly after the A β 42-induced neuronal stress. Such observations have already been described after the application of A β 42 to mixed neuronal/glial rat cerebrocortical cultures ([Talanta, Sanz-Blasco et al. 2013](#)). Several events, such as a decrease of scaffolding proteins, a reduction of the glutamate transporter GLT-1, or an increase in glutamate liberation by astrocytes can lead to increased stimulation of the eNMDARs ([Masliah 1995](#), [Li, Jin et al. 2011](#)). Extrasynaptic NMDA receptor activation is implicated in the pathogenesis of several CNS disorders and A β disturbs the balance between synaptic and eNMDAR activation ([Wang, Zhao et al. 2013](#)). We show here, for the first time in vivo in our knowledge, that these transient events appear at the earliest stages of the disease course, before the onset of classical hallmarks such as amyloid plaques, neurofibrillary tangles or memory and LTP impairment (**Fig. 9, step 2**).

The third step of AD progression may be related to the first memory problems in patients before clinical diagnosis ([Rajan, Wilson et al. 2015](#)). We evaluated the LTP of glutamate synaptic transmission in AAV-AD rats at 3 and 8 months postinduction. We observed no defects in LTP in 3-month AAV-AD rats. In contrast, a large decrease in LTP may be attributable to AD progression in 8-month AAV-AD rats (**Fig. 9, step 3**). Long-term memory was intact 3 months after induction, as opposed to after 8 months, in which the AAV-AD rats displayed memory impairment (**Fig. 9, step 3**). Indeed, we observed long-term memory impairment in association with LTP defects from 8 months postinduction and later, suggesting progressive memory disturbances.

We then investigated the potential impact of the amyloidogenic pathway on endogenous Tau phosphorylation. ELISA analysis demonstrated higher levels of Tau protein phosphorylation on residues thr181 and ser422 in the AAV-AD rat hippocampus than in control rats, from 8 months postinduction. These results confirm that the continuous increase of A β levels, resulting from APP processing, was sufficient to trigger Tau pathway engagement as observed in AD patients (**Fig. 9, step 3**) ([Selkoe and Hardy 2016](#)). In addition, this engagement of the Tau pathway was associated with an increased level of specific kinases, such as GSK3 β and DYRK1A. Strikingly, almost all amyloid transgenic mice do not develop progressive Tau pathology in the brain ([Kitazawa, Medeiros et al. 2012](#)). Based on these experimental results, rejection of the amyloid cascade hypothesis was suggested arguing that pathological APP processing is not sufficient to drive Tau pathology in rodent brain. However, our results clearly link APP and Tau pathologies and strengthens the amyloidogenic cascade hypothesis.

The next phase of AD disease progression consists of the appearance of AD-related cerebral lesions. Senile plaques and tangle-like aggregates appeared in AAV-AD hippocampus at least 30 months after AAV-AD induction (**Fig. 9, step 4**). These findings confirm the role of gradually increasing levels of the soluble forms of A β , and potentially the A β 42/40 ratio, starting from adulthood in both senile plaque and tangle formation, several years after induction. This may explain, in part, why subtle cognition/biological defects are present at least 18 years before clinical diagnosis (Rajan, Wilson et al. 2015). Our results are once again in agreement with the evolution of the disease in humans. Thus, in experimental models with APP pathology close to AD patient, senile plaque were associated with Tau aggregation process as observed in AD brains. Unfortunately, it was not possible to observe the following steps of AD progression using AAV-AD rats because of their limited lifespan. It is possible that step 4 correspond to the time of AD diagnosis in patients.

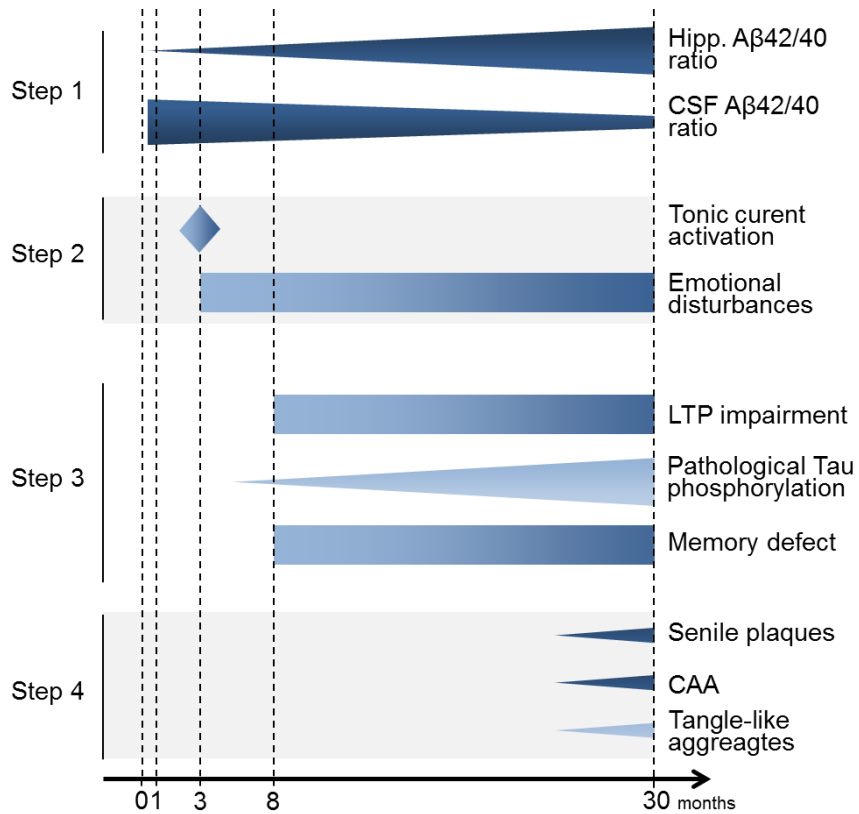


Figure 9. Age-dependent progression of pre-clinical AD stages: the 4-steps hypothesis.

How to explain that AAV-AD rats develop both APP and Tau pathologies while usual amyloid models failed? This main difference compared to classic AD models could be explained by the technology used. Because induction is realized on adult animals, AAV-AD rats do not suffer from developmental compensation that could result in neuroprotection mechanisms breaking down Tau pathology. Another argument could be that induced APP pathology appear similar to human in terms of amyloid peptides amounts and Aβ42/40 ratio resulting in pathophysiology mechanisms including Tau pathology. The last difference lies in slow progression in setting the APP pathology, allowing time for Tau pathology development without early inflammation and plaque formation interfering.

In summary, this study reports the first experimental demonstration of amyloid cascade in rodents thanks to an inducible progressive AD rat model named AAV-AD rat. We propose a 4-step hypothesis for infra-clinical AD progression based on the study of the AAV-AD model over time. Step 1 consists of the enhancement of APP processing resulting in a steady increase of Aβ42 levels and the Aβ42/40 ratio in the hippocampus starting from adulthood. Step 2 is characterized by the transient activation of extrasynaptic glutamate receptors and the onset of

altered emotional behaviour. During Step 3, classical biological alterations gradually appear such as a defect in LTP, hyperphosphorylation of endogenous Tau, and long-term memory deficits. Finally, old AAV-AD rats develop specific histological lesions consisting of amyloid plaques and tangle-like aggregates (**Fig. 9, step 4**). This 4-step hypothesis highlights the need for pleiotropic therapies acting at least on both amyloid and Tau pathologies. Our AAV-AD rat model may be a flexible in vivo experimental setting to increase the understanding of AD onset, identify early AD biomarkers, while evaluating the efficacy of therapeutic strategies to counteract AD progression.

Authors' Contributions

M.A., B.S., and J.B. carried out the design of the study and wrote the manuscript. M.A., B.S., and J.B. performed the biochemical, behavioural, histological, and statistical analyses. R.F., S.A., N.S.O., S.T. participated in the biochemical analyses and helped to draft the manuscript. Y.A. helped for the Bace1 inhibitor experiment as well as the behavior. S.A. performed the immunostaining on human slices. P.D., B.P., J.-M.B. and A.H. performed the electro-physiological recordings and helped to design the study and draft the manuscript. A.V. and F.B. realized the HPLC experiments. T.D. performed the 3D reconstruction. A.-P.B. and C.J. helped with the viral production. N.C., P.H. and N.D. read the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

III. Article 3 : Inhibition de l'activité kinase de DYRK1A lors de la phase préclinique de la MA (Ebauche)

DYRK1A activity inhibition as an early disease-modifying therapy for Alzheimer's disease

In Preparation

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a major cause of dementia and current view conceptualised the disease as a continuum where cumulative pathological changes in the brain of individuals free of cognitive and behavioural symptoms occur decades before clinical outcomes. A large body of evidence supports a pivotal role of soluble A β forms in AD pathogenesis. We recently showed that soluble A β forms, in concentration close to those observed in AD patients, is sufficient to trigger gradual Tauopathy and memory decline before A β and Tau aggregations in a preclinical AD-like animal (AAV-AD rats). The dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase-1A (DYRK1A) is a protein kinase that phosphorylates the amyloid precursor protein (APP) and tau and thus represents therapeutic approach to prevent AD progression from preclinical stage. Here, we sought to determine the effects of DYRK1A activity inhibition on preclinical AD-like pathology developed by AAV-AD rats. We found that 1 month peritoneal injection of Leucettine L41 in 10 months aged AAV-AD rats reduce DYRK1A activity in a paradigm where DYRK1A does not undergoes a proteolytic cleavage. DYRK1A inhibition does not act on the concentration of soluble A β forms but reduces hyperphosphorylation of soluble tau. Functionally, we found that tau pathogenesis prevention is sufficient to prevent apparition of long term memory impairments in AAV-AD rats. These results suggest that targeting DYRK1A might represent a valid therapeutic approach to counteract AD since preclinical stage.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a major cause of dementia and a brain disorder whose classical hallmarks are amyloid plaques and neurofibrillary tangles (NFTs). Extracellular amyloid plaques are mainly formed by the aggregation of amyloid peptides ($A\beta_{40}$ and $A\beta_{42}$) whose production and accumulation are key elements in AD development ([Hardy and Selkoe 2002](#)). Intracellular NFTs are composed of aggregated hyper- and abnormal phosphorylated Tau proteins. In the past decade, substantial progress has been achieved in the field of AD and current view conceptualised the disease as a continuum in which dementia is the clinically observable result of a preclinical phase defined as a long period of cumulative pathological changes in the brain of individuals free of cognitive and behavioural symptoms ([Jack, Knopman et al. 2010](#), [Dubois, Feldman et al. 2014](#), [Dubois, Epelbaum et al. 2018](#)). To date, AD affects 40 million people worldwide and the treatment of the dementia remains symptomatic. No drug or treatment strategy have been approved and several reasons have been put forward including a drug exposure administrated too late in the disease progression. The current consensus is that therapies for AD should ideally be started before the onset of symptoms ([McDade and Bateman 2017](#)). Consequently, we need in urgent to develop innovative therapies focus on the preclinical phase of AD.

Evidence suggests that soluble $A\beta$ peptides play a pivotal role during this preclinical phase ([Ferreira, Lourenco et al. 2015](#)) and that its toxicity affects synaptic plasticity before amyloid plaque deposition ([Selkoe and Hardy 2016](#)). In this way, we recently developed a rat model in order to investigate the preclinical phase ([Audrain, Souchet et al. 2017](#)). This rat model is generated by AAV gene transfer (the AAV-AD rat) and induce the production of amyloid derivatives with levels as close as those found in human AD hippocampi and without a significant transgene overexpression. Soluble $A\beta_{42}$ levels and the $A\beta_{42/40}$ ratio gradually increased in rat hippocampus and amyloid plaque deposition as well as cerebral amyloid angiopathy (CAA) occur in animals not before 30 months after injection. Endogenous Tau is progressively both hyper- and abnormally phosphorylated over time and leads in formation of phosphorylated Tau aggregate (AT8 and AT100 positive cells) in old rats. Finally, alterations of spatial long term memory are observed in

10 months aged AAV-AD rats simultaneously to the first evidence of Tau pathway engagement. Accelerated long-term forgetting is an early presymptomatic feature of autosomal dominant Alzheimer's disease ([Weston, Nicholas et al. 2018](#)). We thus consider the AAV-AD rats as an appropriate animal model exhibiting a preclinical AD-like phenotype.

The dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) is a serine/threonine protein kinase known to phosphorylate numerous proteins and contribute to a variety of biological processes within the embryonic and adult central nervous system. DYRK1A interacts with the amyloid precursor protein (APP) and its processing by direct phosphorylation of its Thr-668 ([Ryoo, Cho et al. 2008](#)) and indirect phosphorylation of the presenilin 1 (PS1) at Thr-354 ([Ryu, Park et al. 2010](#)), promoting the pathological A β pathway and the production of A β . DYRK1A also phosphorylates tau at several sites, including Thr181, Thr212, and Thr231, which are all observed in NFTs of AD brains ([Woods, Cohen et al. 2001](#), [Liu, Liang et al. 2008](#), [Rudrabhatla, Jaffe et al. 2011](#)). Therefore, it is now widely accepted that DYRK1A contribute to AD progression and controlling its kinase activity could be a mean to counteract the onset or progression of AD.

In this study, we evaluate outcomes of Leucettine L41 (L41) described *in vitro* as an inhibitor of DYRK1A kinase activity on the preclinical AD-like phenotype exhibited by the AAV-AD rats.

Results

DYRK1A proteolysis is detected only from 30 months age in AAV-AD rat

Although alterations in calcium homeostasis are widely reported in AD, upregulation of calpain activity was found to occur earlier in the pathology ([Kurbatskaya, Phillips et al. 2016](#)). We previously reported that its over-activation is associated with a cleavage of DYRK1A in hippocampus of both AD patients and APP/PS1 mice with well-established pathology leading to decrease DYRK1A full-length forms (DYRK1A_{FL}) and increase DYRK1A truncated forms (DYRK1A_T) (*Souchet al., under review*). We thus evaluate Calpain activity and DYRK1A protein levels in the hippocampi of 5 (n=10), 10 (n=8) and 30 months (n=5) AAV-AD rats and 5 (n=6), 10 (n=5) and 30 months (n=6) age-matched controls. The global trend of Calpain activity increase over time in AAV-AD rats relative to age-matched controls (Age effect: $P < 0.0001$; Group effect: $P = 0.0633$ and Interaction effect: $P < 0.0001$). Particularly, we observe a significantly increase between AAV-AD and controls rats at 30 months (Control: 133.5 ± 12.18 ; AAV-AD: 223.2 ± 12.79 ; 2-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test $P < 0.001$) (**Fig.1A**). Western blotting using the N-terminal DYRK1A antibody (noted: α -DYRK1A-Nter) shows an increase of the ratio DYRK1A_T / DYRK1A_{FL} in AAV-AD compared to controls at 30 months. No difference is observed in 5 and 10 months aged rats suggesting that the DYRK1A cleavage mediated by the up-regulation Calpain is only found in 30 months age old AAV-AD rats (Age effect: $P < 0.0001$; Group effect: $P = 0.0072$ and Interaction effect: $P < 0.0001$) (Control: 4.206 ± 1.045 ; AAV-AD: 71.27 ± 15.82 ; 2-way ANOVA followed by Sidak's post hoc test $P < 0.0001$) (**Fig.1B**). Overall, these findings allow us to better understand the homeostasis of DYRK1A in this preclinical AD-like paradigm.

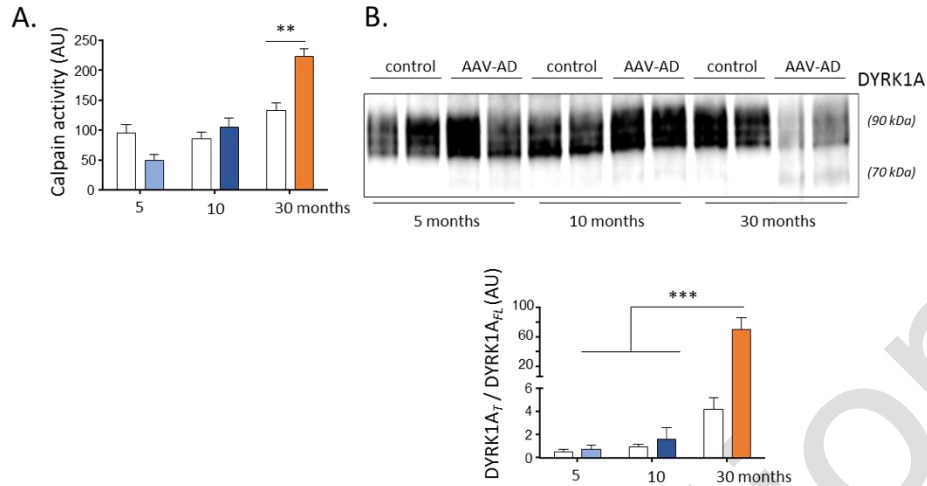


Figure 1: Proteolytic cleavage of DYRK1A appears in 30 months aged AAV-AD rats.
A. Calpain activity assessed by a fluorescent method show higher levels in hippocampus of 30 months aged AAV-AD rats compared to aged-match controls.
B. Western blot of hippocampal biopsies from AAV-AD rats showing lower levels of full-length DYRK1A forms (DYRK1AFL) (90 kDa) and higher levels of truncated DYRK1A forms (DYRK1AT) (70 kDa). DYRK1AT/ DYRK1AFL ratio is increased in 30 months aged AAV-AD rats compared to age match controls and other groups.

Leucettine L41 treatment had no effect on exogenous genes induction in AAV-AD rats.

The objective of this study was to assess whether DYRK1A may represent a suitable target for preclinical AD treatment by evaluating effects of Leucettine L41 administration. Consequently we use the AAV-AD rats mimicking a preclinical AD-like phenotype (10 months age AAV-AD rats). As previously described, AAV-AD rats are generated by co-injections of vectors encoding human mutant PS1_{M146L} and human mutant APP_{SL} (Swedish & London mutations) into the stratum lacunosum of the hippocampus of two-months-old male Wistar rats. Control rats are injected only with the PS1_{M146L} contained-vector. Vehicle-treated control rats (n=10), vehicle-treated AAV-AD rats (n=10) and L41-treated AAV-AD rats (n=10), have been daily injected using intraperitoneal procedure during 5 weeks and sacrificed at 9 months age (**Fig. 2A**). We first evaluate whether L41 could modified the AAV-AD induction (**Fig. 2B and C**). Western blot analysis of whole hippocampus extracts reveals comparable endogenous APP and PS1 full-length levels in non-injected, controls and AAV-AD rats. The human APP and the 30-kDa PS1 N-terminal fragment (PS1_T) are detectable respectively in only AAV-AD rats and in all injected rats. L41 treatment does not modify the levels of exogenous and endogenous APP as well as

PS1_{FL} and PS1_T (**Fig. 2B**). By immunohistochemistry, we confirm the presence of sparse neurons expressing exogenous human APP located in various hippocampus area in vehicle- and L41-treated AAV-AD rats (**Fig. 2C**). These findings suggest that L41 treatment does not affect the AAV-AD induction.

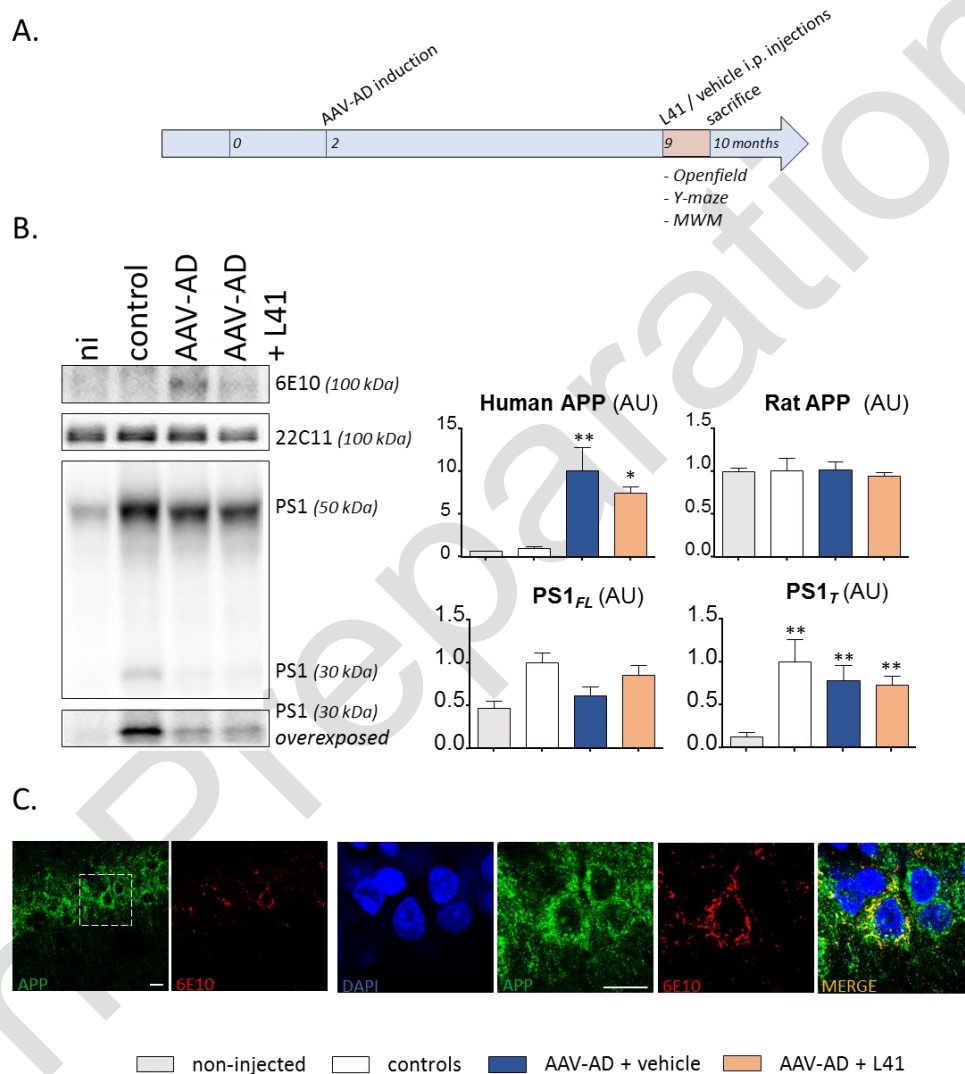


Figure 2: Chronic treatment with Leucettine L41 does not affect AAV-AD induction.
A. Schematic representation of the experimental time line. **B.** Western blot experiments showing the expression of human APP (6E10 antibody), total APP (rat + human forms; APP C-ter antibody), Total PS1 (full length) and Active PS1 (Truncated), confirming transgene expression one month after injection with or without Leucettine L41 treatment. Bars represent the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Significant differences between vehicle-treated control rats and vehicle or L41-treated AAV-AD rats are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. **C.** Confocal microscopy acquisition performed in

sections from AAV-AD hippocampus: human APP (red) was expressed in sparse neurons in CA2/CA3 layers (blue) harboring endogenous APP (green). Right panels described higher magnification than left panels.

Leucettine L41 treatment decrease DYRK1A activity in 10 months AAV-AD rat.

Several molecules known to reduce DYRK1A kinase activity have been developed ([Nguyen, Fruit et al. 2017](#)). We evaluate here whether Leucettine L41 may reduce its kinase activity *in vivo*. First, western blotting using the α -DYRK1A-Nter antibody reveals no difference in DYRK1A_{FL} protein levels between controls and vehicle treated-AAV-AD rats neither with L41 treated-AAV-AD rats. No DYRK1A_T is identified (**Fig. 3A**).

Moreover, no difference in calpain activity is observed among the three experimental groups (**Fig. 3B**) confirming that DYRK1A does not undergo a proteolytic processing in 10 months aged AAV-AD rats. Although global DYRK1A kinase activity have not yet assessed, we observe a decrease of APP phosphorylation at Thr 668 in L41-treated AAV-AD rats compared to vehicle-treated controls and AAV-AD rats (Vehicle treated controls : 1.00 ± 0.04 AU ; L41 treated AAV-AD: 0.96 ± 0.02 AU ; L41 treated AAV-AD: 0.74 ± 0.04 AU ; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p < 0.0005$ and $p < 0.005$ respectively) (**Fig. 2 D**). As DYRK1A is known to direct phosphorylate APP at this epitope ([Ryoo, Cho et al. 2008](#)), these findings suggest that Leucettine L41 is able to decrease the DYRK1A kinase activity in hippocampus of 10 months AAV-AD rats.

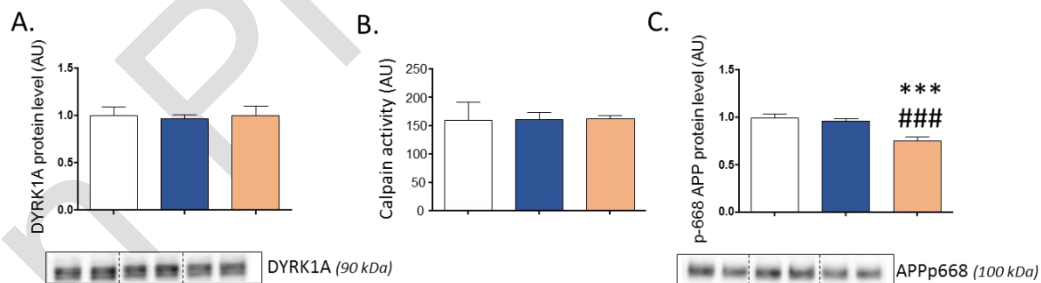


Figure 3: Chronic treatment with Leucettine L41 reduces the specific DYRK1A epitopes phosphorylation of APP at Thr 668.

A. DYRK1A proteins levels, **B.** Calpain activity and **C.** phospho-Thr 668 APP were assessed by western blotting or fluorescent method. No differences were observed regarding the DYRK1A protein levels and Calpain activity. L41-treated AAV-AD rats exhibit lower p668 APP compared to vehicle-treated control and AAV-AD rats. Bars represent the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Significant differences between vehicle-treated control rats and vehicle or L41-treated AAV-AD rats are

indicated by *** $p < 0.0005$. Significant differences between vehicle-treated AAV-AD rats and L41-treated AAV-AD rats are indicated by ### $p < 0.0005$

DYRK1A Inhibition does not affect soluble A β concentration.

Inconsistent results show that inhibitors of DYRK1A activity are able to reduce A β production in HEK293 cells overexpression APP ([Coutadeur, Benyamine et al. 2015](#)) or APP total levels in 3xTg-AD mice ([Branca, Shaw et al. 2017](#)). Because, no change in APP total levels have been observed in our study, we then assess A β concentrations. L41 does not modify the concentration of A β 40 (Vehicle treated AAV-AD: 9.35 ± 3.111 pg/mL; L41 treated AAV-AD: 6.24 ± 2.79 pg/mL; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p = 0.702$) neither than A β 42 forms (Vehicle treated AAV-AD: 3.74 ± 1.55 pg/mL; L41 treated AAV-AD: 2.03 ± 0.89 pg/mL; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p = 0.550$) in hippocampus of 10 months AAV-AD increase (**Fig. 4A**). A β levels in the cerebrospinal fluid (CSF) of AD patients have a diagnostic potential as a biomarker ([Dubois, Feldman et al. 2014](#)). Thus, we evaluate the effect of L41 treatment on the dispersion of both species from hippocampus to CSF. We show that Leucettine L41 treatment does not modify the concentration of A β 40 (Vehicle treated AAV-AD: 20.37 ± 7.65 pg/mL; L41 treated AAV-AD: 20.02 ± 7.18 pg/mL; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p = 0.999$) neither than A β 42 (Vehicle treated AAV-AD: 20.53 ± 6.60 pg/mL; L41 treated AAV-AD: 18.76 ± 4.68 pg/mL; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p = 0.963$) in CSF compared to age matched controls (**Fig. 4B**). Leucettine L41 treatment reveals no difference in the concentration of both A β species in hippocampus (Vehicle treated AAV-AD: 0.284 ± 0.091 pg/mL; L41 treated AAV-AD: 0.157 ± 0.072 pg/mL; t-test: $p = 0.299$) neither than in CSF (Vehicle treated AAV-AD: 1.167 ± 0.188 pg/mL; L41 treated AAV-AD: 0.994 ± 0.103 pg/mL; t-test: $p = 0.477$). Finally, A β 42/A β 40 ratio which is thought to more accurately reflect the changes in A β metabolism in AD than A β 42 alone ([Wiltfang, Esselmann et al. 2007](#)) is not affected by L41 treatment. Collectively, we show that L41 treatment does not affect the amyloid pathology in 10 months age AAV-AD rats.

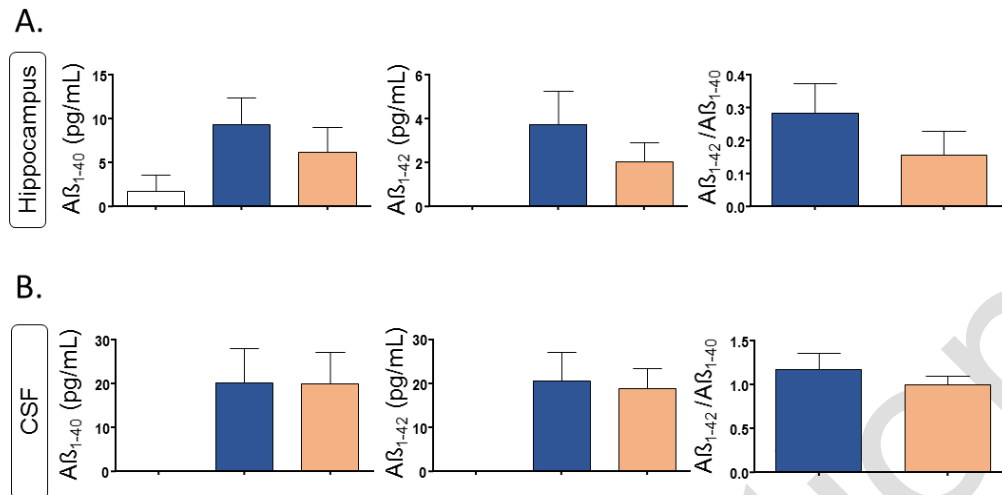


Figure 4: Chronic treatment with Leucettine L41 does not reduce the concentrations of soluble Aβ forms in both hippocampus and CSF of 10 months aged AAV-AD rats. **A.** Comparative analysis of Aβ₄₀, Aβ₄₂ and Aβ₄₂/Aβ₄₀ ratio in hippocampus. **B.** Comparative analysis of Aβ₄₀, Aβ₄₂ and Aβ₄₂/Aβ₄₀ ratio in CSF. No difference was observed. Bars represent the mean ± SEM. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test.

DYRK1A inhibition reduces hyperphosphorylation of Tau.

The existence of crosstalk between Aβ and tau is now well established and is showed in many neuronal compartments ([Polanco, Li et al. 2018](#)). As previously described, 10 months aged AAV-AD rats developed increase phosphorylation levels of several Tau epitopes including Thr 181 (Vehicle treated control: 49.60 ± 13.35 pg/mL; Vehicle treated AAV-AD: 120.1 ± 19.31 pg/mL; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: p = 0.0079) and Thr 212 (Vehicle treated control: 1.00 ± 0.25; Vehicle treated AAV-AD: 2.63 ± 0.31; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: p = 0.0027) (**Fig. 5A-C**). The phosphorylated level of Ser 422, an abnormal phosphorylation site, is also increase in vehicle-treated AAV-AD compared to controls (Vehicle treated control: 1.00 ± 0.13; Vehicle treated AAV-AD: 2.35 ± 0.32; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: p = 0.0012). Some DYRK1A inhibitors are known to reduce numerous phosphorylated epitopes of tau *in vitro* ([Coutadeur, Benyamine et al. 2015](#)) and in 3xTg-AD mice ([Branca, Shaw et al. 2017](#)). Here, we show that L41 treated AAV-AD rats slight decrease Thr 181 (L41 treated AAV-AD: 1.16 ± 0.16 pg/mL; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: p = 0.091), and significantly decrease Thr 212 (L41 treated AAV-AD: 1.33 ± 0.32;

one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p = 0.0128$) and Ser 422 (L41 treated AAV-AD: 1.16 ± 0.16 ; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p = 0.0028$) phosphorylated protein levels compared to vehicle-treated AAV-AD rats (**Fig. 5A-C**). Although, various kinases are involved in tau phosphorylation, we confirm that Leucettine L41 does not affect the CDK5, GSK3b or p25/p35 protein levels (**Supplementary data**). NFTs contain hyper- and abnormal phosphorylated Tau as paired helical filaments (PHFs). Because 30 months aged AAV-rats exhibited PHFs-like neurons in the hilus of dentate gyrus (DG) region, we focus immunohistochemistry investigations on this area of 10 months aged AAV-AD rats. We observe an increase of Thr 212 positive neurons in AAV-AD rats compared to controls at 10 months age (Vehicle treated control: 108.5 ± 5.91 ; Vehicle treated AAV-AD: 172.9 ± 14.92 ; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p = 0.019$). Leucettine L41 treatment tends to decrease the number of Thr 212 positive cells in AAV-AD rats (L41 treated AAV-AD: 127.7 ± 13.79 ; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p = 0.065$). In addition, few Ser 422 positive neurons are observed only in vehicle-treated AAV-AD rats (**Fig. D and E**). Altogether, these findings reveal that Leucettine L41 treatment prevents hyper- or abnormal phosphorylation of tau triggered by A β in 10 months aged AAV-AD rats.

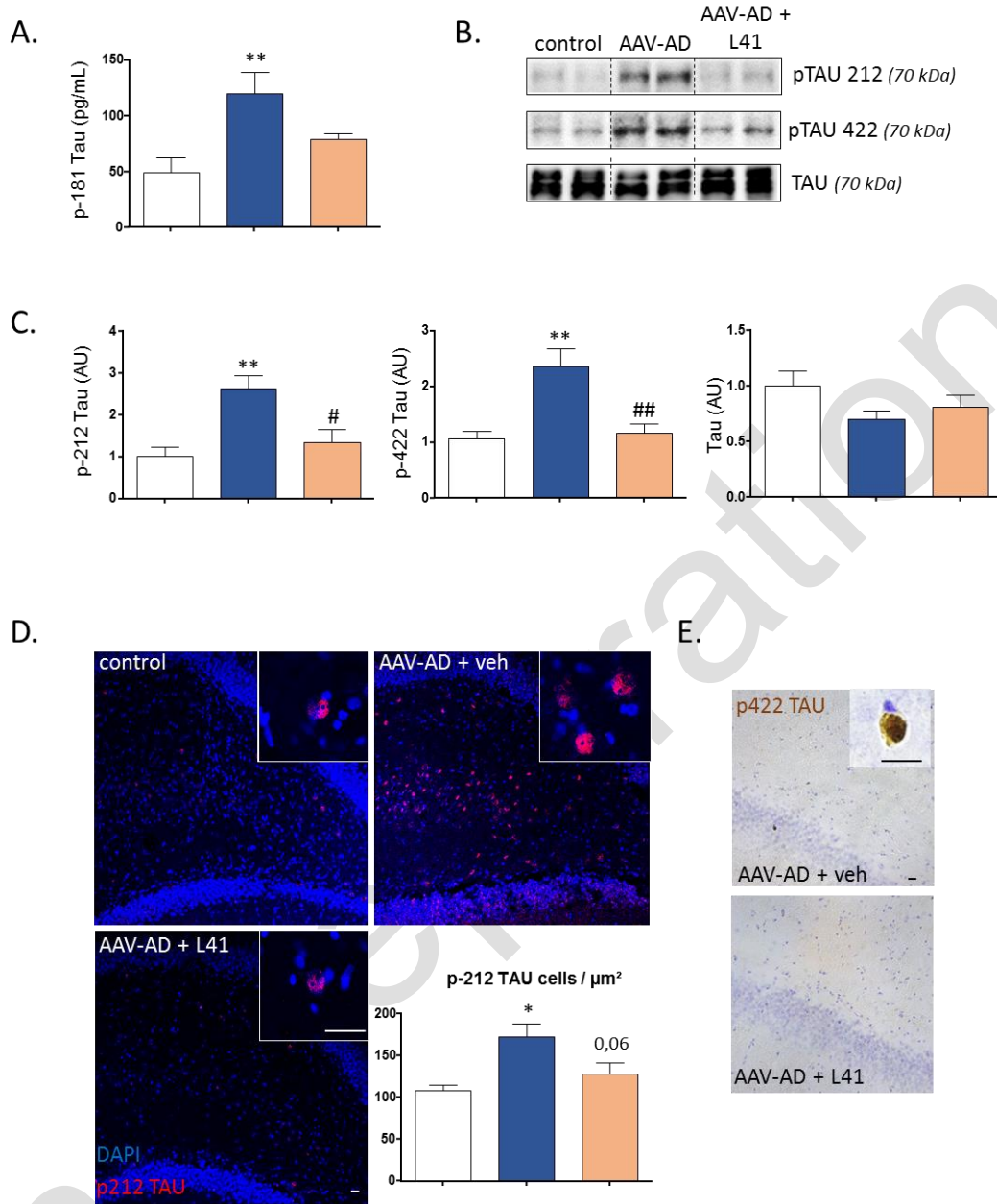


Figure 5: Chronic treatment with Leucettine L41 prevent hyperphosphorylation of tau at several epitopes in hippocampus of 10 months aged AAV-AD rats.

A. Quantitative analysis of phospho-Thr181 assessed by ELISA method. **B.** Western blot experiments showing the expression of phospho-Thr 212, phospho-Ser 422 and total tau protein. **C.** Quantitative analysis of phospho-Thr 212, phospho-Ser 422 and total tau protein assessed by western blot. **D.** Confocal microscopy acquisition performed in dentate gyrus of hippocampus showing cells nuclei DAPI (blue) and phospho-Thr 212 (red). Quantitative analysis of phospho-Thr 212 positive cells number. Bars represent the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Significant differences between vehicle-treated control rats and vehicle or L41-treated AAV-AD rats are indicated by ** $p < 0.005$. Significant differences between vehicle-treated AAV-AD rats and L41-treated AAV-AD rats are indicated by # $p < 0.05$, ## $p < 0.005$. **E.** Immunohistochemistry

performed in dentate gyrus of hippocampus showing cells nuclei (blue) and phospho-Ser 422 (brown).

DYRK1A inhibition does not modify anxiety-like emotional behavior but prevents memories impairments

The question of how appear the cognitive alterations observed in 10 months aged AAV-AD rats had not been yet answered. Here, we show that Leucettine L41 inhibit tau hyperphosphorylation but does not act on A β production. We thus evaluated whether this pharmacological strategy targeting one part of the preclinical-AD like pathology (daily injections from 9 to 10 months age) may rescue anxiety-like emotional behavior and long term memory impairment in 10 months aged AAV-AD rats.

We first analyze the anxiety-like emotional behavior using the open-field task. Vehicle treated controls and vehicle-treated AAV-AD rats travel similar total distances, showing the absence of motor abnormalities or hyperactivity and suggesting that the drug delivery was well tolerated (**Fig. 6A**). Vehicle-treated and L41 treated AAV-AD rats spend significantly less time in the centre of the open-field apparatus compared to vehicle treated controls (Vehicle treated control: 8.19 ± 2.15 s; vehicle treated AAV-AD: 2.62 ± 0.74 s; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p = 0.0137$) and (Vehicle treated control: 8.19 ± 2.15 s; L41 treated AAV-AD: 3.39 ± 0.85 s; one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p = 0.0137$) suggesting that Leucettine L41 does not rescue the disturbance in anxiety-like emotional behavior in AAV-AD rats (**Fig. 6B**).

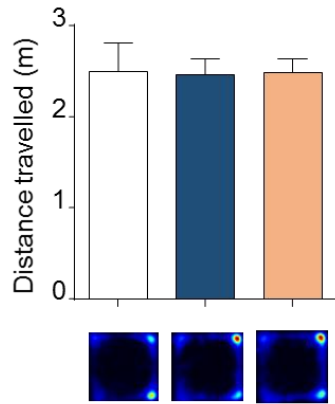
We next evaluate the short term memory and long term memory using respectively the Y-maze and Morris Water Maze task. First, vehicle treated AAV-AD rats spend less distance in the new arm compared to L41-treated AAV-AD rats (Vehicle treated control: 43.97 ± 4.69 %; vehicle treated AAV-AD: 30.51 ± 3.07 %; two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p = 0.0067$) and vehicle treated controls (L41 treated AAV-AD: 41.47 ± 3.38 %; vehicle treated AAV-AD: 30.51 ± 3.07 %; two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p = 0.0166$) suggesting that Leucettine L41 prevent short term memory impairments (**Fig. 6C**). Then, Morris Water Maze paradigm show no statistical differences during learning session as well as during 4 h probe test suggesting that all rats are able

to learn the task and to demonstrate it (**Fig. 6D and E**). However, vehicle treated AAV-AD rats spend less distance mean in the target quadrant compared to vehicle treated controls rats (Vehicle treated control: 6.92 ± 0.35 m; vehicle treated AAV-AD: 5.19 ± 0.37 m; two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p = 0.016$). Strikingly, Leucettine L41 treated AAV-AD rats show an increase of the distance mean spend in the target quadrant compared to vehicle treated AAV-AD rats (L41 treated AAV-AD: 6.53 ± 0.69 m; vehicle treated AAV-AD: 5.19 ± 0.37 m; two-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test: $p = 0.047$) suggesting that Leucettine L41 treatment prevents long term memory impairments (**Fig. 6F**). Collectively, Leucettine L41 treatment prevents the development of memories impairments in AAV-AD rats although it is not sufficient to rescue the anxiety-like emotional behavior.

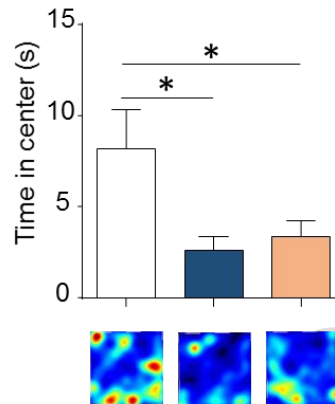
Figure 6: Chronic treatment with Leucettine L41 does not affect anxiety-like emotional behaviour but prevents memories deficits in 10 months aged AAV-AD rats.

A. Distance travelled during the open-field task. **B.** Time spent in the centre of the open-field area. **C.** Y-maze assay showing distance travelled in novel arm (NA) or familiar arm (FA). **D.** Learning curves representing the travelled distance during the 5 training days in the 4 quadrants (TQ = target quadrant that housed the platform during the training sessions, OQ = mean of other quadrants). **E.** Probe trial performance at 4 h after the last training session. **F.** Probe trial performance at 120 h after the last training session. For each figure, bottom group occupancy plots allow to visualize the areas in which the animals spent the most time during the test. Bars represent the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. Significant differences between vehicle-treated control rats and vehicle or L41-treated AAV-AD rats are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

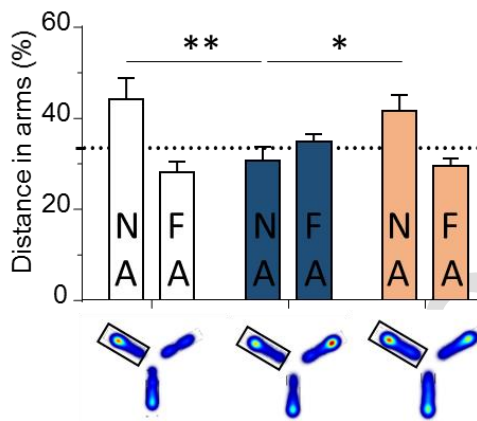
A. Locomotor Activity



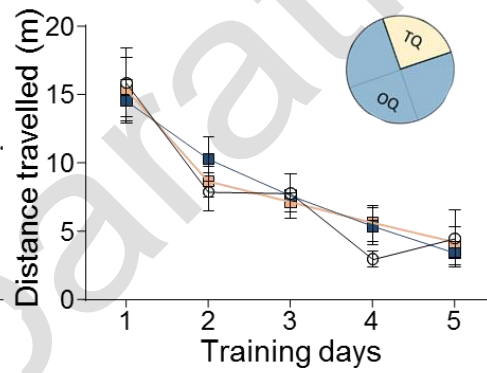
B. Emotional-related behavior



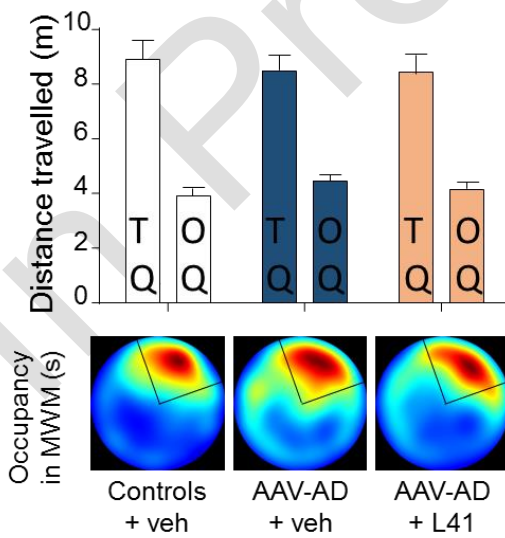
C. Short Term Memory



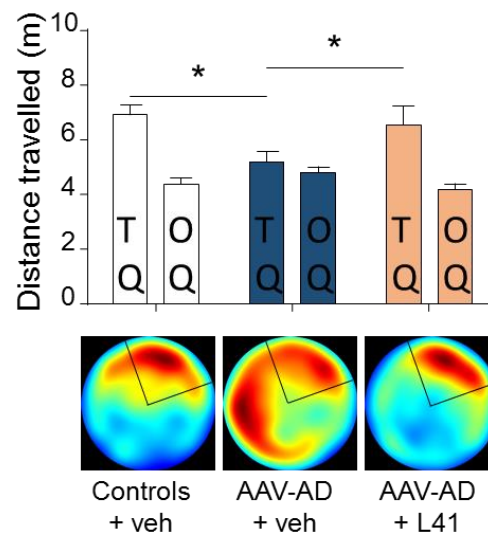
D. Spatial Learning



E. Learning probe



F. Long Term Memory probe



Discussion

Current view in the field of AD concedes that pathological events in the brain begin to develop decades before the earliest symptoms occur ([Jack, Thorneau et al. 2016](#), [Dubois, Epelbaum et al. 2018](#)). There are still no means to slow the progression of AD and several reasons may have formulated including at least, but not only, the suboptimal dosing or drug exposure (“too little or too late”), the lack of consistent of animal models with human pathology and an incomplete understanding of actors involved in the first biological events. In our study, we take advantages of AAV-AD rat initially designed to investigate early outcomes of A β production and a molecule synthesized as an inhibitor of DYRK1A, a serine threonine protein kinase, contributing to production of both A β and tau. Taken together, our results indicate that inhibition of DYRK1A activity represents a valid way in the future development of early disease-modifying therapy for AD.

While brain tissues from patient with preclinical AD are not yet available, therefore DYRK1A was only examined in autopsy brains from patients with clinically diagnosed AD but results are contradictory. DYRK1A mRNA level and DYRK1A immunoreactivity were found increased in the hippocampus ([Kimura, Kamino et al. 2007](#)) or in cytoplasm and nuclei of scattered neurons of the neocortex, entorhinal cortex and hippocampus ([Ferrer, Barrachina et al. 2005](#)) respectively. More recently, DYRK1A protein level was found cleaved leading to reduce protein levels of its full-length forms and to produce truncated DYRK1A forms in prefrontal cortex and hippocampus from AD ([Jin, Yin et al. 2015](#)) (*Souchet et al. under review*) respectively. Consequent, strategies aim to reduce DYRK1A activity alleviate severe AD-like phenotype in 3xTg-AD mice ([Branca, Shaw et al. 2017](#)) and APP/PS1mice (*Souchet et al., under review*) and provide converging line of evidence that DYRK1A could be of interest as a therapeutic strategy for AD. Here, we used the AAV-AD rats as a pertinent tool to investigate involvement of DYRK1A and the modulation of its activity in preclinical-AD like paradigm. We show that DYRK1A undergoes a calpain-mediated cleavage only when amyloid deposits occur. To evaluate the potential of DYRK1A activity inhibition to counteract preclinical AD phenotype, we used AAV-AD rats long term before the earliest histological lesions appear (10 months aged)([Audrain, Souchet et al. 2017](#)).

The DYRK1A gene is located on chromosome 21 (21q22.2), a region known as the Down-Syndrome Critical Region (DSCR) ([Delabar, Theophile et al. 1993](#)). People living with Down Syndrome (DS) have higher prevalence to develop AD pathology primarily due to overexpression of the APP gene on chromosome 21 ([Head, Lott et al. 2016](#)). To this end, several groups have suggested that DYRK1A may represent a functional link between DS and AD ([Kimura, Kamino et al. 2007](#), [Ryu, Park et al. 2010](#)). DYRK1A is involved in APP processing and A β production ([Wegiel, Kaczmarek et al. 2011](#)). Report indicated that DYRK1A directly phosphorylates APP at Thr 668 *in vitro* ([Ryoo, Cho et al. 2008](#)) leading to human *Dyrk1A* transgenic mice show high levels of phosphorylated APP and increased A β levels ([Ryoo, Cho et al. 2008](#)). In our study, reducing of Thr668 APP phosphorylation does not affect the production or the peripheral degradation of soluble A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ forms. These findings are consistent with previous study which despite reducing APP phosphorylation at Thr 668 and modifying APP turnover in 3x-Tg AD by DYRK1A inhibition, show no effect on soluble fraction of A β ([Branca, Shaw et al. 2017](#)). Together, these data suggest that inhibition of DYRK1A activity does not act on the A β level. In our AAV-AD rats, distinct A β species and assemblies may affect cellular functions and in particular trigger tau hyperphosphorylation.

DYRK1A is also involved in Tau pathogenesis by acting on its phosphorylation level. For example, DYRK1A phosphorylates tau at Thr212 *in vitro* ([Woods, Cohen et al. 2001](#)), a residue that is hyperphosphorylated in AD. We show in our study that DYRK1A inhibition reduce tau phosphorylation level at Thr212. This is remarkable, as phosphorylation at this epitope primes tau for phosphorylation by GSK3 β at other AD-related epitopes ([Woods, Cohen et al. 2001](#)). Here, we also show a reduced level of tau phosphorylation at Thr 181 and Ser 422 which are known as phosphorylated by GSK3 β . Therefore, our finding suggest that inhibition of DYRK1A activity primes the prevention of tau hyperphosphorylation in several epitopes. Tau species attack neuronal physiology at various levels ([Polanco, Li et al. 2018](#)). While abnormal deposits of tau can sequester other proteins and prevent them from executing their physiological function, it is now well established that hyperphosphorylated soluble tau are sufficient to impaired neuronal activity. In particular, axonal transport of various cargoes including mitochondria by trapping the kinesin motor adaptor protein Jun-amino-terminal kinase-interacting protein

1 (JIP1) in the cell body ([Ittner, Fath et al. 2008](#)). Also, hyperphosphorylated tau destabilizes microtubules and relocates the axon initial segment (AIS) distally, resulting in reduced excitability and decreased action potential firing ([Hatch, Wei et al. 2017](#)). We show in our study that DYRK1A inhibition reduce tau hyperphosphorylation and prevent apparition of working memory and long term spatial memory impairment. This is consistent with other preclinical studies targeting only the phospho-epitope Ser 422 tau with active vaccination and reporting improve performance in working memory in the Thy-tau22 transgenic model ([Troquier, Caillierez et al. 2012](#)) and reduce accumulation of tau pathology in 3x-Tg AD ([Collin, Bohrmann et al. 2014](#)).

It is believe that up to 15–20 years prior to clinical symptoms of AD, pathological events occur in brain of human with free functional outcomes. Toxic effects of distinct species of tau and A β are now known and will lead in next future in the development of early disease biomarkers for stratifying patients and validating new therapies. To this end, recent breakthrough in diagnosis field allows to detect AD several years before clinical diagnosis and open avenues for blood screening of early AD stages ([Nabers, Perna et al. 2018](#)). Next steps will need appropriate animal model that address preclinical AD-like phenotype and evaluates efficacy of therapeutics strategies targeting early events of both amyloid and tau pathogenesis.

In summary, we report that DYRK1A activity inhibition reduces first biological events of tau pathogenesis triggered by A β in a preclinical AD-like rat model and that despite no changes on A β concentration, it prevents first cognitive dysfunctions appearance. Therefore, we provide evidence that molecules able to inhibit DYRK1A activity should to be combined with A β -related therapeutic to successfully counteract preclinical AD progression.

DISCUSSION

I. Implications de la protéine DYRK1A et intérêts thérapeutiques dans la phase clinique de la MA

La grande majorité des cas de MA sont sporadiques. Néanmoins, des mutations causant une MA dite familiale ont été identifiées sur quelques gènes liés à la production des peptides A β . Ils incluent le gène *APP* lui-même et les gènes *PSEN1* et *PSEN2*. La combinaison de preuves génétiques et histologiques ont permis d'établir un rôle de l'A β dans la MA et ont conduit à développer des animaux transgéniques reproduisant d'important aspects de la pathologie humaine afin d'évaluer l'intérêt de stratégies thérapeutiques ([Gotz and Ittner 2008](#)). Les signes cliniques et histologiques ne différant pas entre la MA familiale et la MA sporadique lors des derniers stades de la maladie, il a longtemps été supposé que des stratégies validées sur les modèles transgéniques pouvaient être efficaces pour traiter les patients atteints de MA sporadique. Dans ce premier chapitre, je discuterai de la régulation et de l'implication de DYRK1A dans les derniers stades de la MA à savoir sa phase clinique, symptomatique et évaluerai l'intérêt de molécules modulant son activité chez un modèle de souris transgénique reproduisant en partie les lésions observées à ce stade de la MA.

1. Physiologie de DYRK1A lors de la phase symptomatique de la MA

D'abord, nous avons identifié une régulation originale de la protéine DYRK1A d'un point de vue biochimique et histologique dans un contexte de MA clinique. Chez l'Homme atteint de la MA (Braak V-VI, Thal IV-V), nous confirmons une étude récente soulignant que DYRK1A est sensible à un mécanisme de clivage protéolytique dépendant de la protéase Calpaïne. En plus, nous précisons que cette protéolyse apparaît préférentiellement dans les astrocytes de l'hippocampe. La perte de son domaine C-terminal n'affecte pas la capacité de phosphorylation puisque la forme tronquée de DYRK1A développe une activité kinase similaire aux formes entières. Par contre, il semble que cette réduction en taille affecte la spécificité de la kinase envers ses protéines cibles. Comme discuté dans l'introduction (*chapitre III. I. 3.*), une protéine kinase doit reconnaître entre un et plusieurs dizaines d'épitopes à phosphoryler parmi un panel d'environ 700 000 résidus potentiels. De nombreux mécanismes contribuant à ce niveau de spécificité sont évoqués dans une revue ([Ubersax and Ferrell 2007](#)). En particulier, il est décrit que les domaines non-catalytiques peuvent remplir cette fonction et notre étude illustre parfaitement leur importance. Dans un contexte pathologique, ici la MA, DYRK1A est capable d'interagir avec la protéine STAT3 α lorsque la kinase est « libérée » de sa partie C-terminale. Un gain de fonction,

conséquence d'une perte de spécificité est alors observé. Des études de biochimie structurale permettraient de mieux comprendre cette interaction. Mais à l'image de nombreuses autres protéines kinases, les banques de données *in silico* présentent uniquement la structure tridimensionnelle de la partie catalytique de DYRK1A. La taille importante de ces protéines explique en partie ce frein technologique. A cela s'ajoute une autre raison venant du fait que ces analyses cherchent d'abord à comprendre l'interaction entre la protéine kinase et la molécule synthétisée pour cibler le site catalytique (Wolber, Seidel et al. 2008). Actuellement, l'absence de structure tridimensionnelle entière de DYRK1A ne permet pas une étude structurale pertinente et de nombreuses hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le phénotype observé dans notre étude. L'une d'entre elles voudrait que la partie C-terminale de DYRK1A agisse comme une « ancre » où viendrait se fixer une protéine X bloquant l'accès du domaine catalytique de DYRK1A à STAT3 α . A titre d'exemple, il a été démontré que la protéine kinase RanBPM se fixe sur cette partie pour moduler DYRK1A (Zou, Lim et al. 2003). L'absence de la partie C-terminale, et par conséquence de la protéine X, faciliterait l'interaction entre DYRK1A et STAT3 α (Figure 54).

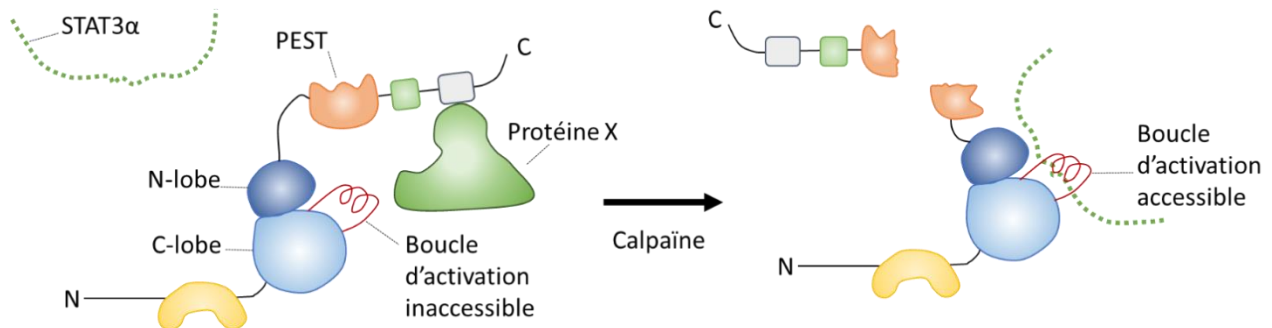


Figure 54 : Hypothèse formulée quant à la perte de spécificité de la kinase DYRK1A

La protéine DYRK1A peut être divisée en deux grandes parties : la partie N-terminale regroupant un domaine de localisation nucléaire (jaune) et un domaine catalytique (N-lobe et C-lobe représentés en bleu) et la partie C-terminale regroupant une séquence PEST (orange) et des séquences riches en histidine (vert) et en Serine/thréonine (gris).

En condition physiologique, la partie C-terminale agirait comme structure d'ancrage à une protéine X qui empêcherait l'interaction entre DYRK1A et STAT3 α par encombrement stérique.

En condition pathologique, le clivage de DYRK1A contribue à la libération de la partie C-terminale, favorisant alors l'interaction entre DYRK1A et STAT3 α .

Cette protéolyse a également été observée chez le modèle murin APP_{swe}/PS1_{ΔE9} (APP/PS1). Bien qu'elles ne représentent qu'une partie de la MA, en l'occurrence l'amyloïdose, ces souris sont très utilisées par la communauté scientifique. Elles présentent l'avantage de développer une pathologie amyloïde importante et rapide dont les conséquences sont en partie retrouvées lors des phases avancées de la MA. En particulier, une augmentation de l'activation de la Calpaïne, une protéase dépendante du calcium intracellulaire est observée chez ces souris. Ainsi, des formes de DYRK1A tronquées sont retrouvées dans les astrocytes d'hippocampe de souris APP/PS1 âgées de 14 mois. L'utilisation de ce modèle suggère donc que la pathologie amyloïde est suffisante pour induire le clivage pathologique de DYRK1A. Nous avons ensuite pu évaluer l'efficacité *in vivo* de composés pharmacologiques ciblant DYRK1A.

2. Inhibition de la protéolyse de DYRK1A comme stratégie thérapeutique pertinente dans la MA

De nombreuses preuves expérimentales, souvent basées sur des expériences surexprimant le gène *Dyrk1A*, suggèrent que cette kinase pourrait favoriser la production de peptides amyloïdes toxiques, la phosphorylation pathologique de Tau, l'épissage pathologique des formes Tau 3R, et activer des protéines impliquées dans la neuroinflammation. Pour contrecarrer la progression de la MA, il a donc été synthétisé chimiquement des composés pharmacologiques visant à inhiber l'activité kinase de DYRK1A, et ceci, alors même que le niveau de protéine et surtout son activité kinase n'est pas connu chez des patients atteints de MA. Malgré cela, il est à noter que l'inhibition de DYRK1A se révèle bénéfique chez la souris 3xTg AD ([Branca, Shaw et al. 2017](#)) (détails dans la partie Discussion III).

Compte tenu de nos observations chez l'Homme et chez la souris modèle de la MA, il apparaît que des composés pharmacologiques, ou toutes autres stratégies thérapeutiques visant à réduire le clivage de DYRK1A par la Calpaïne, semblent bien plus pertinente que les thérapies capables d'inhiber son activité kinase. Nous avons donc développé dans un second temps, un test *in vitro* reproduisant une protéolyse de DYRK1A, dépendante du Ca²⁺, à partir d'extrait d'hippocampes humains cognitivement sains ou de souris contrôles. Ainsi, nous avons été capables de raffiner, parmi un panel de composés ciblant DYRK1A, la molécule idéale à tester *in vivo*. La Leucettine L41 a ainsi été identifiée comme la molécule la plus prometteuse par le fait qu'elle empêche le clivage de DYRK1A.

Pour valider cette approche chez l'animal, nous avons injecté quotidiennement la Leucettine L41 durant 1 mois par l'intermédiaire d'injections intrapéritonéales à des souris

APP/PS1 âgées de 13 mois. Nous avons volontairement choisi ces souris à un âge avancé, où des perturbations typiques liées à l'amyloïdose sont d'ores et déjà présentes. A ce stade de la pathologie, il est communément admis que les lésions sont représentatives du degré d'altération des patients inclus dans les protocoles cliniques actuels ([Villemagne, Burnham et al. 2013](#)).

Chez ce modèle murin, la Leucettine L41 préserve un niveau de DYRK1A (forme entière) similaire à ce qui est mesuré chez la souris contrôle et prévient la présence de DYRK1A tronquées dans les astrocytes de l'hippocampe de ces animaux sans modifier le niveau d'activité kinase total de DYRK1A. L'inhibition de cette protéolyse ne peut être expliquée par un effet de la L41 sur la calpaïne. L'activité de cette dernière est en effet augmentée à la fois chez les souris APP/PS1 non traitées ou traitées à la L41 par rapport aux souris contrôles. Ceci est particulièrement intéressant par rapport aux molécules ciblant directement cette protéase ([Medeiros, Kitazawa et al. 2012](#)) puisqu'il est connu que la Calpaïne est nécessaire au fonctionnement physiologique du SNC et qu'elle est de plus décrite comme protectrice vis-à-vis de l'agrégation des protéines Tau ([Ferreira and Bigio 2011](#)). Les conséquences fonctionnelles de l'inhibition de la protéolyse de DYRK1A ont ensuite été évaluées. Le niveau de phosphorylation des protéines STAT3 α est rétabli à un niveau similaire aux conditions contrôles. Ceci semble n'avoir aucun effet sur la réactivité astrocytaire puisque les niveaux de GFAP ou de vimentine restent élevés et à un niveau équivalent à la condition pathologique non traitée. De même, la quantité d'astrocytes péri-plaques n'est pas modifiée. Néanmoins, STAT3 α est connue pour être un régulateur majeur de gènes pro-inflammatoires ([Heim 1999](#), [Chiba, Yamada et al. 2009](#)). En particulier, son activation par phosphorylation de son site Y705, favorise la transcription de gènes comme IL-1 β ou TNF α ([Chen, Liang et al. 2013](#)). Nos résultats sont en complet accord avec ces données puisque les concentrations en cytokines proinflammatoires : IL-1 β , TNF α et IL-12p70, sont rétablies à un niveau physiologique.

Comme discuté dans l'introduction (Chapitre I, IV, 6), l'inflammation prend une part de plus en plus importante dans le développement de la MA. Il est ainsi connu que les cytokines proinflammatoires sont capables de jouer un rôle délétère sur le neurone. En parallèle, elles peuvent également perturber l'activité microgliale à long terme ([Burda and Sofroniew 2014](#), [Sofroniew 2014](#)). Ces deux faits rejoignent nos observations. D'abord, la Leucettine L41 restaure partiellement le niveau de LTP mesuré par études électrophysiologiques. Cet effet bénéfique se confirme au niveau fonctionnel puisque les animaux traités à la L41 montrent un apprentissage spatial partiellement corrigé et surtout, une mémoire spatiale à long terme similaire à celle observée chez les animaux contrôles. Nous expliquons cet effet bénéfique directement par la

réduction de la concentration en cytokines pro-inflammatoires puisque le TNF α , par exemple, perturbe l'activité neuronale ([Di Filippo, Sarchielli et al. 2008](#), [Bardou, Brothers et al. 2013](#)).

Dans un second temps, la réduction du niveau de cytokines pro-inflammatoires semble jouer sur l'activité des cellules microgliales. L'activation de la microglie a longtemps été considérée comme délétère mais la stimulation de ces cellules apparait récemment comme une cible de choix pour le traitement de la MA ([McGeer and McGeer 2015](#)). De nombreuses études s'intéressant aux rôles de la microglie dans la MA, ont permis de mieux comprendre ces cellules. Une forme pathologique ou « dark microglia » représenterait un stade ultime de pathogénicité, notamment chez les souris APP/PS1 ([Bisht, Sharma et al. 2016](#)). Au contraire, une forme essentielle à la physiologie du cerveau est connue, où dans un contexte pathologique, elle va pouvoir s'orienter selon deux types d'activation ([Tremblay, Stevens et al. 2011](#), [McGeer and McGeer 2015](#)). Ainsi, le transfert d'un profil M1 (inflammatoire et neurotoxique) vers un phénotype d'activation M2, moins inflammatoire et présentant une capacité accrue à phagocyter l'A β , semble tout à fait intéressant d'un point de vue thérapeutique ([Tang and Le 2016](#)). Dans notre étude, le niveau de protéines, impliquées dans la dégradation d'A β comme TREM2 ou IDE, est largement augmenté chez les souris APP/PS1 traitées à la L41 par rapport aux souris pathologiques non traitées suggérant que les cellules microgliales s'orientent préférentiellement vers un état favorisant la phagocytose. Ceci est confirmé par la diminution de la charge en plaques amyloïdes observée dans l'hippocampe de souris APP/PS1 traitées à la Leucettine L41. Au contraire, la concentration en A β ₁₋₄₂ reste inchangée. Comme présenté dans l'introduction, il semble que cette diminution en charge amyloïde ne soit pas directement responsable des effets fonctionnels bénéfiques. Cependant, dans certaines conditions expérimentales, le niveau d'A β extracellulaire insoluble semble être corrélé au niveau d'A β intracellulaire soluble (la forme la plus toxique) ([Oddo, Billings et al. 2004](#)) (Introduction Chapitre II. I. 2). Ici, nous avons dosé les formes d'A β solubles par dosage ELISA sur du broyat d'hippocampe total. Ce dosage rend donc compte d'une concentration d'A β aussi bien neuronale qu'astrocytaire et microgliale. Ainsi, malgré qu'aucune différence en A β soit observée entre les conditions placebo et L41, je suppose que l'A β dosé dans la seconde condition est présent préférentiellement dans les cellules microgliales. La diminution de la charge en plaque amyloïde reflèterait alors le niveau d'A β intracellulaire soluble intraneuronal. Certaines preuves expérimentales permettent d'aller dans ce sens. Nous montrons, par exemple, une augmentation du marquage TREM2 dans les cellules microgliales de souris traitées à la L41 et en parallèle un marquage triple : IBA1, TREM2 et 6E10 (immunomarquant l'A β). Je suppose donc que le traitement à la Leucettine L41 induit un changement d'activation de

la microglie (Prokop, Miller et al. 2013). Ces cellules expriment alors un profil M2 favorisant la phagocytose et limitant par conséquent la quantité d'A β soluble intraneuronal.

En conclusion, l'inhibition de la protéolyse de DYRK1A par la Leucettine L41 induit de nombreux changements en cascade incluant : (i) une diminution de la quantité de DYRK1A tronquée dans les astrocytes interagissant préférentiellement avec la protéine STAT3 α , (ii) une normalisation du niveau de phosphorylation des protéine STAT3 α , (iii) une prévention de la transcription de cytokines pro-inflammatoires (iv) une amélioration de l'activité phagocytaire des cellules microgliales, limitant par conséquent la quantité d'A β extracellulaire insoluble et intraneuronal soluble et (v) une amélioration de l'activité neuronale, traduite fonctionnellement par un maintien de la mémoire spatiale à long terme (**Figure 55**).

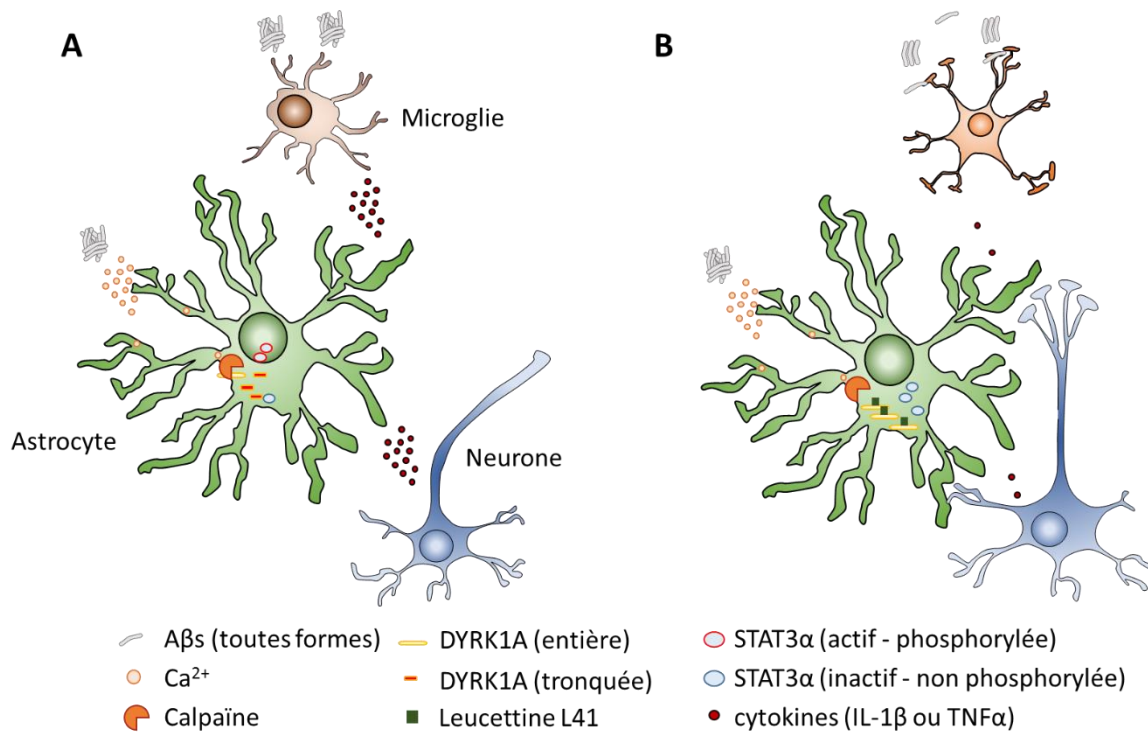


Figure 55 : Hypothèse formulée quant au mécanisme d'action de la L41 chez la souris APP/PS1 âgée de 14 mois.

(A) L'accumulation d'A β augmente le niveau de calcium intracellulaire dans l'astrocyte. En conséquence, l'activité de la Calpaïne augmente et clive de façon plus importante DYRK1A. Le niveau de spécificité de cette dernière, tronquée mais toujours fonctionnelle, est réduit. Elle phosphoryle alors de nouvelles protéines telles que la protéine STAT3 α . Une fois activée, STAT3 α transduit vers le noyau et transcrit les gènes proinflammatoires (IL-1 β et TNF α). Ces derniers ont un rôle délétère double : d'abord sur les neurones mais également sur les cellules microgliales.

(B) En préservant DYRK1A de sa coupure protéolytique médiée par la Calpaïne ; la Leucettine L41 prévient la phosphorylation de STAT3 α et la production de cytokines pro-inflammatoires délétères. L'état physiologique des cellules microgliales est préservé.

3. Interrogations suite aux données obtenues dans l'Article 1

Qu'il s'agisse des mécanismes d'action impliqués, de la méthode de traitement, du choix du modèle murin utilisé ou de son intérêt clinique, les résultats décrits dans l'article 1 nous amènent à réfléchir à plusieurs points.

i. Lien de causalité

La première interrogation se réfère au fait que tous ces éléments soient liés. En effet, la façon dont j'ai décrit les mécanismes d'action de la Leucettine L41 et par conséquent, l'effet délétère de la perte de la partie C-terminale de DYRK1A, suppose une notion de cascade d'évènements biologiques impliquant plusieurs liens de cause à effet. La réalité est certainement bien plus complexe que celle-ci et la description des mécanismes d'actions soulignée ici est avant tout basée sur une série de faits expérimentaux mesurés indépendamment. Ces liens de causalité n'ont pas été établis et des études complémentaires devraient être réalisées dans des systèmes biologiques bien plus simples que l'animal en incluant plusieurs contrôles expérimentaux. Par exemple, l'une de mes hypothèses est que DYRK1A tronquée phosphoryle de façon pathologique STAT3 α dans l'astrocyte et active la transcription de cytokines pro-inflammatoires chez ces cellules. Or, STAT3 α ainsi que les cytokines énoncées ne sont pas spécifique aux astrocytes et sont retrouvées au niveau neuronal et microglial. L'une des expériences complémentaires consisterait donc à exprimer des protéines DYRK1A mutées (comprenant ou non la partie C-terminale) dans une lignée de cellules astrocytaires en culture et mesurer leurs conséquences sur le niveau de phosphorylation de STAT3 α et sur la quantité de cytokines pro-inflammatoires. Par cette étude, nous pourrions ainsi valider l'une de nos hypothèses. Ce qu'il faut tout de même garder à l'esprit ici, est qu'aucune forme de DYRK1A n'a été observée dans les cellules microgliales, ce qui implique une conséquence indirecte des effets observés sur le fonctionnement de ces cellules.

ii. Implication des protéines DYRK1A exprimées en périphérie

La deuxième question qui peut être adressée ici se réfère aux effets annexes du composé utilisé pour prévenir l'apparition des formes tronquées de DYRK1A. Il est important de rappeler que ce composé dérivé des Leucettines est administré par injections intrapéritonéales quotidiennes pendant un mois. Les Leucettines sont capables de passer la barrière

hématoencéphalique (BHE). Pour preuve, la Leucettine L41 est retrouvée dans le plasma et le cerveau 30 minutes après son injection en i.p., selon une analyse pharmacologique effectuée par HPLC (données non publiées). Elle est détectée dans le cerveau jusqu'à 4 heures et dans le plasma jusqu'à 24 heures après injection. Dans le SNC, le composé peut donc se lier à DYRK1A exprimé dans les astrocytes et les neurones. Cependant, la Leucettine L41 peut également cibler la kinase au niveau périphérique où elle s'exprime dans le cœur, le pancréas, la rate ou des cellules sanguines immunitaires (lymphocytes B ou T notamment).

La MA est une maladie du SNC mais des échanges entre cette structure « semi-perméable » et la périphérie sont connus et ont lieu au niveau des barrières hématoencéphaliques et sang-LCR. Des éléments toxiques sont capables d'être libérés vers l'extérieur du cerveau provoquant un stress caractéristique de la MA (stress amyloïde et/ou stress relatif à la tauopathie). Une étude publiée en 2017 montre que la parabiose entre une souris APP/PS1 et une souris contrôle, induit chez cette dernière une pathologie amyloïde ([Bu, Xiang et al. 2017](#)). L'une des réponses à ce stress particulier, peut d'ailleurs être observée au niveau de la flore bactérienne. Une étude réalisée à Genève et Brescia, montre par exemple que la flore bactérienne intestinale de patients atteints de MA est différente de celle de patients cognitivement sains ([Cattaneo, Cattane et al. 2017](#)). Il est alors intéressant de retrouver dans le sang une augmentation d'IL-1 β , de TNF α et une baisse d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire). Mais si des éléments toxiques cérébraux sécrétés induisent un stress périphérique, *a contrario*, des éléments produits en périphérie peuvent être sécrétés vers le cerveau. Pour illustrer cela, je présenterai succinctement une étude publiée par l'équipe d'accueil dans laquelle j'ai eu l'occasion de participer. Par transfert de gènes, nous avons surexprimé l'IL-2 circulante chez la souris APP/PS1. Cette cytokine est connue pour stimuler la production de lymphocyte T (CD4), une cellule qui trouve son rôle dans le contrôle de l'inflammation. Cette stratégie augmente effectivement la quantité de cellules CD4 positives dans le sang, mais également dans l'hippocampe de ces souris. Alors que le recrutement d'astrocytes péri-plaques augmente et que le niveau de plaques amyloïdes diminue au même titre que le ratio A β_{1-42} /A β_{1-40} , il est démontré que la surexpression périphérique d'IL-2 suffit à prévenir la perte synaptique et améliore les fonctions mnésiques chez la souris ([Alves, Churlaud et al. 2017](#)).

Le fait que la MA ne soit pas limitée au SNC suggère que la Leucettine L41 retrouvée en périphérie pourrait potentiellement développer des effets au niveau cérébral comme précédemment décrits. Cela pourrait s'expliquer par l'intermédiaire d'une action sur les protéines DYRK1A exprimées dans le cœur, la rate, le pancréas ou encore dans les cellules lymphocytaires

T ou B. D'ailleurs, il est connu que DYRK1A régule l'équilibre entre lymphocytes T effecteurs (Th17) et T régulateurs (T reg) : son inhibition, augmente la différenciation des cellules Treg et réduit celle des cellules Th17 ([Khor, Gagnon et al. 2015](#)). Une explication potentielle voudrait que l'inhibition de DYRK1A par la L41 puisse promouvoir leurs différenciations et réguler l'inflammation dans l'hippocampe des souris APP/PS1. Pour tenter de vérifier ou réfuter cette hypothèse, j'ai donc lancé au cours de mon travail de thèse une étude annexe incluant un nombre restreint d'animaux. En traitant ou non ces souris transgéniques à la L41, j'ai évalué par cytométrie en flux, la distribution en cellules CD4, Treg et Th17 dans l'hippocampe et le sang de ces animaux. Je n'ai cependant pas observé de différence entre les groupes, suggérant que les effets bénéfiques observés dans l'article 1 ne passent a priori pas par cette voie pourtant intéressante.

iii. Intérêt d'un traitement ciblant la phase clinique de la MA.

Pour finir, une troisième interrogation, pour moi la plus intéressante, peut être ici développée. Plus générale que les deux précédentes, elle se réfère non pas directement aux faits expérimentaux mais plutôt à une réflexion éthique ou médicale à plus long terme. Les réponses apportées nous amèneront à discuter par la suite de l'intérêt de l'Article 2. Comme je l'ai présenté, la stratégie thérapeutique développée dans notre première étude, cible une MA à « un stade avancé » justifiée par l'utilisation de souris APP/PS1 âgées de 13 mois développant une pathologie amyloïde bien établie. Dans ce contexte, une quantité très importante d'A β et de lésions amyloïdes est associée à des perturbations synaptiques et des déficits mnésiques sévères. Cette condition expérimentale est classiquement utilisée dans les études visant à démontrer l'intérêt de stratégies thérapeutiques curatives ou symptomatiques. Je ne discuterai donc pas ici des conditions expérimentales. Je ne discuterai évidemment pas non plus de l'intérêt d'aider et de prendre en charge par des stratégies médicamenteuses, ou autres, les patients souffrant de démence Alzheimer. En revanche, la réelle interrogation se porte quant à l'historique de ces stratégies thérapeutiques. Depuis une dizaine d'années, des publications scientifiques mettant en évidence l'efficacité d'un agent thérapeutique chez les modèles animaux de la MA sont publiées quasi-hebdomadairement. Pourtant, ces espoirs ne sont pour l'heure jamais confirmés lors des essais cliniques (taux d'échec de 100% depuis plus de 15 ans) (Introduction Chapitre I. VI. 4). Ce constat d'échec est justifié par : (i) un manque de pertinence des modèles animaux vis-à-vis de la maladie humaine, (ii) le fait que ces stratégies soient utilisées trop tardivement pour observer un effet potentiel et (iii) une sélection inappropriée de patients volontaires à ces essais cliniques ([Polanco, Li et al. 2018](#)).

En effet, les essais cliniques enrôlent classiquement des participants exprimant un symptôme mnésique pour évaluer l'efficacité de thérapies sur le plan cognitif ([Cummings, Lee et al. 2017](#)). Le cerveau étant l'organe plastique par excellence, il est capable de s'adapter à la présence de lésions. Cet état de compensation est particulièrement bien démontré dans une étude récente basée sur l'analyse de la charge amyloïde dans le cerveau de participants à une étude appelée INSIGHT-preAD et localisée à l'Hôpital de la Salpêtrière à Paris ([Dubois, Epelbaum et al. 2018](#)). Des sujets âgés de 70 à 85 ans, avec des plaintes de mémoire subjectives, mais cognitivement sains possèdent des plaques amyloïdes. En suivant cette population sur deux années, les auteurs ont été capables de démontrer que la charge en plaques amyloïdes seule ne prédit en rien de la progression vers un stade clinique de la MA. Il est donc probable que le stade auquel sont inclus classiquement les patients répondant à des troubles mnésiques, soit trop tardif. L'image, peut-être provocatrice, qui pourrait être faite, serait de comparer les cerveaux de ces patients atteints de MA aux cœurs des patients souffrants d'insuffisance cardiaque. Pour ces derniers, le traitement est très compliqué, si ce n'est impossible, sans passer par une greffe de cœur. Un patient développant les premiers signes de la MA pourrait déjà être considéré comme étant en « insuffisance cérébrale ». A ce stade, le succès de n'importe quelle molécule ciblant la pathologie amyloïde, la pathologie Tau, l'inflammation ou autre semble mince.

Finalement, quelles sont les chances que la stratégie développée ici puisse être efficace lors d'un futur essai clinique ? Nous l'avons vu chez la souris mimant un stade avancé de MA, la Leucettine L41 prévient la protéolyse de DYRK1A et diminue la quantité de cytokines pro-inflammatoires. En conséquence, la charge en plaques amyloïdes, la plasticité synaptique et même la mémoire à long terme sont améliorées. Chez l'Homme, les essais cliniques étudiant l'effet potentiel de molécules dites NSAID (drogues anti-inflammatoires non-stéroïdiennes) se sont avérés inefficaces ([Heneka, Carson et al. 2015](#)). Les résultats sont néanmoins expliqués par une sélection non pertinente des participants et par le fait que la physiologie de l'inflammation est hautement dépendante du stade et du contexte dans lequel se trouve le tissu cérébral ([Kettenmann, Hanisch et al. 2011](#)). Aujourd'hui, quelques essais cliniques sont encore en cours. C'est le cas par exemple du VX-745 (Neflamapimod, EIP Pharma, LLC), actuellement en Phase 2. Le VX-745 est un inhibiteur sélectif de l'isoforme α de la MAPK p38, une kinase de stress stimulant la production de cytokines pro-inflammatoire comme le TNF α and IL-1 β . Cette molécule améliore la mémoire spatiale à long terme chez le rat âgé ([Alam 2015](#)). Les résultats de cet essai débuté en avril 2015, conduit par Parexel International (Californie, USA) sur 2 fois 16 participants, seront très intéressants au regard des résultats obtenus dans l'article 1. Toujours est-il, qu'à

l'heure actuelle, aucune preuve ne permet de prédire une éventuelle efficacité de la Leucettine L41 dans le traitement de patients diagnostiqués atteints de MA (Braak V Thal VI).

iv. Nécessité d'un diagnostic plus précoce de la MA ?

L'une des raisons évoquées pour expliquer ce haut taux d'échec est une sélection de participants, au moyen de tests diagnostic, pas assez fiables et trop tardifs. J'en reviens ici à ma comparaison de la MA avec les cancers, l'autre grande maladie associée au vieillissement de la population. Pour le cancer, une toute autre politique sanitaire est entreprise depuis quelques décennies. Le maître mot est le dépistage le plus précoce possible. Ceci est notamment justifié dans le plan cancer 2014-2019 (<http://www.e-cancer.fr/Plan-cancer/Plan-cancer-2014-2019-priorites-et-objectifs>). Les raisons à cela sont simples : un cancer diagnostiqué rapidement est plus facilement traité et est bien moins coûteux. En l'occurrence, le développement des techniques d'imagerie permet aujourd'hui d'identifier dans certaines conditions des structures cancéreuses très limitées en taille et de mettre en place une stratégie thérapeutique très précoce. Cette vision est associée à un taux de guérison important (http://www.iarc.fr/fr/publications/books/iarc50/IARC_50years-FR-web-12.pdf). D'un autre côté, il est observé un sur-diagnostic de certains cancer. Celui de la thyroïde est particulièrement frappant. En France, la moindre structure de taille anormale est identifiée par imagerie IRM et de très nombreuses thyroïdoectomies (ablation totale ou partielle de la thyroïde) sont alors associées à la prescription du lévothyrox (Merck), une molécule stabilisant un niveau hormonal physiologique mais à la base d'un dépôt de plainte en civil contre le laboratoire pharmaceutique ([Wemeau and Ladsous 2017](#)).

Contrairement aux cancers, le dépistage de patients atteints d'une MA avant son expression clinique est actuellement impossible. Ces patients ont dans la plupart du temps reçus un diagnostic de probabilité basé sur des tests de mémoire associés à de l'imagerie IRM. Leurs diagnostic de certitude étant obtenus uniquement après examen post-mortem et l'identification des deux lésions historiques et caractéristiques de la maladie. Il est cependant à noter qu'une troisième sorte de prise en charge diagnostique peut être effectuée. Celle-ci est alors réservée aux essais cliniques et se base sur des protocoles plus lourds incluant des tests de mémoire et de comportement poussés, de l'imagerie IRM et TEP et l'analyse de biomarqueurs présents dans le LCR. L'une des classifications utilisant ces biomarqueurs est appelée IWG2 (Introduction Chapitre II. VI. 1). Ces avancées ont permis de conceptualiser la MA comme un *continuum*, divisant la MA en une phase clinique suivie d'une phase préclinique. La première citée inclut : une phase prodromale et une phase démentielle et reflète l'apparition de symptômes cliniques, interférant plus ou moins dans le quotidien du patient. La seconde peut être distinguée en deux états :

« présymptomatique » (identifiant les formes familiales/génétiques de la MA) et « asymptomatique à risque élevé », qui est du reste bien plus controversé. Ce dernier est défini par une absence de signe clinique mesurable mais la présence d'au moins un biomarqueur de la pathologie Alzheimer, à savoir : la rétention d'amyloïde cérébrale observée par imagerie TEP ou les variations de protéines Tau totales ou Tau phosphorylées dans le LCR ([Dubois, Feldman et al. 2014](#)).

L'identification de ces biomarqueurs est difficilement réalisable à grande échelle. L'idée actuelle est de développer des solutions alternatives plus facilement réalisables et moins coûteuses. Deux publications récentes et plusieurs sociétés de biotechnologies développent actuellement leurs propres outils diagnostiques. Elles utilisent le dosage de marqueurs sanguins ([Nabers, Perna et al. 2018](#), [Nakamura, Kaneko et al. 2018](#)) (PreDiagnostics, Alzohis Diagnosis, Neuroquest) ou l'imagerie rétinienne (Neurotrack, RetiSpec). Le constat que l'on peut faire est que l'ensemble de ces démarches se limitent à un biomarqueur unique, limitant ainsi leur fiabilité. Surtout, elles ne sont pas prédictives puisqu'elles se basent sur des données acquises chez des patients symptomatiques. Le concept de « pathologie Alzheimer » incluant une phase préclinique, asymptomatique suivie d'une phase clinique est maintenant reconnu ([Jack, Knopman et al. 2013](#), [Dubois, Hampel et al. 2016](#), [Epelbaum, Genthon et al. 2017](#)) mais les outils actuels de la recherche empêchent d'un point de vue technologique de développer des solutions diagnostiques et d'analyser des thérapies ciblant cette phase préclinique.

L'une des stratégies envisagée pour répondre à cette problématique est de s'appuyer sur des cohortes de personnes volontaires suivies en recherche épidémiologique pendant plusieurs décennies. La cohorte « Whitehall 2 » regroupe par exemple 10 308 personnes hommes et femmes (2/3 vs 1/3), localisées à Londres, suivies depuis 1985 et âgées à cette date de 35 à 55 ans ([Marmot, Smith et al. 1991](#)). Ce type d'étude prospective nous renseigne par exemple, sur le taux de mortalité en fonction du statut social. Elle vise également à identifier des facteurs de risques associés à cette mortalité comme l'obésité, le faible niveau d'activité physique, la pression sanguine élevée ou le fait d'être fumeur. Dans le contexte de la démence, le Pr Singh-Manoux et son groupe ont réalisé une analyse rétrospective de 28 ans et ont démontré que les personnes diagnostiquées atteintes de démence présentaient un syndrome dépressif plus fréquent que des personnes non démentes 11 ans avant leurs diagnostic. Les auteurs ne suggèrent pas que le syndrome dépressif soit un facteur de risque de la démence mais que les deux pathologies partagent les mêmes causes ([Singh-Manoux, Dugravot et al. 2017](#)). L'un des intérêts de ces études longitudinales, est qu'il sera possible rétrospectivement d'identifier des biomarqueurs

avant même l'apparition de symptômes clinique. C'est d'ailleurs ce qu'il a été entrepris sur une cohorte Allemande (cohorte ESTHER). Dans cette étude, près de 10 000 personnes ont été recrutées entre 2000 et 2002, des critères d'inclusions ont permis de sélectionner 70 personnes atteintes de MA entre 2014 et 2015. Les échantillons de sang de ces 70 personnes obtenus entre 2000 et 2002 ont été analysés par une méthode basée sur des anticorps anti-A β dont la structure secondaire semble particulière (WO 2015121339 A1) ([Nabers, Ollesch et al. 2016](#)). En les comparant avec les échantillons de sang de participants actuellement sains sur le plan cognitif, sélectionnés au hasard dans les années 2000 / 2002, les auteurs démontrent une diminution d'A β dans le sang, plusieurs années avant la pose du diagnostic clinique de la MA ([Nabers, Perna et al. 2018](#)). Cette étude permet ainsi d'envisager la possibilité de diagnostiquer par simple prise de sang un patient atteint de MA dans sa phase préclinique.

Une stratégie alternative pourrait s'appuyer sur les modèles animaux de la MA. Cette stratégie semble malheureusement difficilement réalisable au regard des modèles actuels qui ont d'abord été développés pour produire les lésions histologiques historiquement utilisées pour le diagnostic post-mortem de la MA. Néanmoins, la modélisation d'une pathologie Alzheimer plus complète, incluant les premiers effets biologiques des peptides A β et caractérisant la phase préclinique de la MA, pourrait rompre ce verrou technologique. Cette stratégie a justement été développée dans l'Article 2 et sera discutée dans le prochain chapitre.

II. Modélisation de la phase préclinique de la MA chez l'animal

La deuxième étude présentée dans cette thèse se réfère au développement d'un modèle animal innovant de la MA. Le but était de modéliser l'ensemble de la pathologie Alzheimer et en particulier sa longue progression se développant sans symptômes cliniques, « phase préclinique ». Par souci de la dissocier de la pathologie humaine, nous la nommons « phase silencieuse » chez l'animal. La modélisation s'appuie sur une technologie permettant à ce qu'un faible nombre de neurones puissent produire une quantité limitée de peptides amyloïdes, mais néanmoins suffisante pour déclencher une cascade d'évènements pathologiques liés au vieillissement de l'animal. Cet animal propre à l'équipe nous permettra, par la suite, d'étudier le rôle de la protéine kinase DYRK1A et l'effet de molécules modulant son activité lors de phases précoces de la MA.

1. Induction d'un stress A β chez le rat AAV-AD

Dans notre problématique, le transfert de gènes apparaît comme une stratégie idéale. Une preuve de concept chez la souris avait été obtenue au laboratoire quelques mois avant mon arrivée ([Audrain, Fol et al. 2016](#)). La méthodologie utilisée ici est similaire, à l'exception du sérotype viral. Chez la souris, l'AAV10 avait produit des résultats bien plus cohérents que le stéréotype AAV9. En particulier, il avait été établi que le premier était associé à des troubles mnésiques 3 mois post injections, au contraire du second. Nous avons alors expliqué cette différence par le fait qu'une extinction de transgène avait lieu en utilisant l'AAV9. Chez le rat, nous avons choisi l'AAV9 : aucune extinction n'est observée, garantissant une expression de transgène constante du moment de l'induction jusqu'à la fin de vie de l'animal. En plus, par expérience provenant du laboratoire d'accueil, l'AAV9 est connu pour produire une réponse inflammatoire moins importante que l'AAV10. Tous nos animaux « pathologiques » désignés comme AAV-AD sont donc produits par co-injections de deux virus AAV9 codant un gène *APP* humain muté ou un gène *PS1* humain muté. Notre groupe contrôle est défini par l'injection d'un virus unique AAV9-PS1.

Nous avons utilisé une *APP* humaine de type 751 étant donné que la forme 695 ne favorise pas la formation d'A β ([Higgins, Catalano et al. 1993](#)). L'utilisation d'une forme doublement mutée de l'*APP* (Swedish et London) associé à une co-injection du gène *PS1* muté (M146L), nous a permis d'augmenter la spécificité de clivage de l'*APP* en A β ₁₋₄₂. Ainsi, le choix du transgène utilisé n'est pas original. Il est comparable à celui utilisé dans les lignées de souris transgénique. La véritable originalité de notre modèle s'appuie sur l'utilisation des virus AAV9 injectés dans l'hippocampe. Une expression de transgène restreinte à l'hippocampe, première région altérée dans la MA et intervenant dans la mémoire à long terme, est observée. Celle-ci est plus précisément localisée chez des neurones de diverses régions de l'hippocampe incluant le subiculum ; le CA2, le CA3 et de Gyrus Denté. Cette observation est particulièrement intéressante au regard de l'article publié par Bushman en 2015 démontrant un mosaïcisme du nombre de copie du gène *APP* dans certains neurones de patients atteints de MA sporadique ([Bushman, Kaeser et al. 2015](#)). Selon cette étude, certains neurones pourraient produire une quantité d'A β plus importante que d'autre, à l'origine de la majorité des peptides amyloïdes retrouvés dans le tissu. Notre système de modélisation est ainsi en complète adéquation avec cette notion : la quasi-totalité du tissu hippocampique de l'animal est sur le plan génétique tout à fait « normal », à l'exception de quelques neurones produisant de façon constante et exacerbée les peptides A β .

L'équilibre entre les niveaux de protéines APP dans sa taille entière et les fragments résultant de son clivage est essentiel (sAPP α et A β) ([LaFerla, Green et al. 2007](#)). Notre système favorise la production d'A β à un niveau faible par rapport aux souris transgéniques, limitant la surexpression complète d'APP taille entière et par conséquent, la production de peptides sAPP α pouvant se révéler bénéfiques comme montré dans le modèle de rat transgénique TgAPP^{swe} Fisher-344 ([Ruiz-Opazo, Kosik et al. 2004](#)). La production d'A β est par ailleurs dépendante de l'enzyme BACE-1 puisque l'administration par gavage unique d'un inhibiteur de BACE1 inhibe complètement la production d'A β chez le rat AAV-AD âgé de 1 mois post-induction. A cet âge, nous observons une production des deux peptides A β à un ratio A β_{1-42} / A β_{1-40} inférieur à 1, sans conséquence fonctionnelle.

2. Exacerbation de la pathologie amyloïde liée à l'âge

Dans cette étude, nous avons utilisé les avantages du rat par rapport à la souris pour analyser les conséquences de notre système d'induction non seulement, localement dans l'hippocampe à un âge donné, mais également de façon plus globale par l'intermédiaire de dosages dans le LCR et sur du long terme (jusqu'à 30 mois après induction) incluant plusieurs temps intermédiaires (1, 3, 8 ou 30 mois post-induction).

Nous avons ainsi observé une production constante et stable d'A β_{1-40} dans l'hippocampe tout au long de la vie de l'animal. Au contraire, l'A β_{1-42} ainsi que le ratio A β_{1-42} /A β_{1-40} augmentent avec l'âge. La progression stable en concentration du premier peptide cité mais également de l'APP humain et du β CTF permet d'écarter l'idée selon laquelle notre système d'induction serait responsable de l'augmentation du niveau d'A β_{1-42} . Une explication à ce phénomène a pu être apportée suite à l'analyse du niveau des peptides A β dans le LCR. A l'inverse de l'hippocampe, nous notons qu'un ratio A β_{1-42} /A β_{1-40} initialement élevé diminue au cours de la vie de l'animal. Les produits de clivage de l'APP sont détectables dans le LCR et le plasma dans des conditions physiologiques. Bien que l'A β circulant puisse provenir du pool produit en périphérie par les organes, la majorité retrouvée dans le plasma provient d'une production cérébrale, qui est alors transportée à travers la barrière hématoencéphalique (BHE). On parle alors d'évacuation ou de clairance de l'A β qui peut impliquer une dégradation enzymatique via les protéines IDE, NEP ou MMP à l'intérieur du SNC, ou non-enzymatique soit (1) par leur drainage du contenu du fluide interstitiel (ISF) dans le LCR via les membranes perivasculaires, (2) par leur phagocytose effectuée par la microglie et les astrocytes ou (3) par leur transport à travers la BHE vers la circulation sanguine via des récepteurs LRP-1 (low-density lipoprotein receptor-related protein 1) et RAGE (advanced glycation end products) ([Yoon and Jo 2012](#)).

En condition physiologique, la concentration en A β est six fois plus importante dans le SNC que dans le plasma ([Bates, Verdile et al. 2009](#)), les peptides sont principalement dégradés par les hépatocytes du foie ou plus modestement par des cellules des reins ([Ghiso, Shayo et al. 2004](#)). Leur dégradation semble d'ailleurs être relativement efficace si l'on se rapporte à une étude qui, en injectant l'A β en intra veineuse chez le rat, montre qu'en moins de 2 minutes, la concentration en peptides amyloïdes est réduite de moitié ([Hone, Martins et al. 2003](#)). De façon intéressante, la dégradation systémique de l'A β_{1-40} a été montrée comme modulant le niveau de dépôts d'A β dans le cerveau de singe squirrel sénescence, un modèle primate non-humain développant de l'angiopathie amyloïde ([Mackic, Bading et al. 2002](#)) (revues : ([Bates, Verdile et al. 2009](#), [Yoon and Jo 2012](#))).

En condition pathologique, en plus de la formation de plaques séniles, l'A β peut également s'accumuler sur les membranes des capillaires et artères cérébrales caractérisant alors les angiopathies amyloïdes cérébrales. Celles-ci sont retrouvées à 30 mois post-induction chez nos rats AAV-AD suggérant une accumulation d'A β péri-vasculaire. De façon intéressante, il est connu que l'A β_{1-40} est 50% plus facilement évacuée via la BBB et LRP1 que l'A β_{1-42} ([Monro, Mackic et al. 2002](#)), suggérant que l'A β_{1-42} a tendance à s'accumuler plus facilement aux abords des vaisseaux sanguins. Cette notion pourrait alors expliquer en partie l'augmentation du ratio A β_{1-42} /A β_{1-40} observée dans l'hippocampe des rats AAV-AD au cours du temps. Ce phénotype semble hautement représentatif de ce qui est observé chez les patients atteints de MA puisque 90 % d'entre eux présentent une AAC ([Love 2004](#)).

Il en résulte qu'au fur et à mesure de l'affaiblissement de l'efficacité de drainage de l'A β vers la périphérie, des seuils d'A β_{1-42} et du ratio A β_{1-42} /A β_{1-40} sont franchis, initiant alors une cascade pathologique dépendante d'un stress amyloïde subtile lié à l'âge. *In fine*, la concentration en A β apparaît suffisante pour produire des plaques séniles confirmant un déroulement complet de la pathologie amyloïde. Ces agrégats d'amyloïde sont composés aussi bien d'A β_{1-42} que d'A β_{1-40} humains et rongeurs. De façon intéressante, leur lieu de production n'est pas identique à celui des cellules exprimant nos transgènes. La toxicité des peptides A β est avant tout basée sur leurs concentrations. Cependant, il est admis que l'A β_{1-42} est plus toxique que l'A β_{1-40} probablement car ce premier a tendance à former plus facilement des oligomères ([Haass and Selkoe 2007](#)) et que l'A β_{1-40} peut inhiber son oligomérisation ([Murray, Bernstein et al. 2009](#)). Il est donc probable que le ratio A β_{1-42} /A β_{1-40} augmente avec l'âge dans l'hippocampe et par conséquent augmente la quantité de formes oligomères (solubles) toxiques. L'état des peptides A β présents

(monomériques ou oligomériques) n'a néanmoins pas pût être défini dans notre travail et aurait nécessité une analyse par microscopie électronique.

3. Conséquences d'un stress amyloïde subtile dans le temps

L'actuel modèle de la pathogenèse de la MA se réfère à l'hypothèse de la cascade amyloïde où l'A β est défini comme l'élément central initiant une série d'évènements pathologiques. Les preuves expérimentales sur le sujet permettent de penser que sous sa forme soluble monomérique ou oligomérique, l'A β perturbe subtilement le fonctionnement des mitochondries, des synapses, du protéasome, des cellules gliales et active secondairement une pathologie des protéines Tau en activant des protéines kinases. La progression de cette pathologie peut être accélérée par des facteurs de risque ou ralentie par des facteurs protecteurs mais l'âge apparaît ici comme un facteur majeur.

Notre modèle rat AAV-AD est particulièrement pertinent pour étudier sur du long terme les effets de l'augmentation d'A β_{1-42} . Bien qu'intéressant, nous n'avons pas analysé les conséquences sur la fonction mitochondriale ou celle du protéasome par manque de temps, de moyens techniques ou simplement par manque d'expérience dans le sujet. Il aurait été intéressant d'évaluer, par exemple, la toxicité de notre système sur des éléments critiques associés à la mitochondrie et connus pour être altérés dans la MA comme : le métabolisme du glucose, la quantité de dommages oxydatifs (dosage d'espèces réactives de l'oxygène : ROS) ou encore le niveau de mitophagie (apoptose mitochondriale) ([Onyango, Dennis et al. 2016](#)). Forts de notre expérience, nous avons étudié l'effet sur la phosphorylation des protéines Tau, l'activité synaptique et le fonctionnement cognitif.

Comportement émotionnel et courant tonique glutamatergique. Les premiers éléments pathologiques apparaissent dans le modèle AAV-AD à 3 mois post-induction. Nous observons une augmentation du courant tonique glutamatergique et un trouble du comportement émotionnel. Le premier phénotype est mesuré par analyses électrophysiologiques et avait déjà été observé chez le modèle souris AAV-AD dès 1 mois post-induction ([Audrain, Fol et al. 2016](#)). Il rend compte d'une activation importante des récepteurs extra-synaptiques NMDA (eNMDAR). Celle-ci est transitoire et justifiée par un stress neuronal induit par l'A β_{1-42} comme montré dans une culture cellulaire primaire mixte de cortex de rat (neurone/glie) ([Talanta, Sanz-Blasco et al. 2013](#)). La réduction des protéines PSD-95, protéine d'assemblage post-synaptique, pourrait expliquer l'internalisation des NMDAR conduisant secondairement à la libération du glutamate vers l'espace péri-synaptique. La diminution de GLT-1, un transporteur membranaire astrocytaire

impliqué dans la recapture de glutamate, pourrait également expliquer ce phénotype ([Masliah 1995](#), [Mookherjee, Green et al. 2011](#)). L'activation des eNMDARs intervient dans le développement de plusieurs maladies du SNC ([Hardingham and Bading 2010](#), [Kervern, Angeli et al. 2012](#), [Parsons and Raymond 2014](#)). En plus, il est observé chez des rats âgés, une activation préférentielle des eNMDARs probablement expliquée par une distribution altérée du glutamate dans l'espace synaptique ([Potier, Billard et al. 2010](#)). Le second phénotype rend compte de troubles du comportement émotionnel observés grâce au test de l'openfield. Alors que les rats AAV-AD âgés de 3 mois post-induction ne montrent pas de signes d'hyper- ou d'hypo-activité, une diminution du temps passé au centre de l'openfield suggère que ces rats développent un comportement d'anxiété (ou émotionnel) particulier ([Carter and Shieh 2015](#)). De manière intéressante, une publication récente a associé une élévation de la charge en plaques amyloïdes mesurée par imagerie TEP et le niveau d'anxiété/dépression de sujet âgés cognitivement sains ([Donovan, Locascio et al. 2018](#)). Les auteurs suggèrent ainsi un lien direct ou indirect entre les niveaux élevés d'A β et la détérioration des symptômes anxieux-dépressifs. Comme énoncé un peu plus haut, une étude épidémiologique démontre qu'un syndrome dépressif est observé bien avant la pose du diagnostic de la MA chez l'Homme ([Singh-Manoux, Dugravot et al. 2017](#)). L'hypothèse sous-jacente voudrait que ces symptômes émotionnels représentent une manifestation précoce de la pathologie Alzheimer. Collectivement, l'analyse de nos rats AAV-AD âgés de 3 mois post-induction souligne les premières conséquences fonctionnelles de l'augmentation d'A β ₁₋₄₂.

Induction d'une tauopathie endogène secondaire. A l'âge de 8 mois post-induction, nous avons mis en évidence une phosphorylation anormale des protéines Tau endogènes chez notre rat AAV-AD. Une hyper-phosphorylation de protéines Tau sur des épitopes physiologiques (Thr181) mais également une phosphorylation anormale sur des épitopes retrouvés uniquement chez des patients atteints de MA (Ser422) ont en effet été identifiées. L'apparition d'épitopes significativement élevés est graduelle. Par diverses méthodes biochimiques, nous identifions deux épitopes significativement plus élevés à 8 mois post-induction, puis cinq autres à l'âge de 30 mois post-induction. A cet âge, des épitopes caractéristiques de protéines Tau insolubles (AT8 et AT100) sont observés par western bot. Une analyse histopathologique sur tissus confirme cette donnée et identifie des cellules AT8 et AT100 positives dans l'hilus du gyrus denté de l'hippocampe. L'immunomarquage AT8 ou AT100 est classiquement utilisé lors d'analyses post-mortem cliniques et révèle des protéines Tau structurées en paire de filaments hélicoïdaux (PHF) constituant majeur des DNFs ([Kopeikina, Hyman et al. 2012](#)).

Nous avons ensuite tenté d'identifier les liens entre l'augmentation d'A β et l'hyperphosphorylation des protéines Tau. L'existence d'un « crosstalk » entre ces deux composantes est bien établie par exemple dans l'espace dendritique post-synaptique. Ici, l'A β peut cibler la protéine kinase Fyn qui phosphoryle ensuite la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA. Une corrélation positive est observée entre le niveau de protéines Tau phosphorylées et Fyn dans ce compartiment neuronal de patients atteints de démence fronto-temporale (mutations sur le gène codant Tau) ([Ittner, Ke et al. 2010](#)). L'accumulation de protéines Tau est en partie médiée par l'A β ([Li, Kumar et al. 2011](#)). De façon intéressante, une étude publiée en 2017 utilisant des lignées de cellules, des cultures primaires de cellules et différentes lignées de souris transgéniques Tau, montre que l'A β induit localement une synthèse *de novo* des protéines Tau médiée par plusieurs protéines kinases dont Fyn, ERK1, ERK2 et la protéine ribosomale S6. Cette augmentation de niveau de Tau est alors associée à une augmentation du niveau de leurs phosphorylations ([Li and Gotz 2017](#)). Mais le lien entre l'A β et la phosphorylation de Tau n'est pas unique à la kinase Fyn. Dans ce même compartiment neuronal, l'A β peut également activer les protéines kinases CAMKII α , CAMKK2, AMPK et p38 γ , toutes impliquées dans la phosphorylation de Tau, alors qu'au-delà des épines dendritiques, l'A β et Tau sont liés au niveau des microtubules de l'axone et des mitochondries ([Polanco, Li et al. 2018](#)). Dans notre étude, une analyse biochimique dans un extrait d'hippocampe entier montre une augmentation du niveau de certaines kinases. Nous nous sommes concentrés à doser le niveau de protéines kinases impliquées dans de nombreuses voies moléculaires. Ainsi, les rats AAV-AD âgés de 3 mois post-induction montrent une augmentation de GSK3 β , une kinase bien connue dans le contexte de la MA ([Mazanetz and Fischer 2007](#)). En plus, le niveau de DYRK1A est retrouvé augmenté chez les rats AAV-AD âgés de 8 mois post-induction confirmant son potentiel lien entre les deux composantes ([Kimura, Kamino et al. 2007](#)). Au contraire, nous n'avons observé aucune différence au niveau de la kinase CDK5. Le niveau protéique des kinases, citées plus haut, n'ont pas été analysés. Ainsi, sans identifier une voie moléculaire avec précision, nos résultats supposent que l'A β induit secondairement une tauopathie endogène via une dérégulation des protéines kinases incluant au moins GSK3 β et DYRK1A.

Ainsi, l'augmentation progressive d'A β ₁₋₄₂ humaine induisant une pathologie Tau endogène constitue la notion novatrice de ce modèle. Il récapitule en effet les points majeurs abordés dans l'hypothèse de cascade amyloïde de John Hardy ([Selkoe and Hardy 2016](#)) et ceci, au contraire de tout autre modèle animal de la MA (modèles transgéniques ou injectés). Nous expliquons cela par : (i) une induction d'A β ₁₋₄₂ à l'âge adulte, excluant toute compensation

développementale, (ii) une production d'A β_{1-42} subtile et comparable en concentration à ce qu'il est observé en clinique et (iii) une progression lente nécessitant un vieillissement du tissu.

Conséquences sur la plasticité synaptique et la mémoire. Les premières conséquences sur la fonction mnésique sont observées à 8 mois post-induction, c'est à dire dès que l'hyperphosphorylation des protéines Tau est détectable par dosage biochimique. Les effets fonctionnels ainsi observés sont issus de l'analyse électrophysiologique de coupes de cerveaux *ex-vivo* révélant une diminution de la LTP (potentialisation à long terme) chez nos rats AAV-AD âgés de 8 mois post-induction. Celle-ci est particulièrement bien étudiée et rend compte de la force synaptique entre les neurones pyramidaux du CA3 projetant, via leurs axones (collatérales de Schaffer), vers les dendrites des neurones pyramidaux du CA1 de l'hippocampe. Bien que cette mesure soit réalisée uniquement chez l'animal de laboratoire, il est clairement admis que la plasticité synaptique de ces deux types de neurones conduit à un certain type d'apprentissage et de mémoire dépendant de l'hippocampe chez l'Homme ([Sweatt 2016](#)). De plus, le lien entre les altérations synaptiques et les troubles mnésiques est corrélé et sont tous deux considérés comme étant des éléments prépondérants dans l'évolution de la pathologie Alzheimer ([Terry, Masliah et al. 1991](#), [Selkoe 2002](#)). Nos rats AAV-AD âgés de 8 mois post induction développent des troubles fonctionnels de la mémoire spatiale à long terme. A l'inverse des souris APP/PS1, étudiées dans l'article 1 par exemple, les rats AAV-AD sont capables d'apprendre la tâche à réaliser aussi bien que leurs congénères contrôles suggérant un apprentissage spatial efficace. Les résultats du test de rappel effectué plusieurs jours après le dernier essai d'apprentissage, révèlent par contre, un défaut de mémoire spatiale à long terme. Sans tomber dans de l'anthropomorphisme, le fait que la mémoire à long terme soit atteinte semble particulièrement pertinent au regard d'une récente publication ([Weston, Nicholas et al. 2018](#)). Cette dernière rend compte d'un programme de recherche conduit à l'UCL (University College of London) et regroupant des patients MA porteurs de mutations autosomales dominantes avant l'apparition de déclin cognitif. Dans ce travail, trois tâches comportementales ont été réalisées. Une tâche d'apprentissage initiale suivi d'un rappel après 30 minutes ne montre pas de différences entre les participants porteurs de mutations et les participants contrôles. Par contre, une dernière tâche, réalisée 7 jours plus tard, révèle un oubli à long terme chez les participants porteurs de mutations. Les auteurs ont donc démontré que ce déficit mnésique particulier, apparait chez des individus porteurs de mutations typique de la MA familiale, lors de la phase présymptomatique de la pathologie. Ainsi, ces données supposent que **les troubles mnésiques du rat AAV-AD sont liés soit uniquement à la présence de protéines Tau hyperphosphorylées, soit à une combinaison avec la pathologie amyloïde.** Si de nombreuses données de la littérature peuvent orienter notre réflexion (comme par exemple

l'immunothérapie ciblant les protéines phospho-Tau évaluée sur un modèle 3xTg-AD ([Walls, Ager et al. 2014](#))), nous tenterons dans l'Article 3 d'apporter des preuves expérimentales pour répondre à cette interrogation en challengeant directement l'une des pathologies sur ce modèle.

Effets sur les cellules gliales et la neuroinflammation. Pour finir, la réactivité astrocytaire et microgliale a quant à elle été évaluée par immunomarquage de protéines comme la GFAP, la vimentine (astrocytes) ou IBA1 (microglie) aussi bien par western blot que sur tissus. Nos observations n'ont montré aucune différence de réactivité gliale, en particulier après marquage sur tissus et aux alentours des agrégats amyloïdes et Tau de nos rats AAV-AD de 30 mois post induction. Ces données semblent très surprenantes compte tenu du fait qu'il est communément admis que les oligomères d'A β solubles et les plaques séniles initient la réponse inflammatoire via l'activation de cellules gliales ([Heneka, Carson et al. 2015](#)). Cette dernière précède même la formation de PHFs dans des souris transgéniques Tau ([Yoshiyama, Higuchi et al. 2007](#)). Pour expliquer cette différence, nous pouvons souligner que ces observations ont été réalisées chez des souris transgéniques. Dans un contexte où les formes solubles en A β et Tau toxiques sont présentes en concentration très importante exacerbant ainsi la réactivité gliale. Chez l'Homme, aucune preuve ne permet de démontrer que les formes solubles d'A β et de Tau sont suffisantes pour induire une réactivité gliale observable par marquages immunologique sur coupes. Dans le contexte des rats AAV-AD âgés de 30 mois, il est très probable que les lésions insolubles d'A β et de Tau soit récentes compte tenu du fait que seule la moitié des animaux développent ces lésions. Ainsi, la « jeunesse » des lésions pourrait expliquer pourquoi la réactivité gliale ne soit pas (encore) détectable. Malgré tout, il est à noter que ces analyses sont loin d'être exhaustives et mériteraient une évaluation plus poussée. Par exemple, il est connu que l'A β sous sa forme oligomérique soluble stimule la production microgliale de cytokines inflammatoire diminuant alors leur capacité de phagocytose ([Sondag, Dhawan et al. 2009](#), [Pan, Zhu et al. 2011](#)). Le dosage en cytokines inflammatoires pourrait être intéressant dans ce cas.

Collectivement, notre système d'induction permet de produire un modèle animal accumulant des quantités subtiles d'A β . Les concentrations des deux espèces amyloïdes (A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂) évoluent à leurs propres comptes, sans modification de l'expression des transgènes, nous observons une augmentation d'A β ₁₋₄₂ au fur à mesure de l'avancement en âge de l'animal. Des seuils d'A β ₁₋₄₂ sont franchis et induisent secondairement une pathologie Tau, limite à partir de laquelle les premiers troubles mnésiques sont observés. Bien plus tard, des lésions caractéristiques de la phase lésionnelle de la MA apparaissent validant une pathologie évolutive pouvant au final, être divisée en une phase silencieuse et une phase lésionnelle. Il est difficile

d'intellectualiser une maladie propre à l'Homme chez un animal. Cependant, nous avons imaginé une comparaison entre la pathologie Alzheimer chez l'Homme (basé sur la classification IWG2) à celle modélisée par le modèle AAV-AD ou par un modèle transgénique récapitulant de façon massive les deux lésions histopathologiques (3xTg-AD) (**Figure 56**).

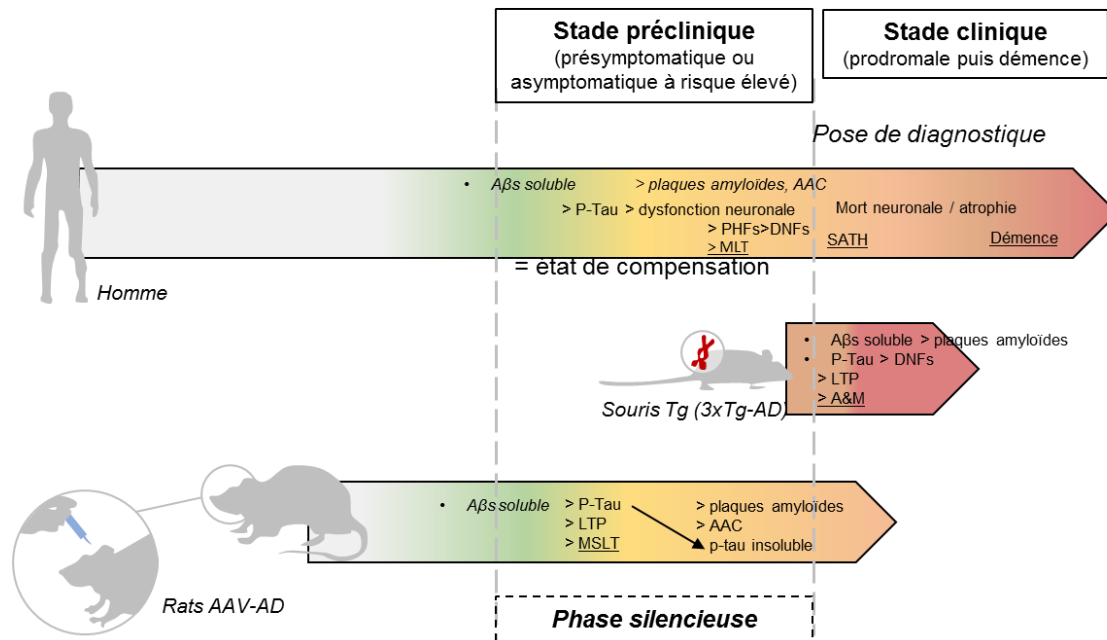


Figure 56 : Hypothèse formulée quant à la progression de la pathologie Alzheimer chez l'Homme comparée à celle de différents modèles animaux.

Chez l'Homme, la MA est conceptualisée comme un continuum où des événements biologiques toxiques (augmentation d'Aβ solubles, induction de la tauopathie) se développent dans le cerveau sans conséquences fonctionnelles (Etat de compensation) plusieurs décennies avant leurs expressions cliniques (Pose du diagnostic). Il est donc distingué une phase préclinique et une phase clinique ([Jack, Knopman et al. 2010](#), [Dubois, Feldman et al. 2014](#), [Dubois, Epelbaum et al. 2018](#), [Weston, Nicholas et al. 2018](#)).

Chez la souris transgénique 3xTg-AD, les quantités importantes en Aβ et Tau mutées permettent de produire des formes d'Aβ et de Tau solubles, mais également insolubles rapidement associés à des troubles comportementaux.

Chez le rat AAV-AD, la production d'Aβ en concentration proche de celle observée chez les patients, suffit à induire une pathologie Tau graduelle et des troubles du comportement émotionnels et de la mémoire à long terme.

AAC : Angiopathie Amyloïde Cérébrale ; P-Tau: Tau hyperphosphorylées ; PHFs : filaments de protéines Tau en paires hélicoïdales ; DNFs : Dégénérescences Neuronales Fibrillaires ; MLT : Mémoire de rappel à long terme ; SATH : Syndrome Amnésique Typique de l'Hippocampe ; LTP : potentialisation à long terme ; A&M : apprentissage et mémoire spatiale ; MSLT : mémoire spatiale à long terme ; : : Élément initial ; > : conséquence directe ; xxx : symptôme cognitif.

4. Potentielles études combinant le rat AAV-AD à d'autres animaux modélisant un facteur de risque de la MA

Le vieillissement de la population étant accompagné de troubles multiples, la MA sous sa forme sporadique peut être considérée comme une MA multifactorielle ([Herrup 2015](#)). De nombreux facteurs de risques de la MA sont avancés. Ils sont soit d'origines génétiques (APOE4, BIN1, ...) ou soit non génétiques et alors associés à des maladies chroniques tel que le diabète ou l'obésité. Des études de certains facteurs de risque chez l'animal de laboratoire ont d'ores et déjà été effectuées mais leurs implications dans l'avancement de la maladie restent mal connues. Nous pouvons citer par exemple une souris transgénique exprimant l'APOE4 humaine ([Shi, Yamada et al. 2017](#)) ou un modèle de rat développant un diabète de type 2 spontané ([Portha, Giroix et al. 2012](#)).

L'intérêt du modèle AAV-AD est, nous l'avons vu, basé sur son système d'induction capable de produire un stress amyloïde subtile. Ce système d'induction par transfert de gènes a par exemple été réalisé aussi bien chez la souris que chez le rat « contrôle ». Dès lors, nous pouvons également l'induire chez des souris transgéniques modélisant certains facteurs de risques ou des rats développant une maladie chronique. En particulier, une étude a récemment démontré que l'ApoE4 pourrait contribuer à la pathologie amyloïde en accélérant sa propagation ([Liu, Tsai et al. 2014](#)). Celle-ci a été conduite en induisant par transgénèse dirigée le gène humain APOE4 dans les astrocytes de souris APP/PS1. Nous pourrions ainsi étudier l'implication d'un facteur de risque, non seulement sur la pathologie amyloïde mais également sur l'induction de la pathologie Tau en combinant l'animal modélisant ce facteur de risque d'intérêt à notre rat AAV-AD.

5. Limites actuelles et espoirs futurs d'un diagnostic de la phase préclinique de la MA

L'appréhension de recevoir un diagnostic de maladie infectieuse (SIDA), de cancer ou de maladie chronique est légitime mais la plupart des patients montrent un comportement volontariste face à cette peur. Cette démarche est bien plus complexe à percevoir en ce qui concerne la MA. Peu d'études sont disponibles en France sur les représentations sociales de cette maladie. Une étude réalisée en 2008 par l'INPES (Institut national de prévention et d'éducation pour la santé) fournit pourtant quelques informations intéressantes (<http://inpes.santepubliquefrance.fr>). La MA est la maladie jugée la plus grave après le cancer et le SIDA, la troisième la plus crainte devant le cancer et les accidents de la route. Paradoxalement, en dépit qu'elle fasse peur, un sondage montre que **91% des français de tout âge**, souhaiteraient connaître leur diagnostic s'ils avaient des signes évocateurs de la maladie. Dans les faits,

l'expérience des médecins indique que, **les personnes âgées** et leur entourage, optent le plus souvent pour **une attitude attentiste**.

Dans l'état actuel des choses, cette crainte est complètement justifiée. D'abord, l'annonce de ce diagnostic peut être à l'origine d'une anxiété ou d'un sentiment de stigmatisation, évidemment dommageable pour la qualité de vie de la personne. Ensuite, quelques rares études ont évalué l'impact du diagnostic « précoce » de la maladie (avant une perte complète de l'autonomie), en ne montrant aucun bénéfice quant à l'apparition de la dépendance et l'entrée en institution médicalisée ([Koivisto, Hallikainen et al. 2016](#)). Surtout, aucun traitement efficace n'est disponible actuellement.

Pourtant, être informé précocement de sa maladie pourrait présenter certains avantages : cela permettrait aux patients de mettre en place avec leurs entourages des solutions pour prévenir certains risques comme les accidents domestiques ou les escroqueries, de prendre le temps de rédiger des directives anticipées en fonction de leurs souhaits de fin de vie. La personne pourrait choisir de modifier son régime alimentaire ou adapter sa vie sociale pour tenter de retarder l'évolution des symptômes. Il y a encore quelques années, les cliniciens spécialistes préconisaient un diagnostic au moment opportun : ni trop tardif, c'est-à-dire au moment des premiers symptômes perçus par le patients ou l'entourage, ni trop précoce, puisque plus on envisage de diagnostiquer précocement un patient, plus on a de chance d'annoncer un résultat erroné ([Brooker, La Fontaine et al. 2014](#)). Aujourd'hui, les avancées dans le domaine des biomarqueurs précoces et le concept de pathologie Alzheimer incluant une phase préclinique et une phase clinique permettent, petit à petit de changer de vision. Actuellement, un consensus veut que les thérapies pour la MA devraient idéalement débuter avant l'apparition des premiers symptômes ([McDade and Bateman 2017](#)).

Ainsi, l'utilisation de tests diagnostiques pertinents de la phase préclinique de la MA semble à l'heure actuelle encore loin d'être démocratisée mais nécessitera dans le futur de l'associer à une prise en charge thérapeutique efficace ciblant spécifiquement cette phase. De nombreuses stratégies thérapeutiques sont ainsi en cours de développement, ce qui me permet ici d'introduire la discussion de l'article 3.

III. Implications de DYRK1A dans la phase préclinique de la MA

De nombreuses preuves expérimentales convergent dans le sens que bien plus que les protéines agrégées, caractéristiques des stades avancés de la MA, les formes solubles d'A β et de Tau exercent la majorité des effets toxiques. Pour espérer traiter la MA lors de la phase

préclinique, encore exempte de symptômes, le développement de biomarqueurs quantifiables par imagerie (TEP ou IRM) ou par dosages biochimiques à partir de fluide biologique (LCR, sang, urine ou salive) est indispensable. Une fois développées, ces approches diagnostiques devront être associées à des stratégies thérapeutiques. Le but de l'Article 3 vise à déterminer si la protéine DYRK1A est une cible pertinente pour ce type de stratégie. L'étude a consisté à comprendre le rôle de la protéine DYRK1A et à évaluer l'intérêt thérapeutique de molécules ciblant sa fonction lors de la phase préclinique de la MA. L'analyse de tissus cérébraux de patients atteints de MA à ce stade de la pathologie étant impossible, nous avons donc effectué cette démarche chez le modèle AAV-AD rat (Article 2), reproduisant les événements précoces de la pathologie Alzheimer, ici appelée phase silencieuse de la MA. La Leucettine L41, préalablement sélectionnée chez les souris APP/PS1 (Article 1), a été utilisée comme modulateur de l'activité de DYRK1A.

1. Régulation de la protéine DYRK1A lors de la phase silencieuse de la MA

Les résultats obtenus et décrits dans l'Article 1 ont permis de démontrer que la protéine DYRK1A subit une protéolyse pathologique dépendante de l'activité Calpaïne dans un contexte de MA avancée aussi bien chez le patient (Braak V-VI, Thal IV-V) que chez un modèle souris d'amyloïdose stricte (APP/PS1 âgées de 14 mois) sans affecter son activité kinase globale. Nous avons donc analysé la régulation de la protéine DYRK1A dans l'hippocampe de rats AAV-AD sur plusieurs âges (3, 8 et 30 mois post-induction).

D'abord, l'activité Calpaïne a été mesurée. Nous n'observons aucune différence de celle-ci à 3 et 8 mois post-induction entre les rats AAV-AD et les rats contrôles. Au contraire, une augmentation de l'activité Calpaïne est mesurée chez les rats AAV-AD âgés de 30 mois post-induction. A cet âge, la forme entière de DYRK1A est diminuée et nous observons une augmentation de formes tronquées suggérant que DYRK1A subit une protéolyse pathologique médiée par la Calpaïne. Celle-ci est retrouvée uniquement à 30 mois post-induction, âge à partir duquel, nous observons une accumulation d'A β extracellulaire insoluble. Comme décrit dans l'Article 1, l'augmentation de l'activité Calpaïne médiée par une dérégulation calcique via la présence d'A β est largement reconnue ([Bezprozvanny and Mattson 2008](#)). En particulier lors des stades sévères de la MA (Braak V-VI). En plus, une étude démontre qu'elle pourrait intervenir plus tôt dans la pathologie au niveau du stade Braak III : après l'apparition de plaques amyloïdes mais avant l'apparition de DNFs ([Kurbatskaya, Phillips et al. 2016](#)). Dans ce sens, notre modèle AAV-AD exprime à 30 mois post-induction, une quantité de formes solubles d'A β suffisante pour produire des formes insolubles et pour activer cette protéolyse pathologique. A l'heure de finaliser ce manuscrit, le dosage de l'activité DYRK1A par HPLC ainsi que des doubles marquages dirigés

contre la protéine DYRK1A (ciblant les formes tronquées) et contre la protéine GFAP (marqueur astrocytaire) n'ont pas été effectués. Même si nos données obtenues jusqu'alors laissent à penser que nos rats AAV-AD âgés de 30 mois post-induction développent une protéolyse de DYRK1A semblable à ce qui est observé chez des patients atteints de MA (Braak V-VI, Thal IV-V) et des souris APP/PS1 âgées de 14 mois, toutes conclusions définitives semblent pour l'heure prématurées.

2. Conséquences de l'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A lors de la phase silencieuse de la MA.

La Leucettine L41 a initialement été développée pour sa capacité à inhiber l'activité kinase de DYRK1A. De façon similaire à l'Article 1, elle a été administrée quotidiennement durant 1 mois, aux moyens d'injections intrapéritonéales et à raison de 20 mg/kg L41 chez des rats AAV-AD âgés de 7 mois.

A l'heure d'écrire ce manuscrit, l'activité kinase de DYRK1A n'a pas été évaluée par HPLC comme effectuée dans l'Article 1. Néanmoins, nous possédons quelques preuves expérimentales permettant de déterminer si le traitement affecte le niveau d'activité kinase de DYRK1A. Il est à rappeler que DYRK1A phosphoryle l'APP sur son épitope Thr 668 ([Ryoo, Cho et al. 2008](#)) et de nombreux épitopes de Tau retrouvés chez des patients MA ([Ferrer, Barrachina et al. 2005](#), [Wegiel, Dowjat et al. 2008](#)), en particulier la Thr 212 ([Wegiel, Gong et al. 2011](#)). Dans notre étude, nous observons une diminution du niveau de phosphorylation de l'APP sur la Thr 668 et celui des protéines Tau sur la Thr 212 ce qui suppose que l'activité kinase de DYRK1A est réduite par la Leucettine L41. Une question majeure doit alors être abordée au regard de l'Article 1, où nous avons observé que la Leucettine L41 ne diminuait pas l'activité kinase de DYRK1A chez des souris APP/PS1 âgées de 14 mois.

Le contexte physiopathologique semble être ici particulièrement déterminant. Dans le contexte des rats AAV-AD âgés de 8 mois post-induction, DYRK1A n'est pas clivé par la Calpaïne et aucune forme tronquée de DYRK1A n'est présente. Dans le contexte des souris APP/PS1 âgée de 14 mois, DYRK1A est clivé par la Calpaïne et une quantité importante de formes tronquées en résulte. Selon ces deux contextes biologiques, la Leucettine L41 semble ainsi jouer deux rôles différents : soit, elle inhibe l'activité kinase des formes entières de DYRK1A non complexées à la Calpaïne ; soit, elle inhibe la protéolyse de DYRK1A, empêchant son interaction avec la protéase Calpaïne probablement par encombrement stérique ou changement de conformationnel de la kinase DYRK1A (**Figure 57**).

Collectivement nous démontrons que l'activité kinase de DYRK1A est réduite chez nos rats AAV-AD âgés de 8 mois post-induction. L'intérêt majeur de notre modèle rat AAV-AD réside dans le fait de pouvoir évaluer des stratégies thérapeutiques bien avant l'apparition de symptômes associés à la MA. Dans ce contexte, nous sommes donc capable d'analyser les conséquences de l'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A sur (i) la concentration en peptide amyloïdes, (ii) le niveau de phosphorylation des protéines Tau et (iii), le statut cognitif (comportement émotionnel et mémoires spatiales) de rats AAV-AD âgés de 8 mois post-induction.

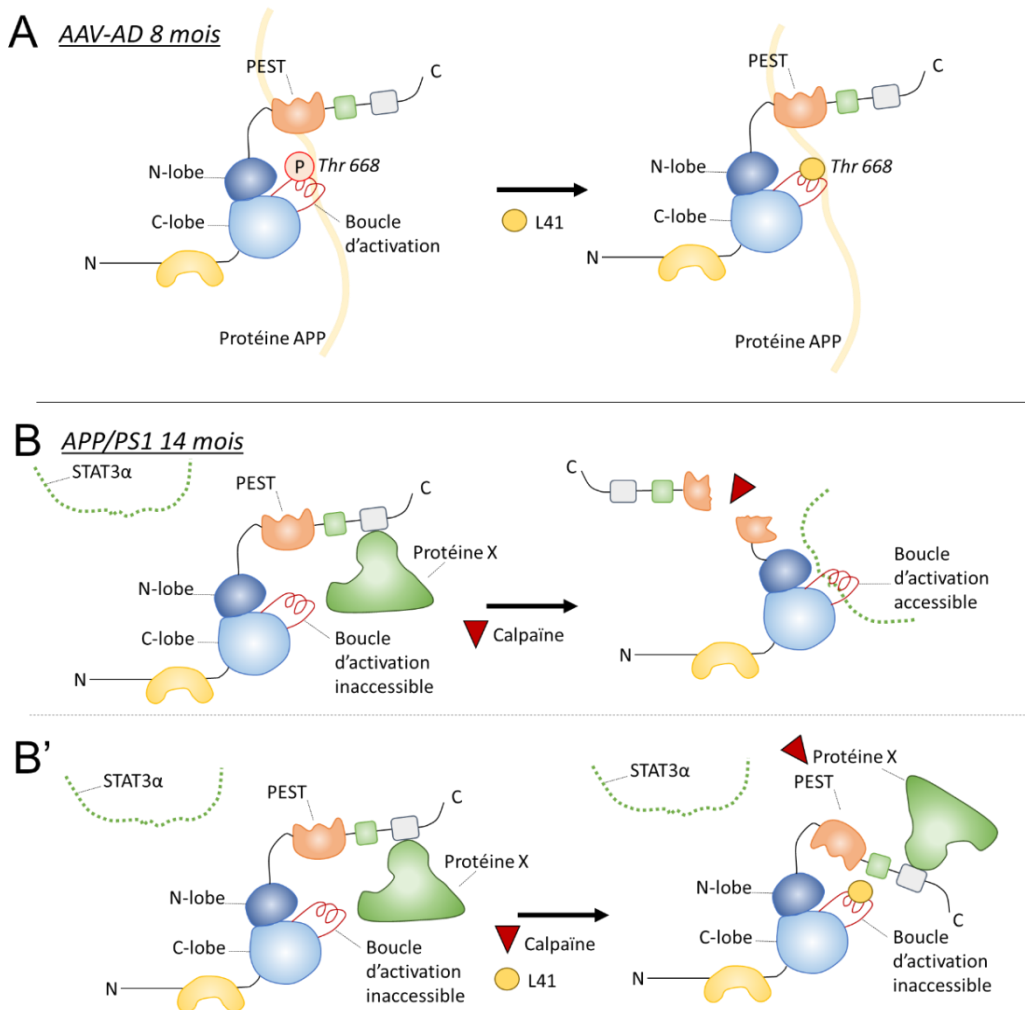


Figure 57: Hypothèse décrivant des effets doubles de la Leucettine L41, dépendants du contexte biologique dans lequel se trouve DYRK1A.

A. Chez le rat AAV-AD âgé de 8 mois, l'activité de la calpaïne n'est pas augmentée. La Leucettine L41 inhibe l'activité kinase de DYRK1A (formes entières) telle qu'elle a été

initialement développée et observée in vitro comme par exemple sur la Thr 668 de la protéine APP.

B. Chez la souris APP/PS1 âgée de 14 mois, l'activité de la calpaïne est retrouvée augmentée suite à une profonde dérégulation calcique médiée par la concentration élevée en peptides A β . DYRK1A est protéolysé, sa partie C-terminale est libérée favorisant l'interaction entre le domaine catalytique de DYRK1A et de nouvelles protéines comme STAT3 α .

B'. Chez la souris APP/PS1 âgée de 14 mois et traitées à la Leucettine L41, l'activité Calpaïne reste élevée mais DYRK1A lié à la Leucettine L41 change de conformation. La protéolyse de DYRK1A est inhibée permettant à ce que STAT3 α ne soit pas phosphorylé par DYRK1A.

i. Effets sur la composante amyloïde

L'administration de Leucettine L41 chez les rats AAV-AD ne modifie pas les paramètres liés à l'induction de la pathologie. En effet, les niveaux d'APP et de PS1 exogènes et totales (humain + rat), de même que la localisation des neurones infectés, produisant nos transgènes sont identiques entre nos animaux AAV-AD placebo et AAV-AD L41.

Connue pour phosphoryler l'APP sur son épitope Thr 668 ([Ryoo, Cho et al. 2008](#)), il a récemment été montré que l'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A par le composé DYRK1-inh, dérivé des benzimidazoles (numéro de brevet US2016/050198) diminue cette phosphorylation chez la souris 3xTg-AD âgé de 12 mois (après un traitement de 2 mois). Celle-ci est associée à une modification du métabolisme de l'APP : réduisant le niveau total d'APP et la quantité des fragments C83 et C99. Dans cette étude, l'inhibition de DYRK1A diminue les concentrations en A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ insolubles ainsi que la charge en plaques amyloïdes mais les concentrations en A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ solubles restent inchangées ([Branca, Shaw et al. 2017](#)).

Dans notre étude, nous observons une diminution du niveau de phosphorylation de l'APP sur la Thr 668, ce qui suppose que la L41 est capable d'inhiber DYRK1A chez nos rats âgés de 8 mois post-induction. Comme dans l'étude de Branca, nous n'observons pas de modification des concentrations en A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ solubles, que ce soit dans l'hippocampe ou même dans le LCR de nos rats AAV-AD. Mais au contraire de leur étude, la diminution de phosphorylation de l'APP sur la Thr 668 n'est pas associée à une diminution de l'APP taille entière (humaine ou totale). Notre modèle ne développant pas de plaques amyloïdes, à ce stade, nous ne pouvons donc pas évaluer les conséquences de la L41 sur ce phénotype. Il serait donc judicieux de doser les fragments C83 et C99 pour valider le fait que le métabolisme de l'APP n'est pas modifié dans notre contexte expérimental. Au regard de nos données, comment expliquer que l'APP sous sa forme entière ne soit pas diminuée chez les rats AAV-AD ? Pour répondre à cette question, il faut

noter que la différence de quantité de protéines APP humaines entre notre modèle AAV-AD et le modèle 3xTg-AD est importante ([\(Audrain, Fol et al. 2016\)](#) ; Article 2, introduction Chapitre II, modèle de la MA). D'un côté, la quantité d'APP exogène, humaine exprimée est très faible puisqu'aucune différence en APP totale n'est observée entre les animaux contrôles (AAV-PS1) et AAV-AD. De l'autre, les souris 3xTg-AD surexpriment dans leur génome plusieurs copies du gène *APP*. Il est alors observé quatre fois plus d'APP humaine que d'APP endogène ([\(Oddo, Caccamo et al. 2003\)](#)). La phosphorylation de Thr 668 est connue pour faciliter l'interaction de l'APP avec BACE chez les patients MA et les souris transgéniques exprimant de l'APP humaine ([\(Lee, Kao et al. 2003, Shin, Ogino et al. 2007\)](#)). Cependant, aucun effet de cette phosphorylation sur l'APP souris / rat n'a pour le moment encore été démontré. Il ne serait donc pas surprenant que la diminution du niveau de ce phospho-épitope observée après un traitement à la L41, ait un effet très limité sur la faible quantité d'APP humaine de nos rats AAV-AD.

Collectivement, aucune preuve ne nous permet de démontrer que l'inhibition de DYRK1A affecte la composante amyloïde. En particulier, nos résultats montrent que les seuils pathologiques en $A\beta_{1-42}$ (et en $A\beta_{1-40}$) sont franchis aussi bien chez nos rats AAV-AD placebo que nos rats AAV-AD L41 âgés de 8 mois. Le stress amyloïde étant équivalent, nous avons ensuite évalué les conséquences sur la pathologie Tau.

ii. Effets sur la composante Tau

Il est communément admis qu'un déséquilibre du rapport kinase/phosphatase des protéines Tau entraîne leurs hyperphosphorylations. Ces formes monomériques solubles hyperphosphorylées se regroupent alors dans le soma du neurone et par divers changements post-traductionnels s'associent et s'agrègent pour former des filaments hélicoïdaux en paires (PHFs), premiers constituants des DNFs ([\(Kopeikina, Hyman et al. 2012\)](#)). DYRK1A est connu pour phosphoryler les protéines Tau sur de nombreux épitopes retrouvés chez des patients atteints de MA ([\(Ferrer, Barrachina et al. 2005, Wegiel, Dowjat et al. 2008\)](#)). Dans l'étude de Branca, l'inhibiteur DYRK1-inh diminue le niveau de phospho-Ser 396. Le modèle 3xTg-AD montre dès 10 mois de nombreux neurones AT100 positifs (exprimant des PHFs). Dans cette étude, leur nombre n'est pas corrigé ce qui suggère que l'inhibition de DYRK1A intervient uniquement lors d'évènements précoces de la pathologie Tau ([\(Branca, Shaw et al. 2017\)](#)).

Notre étude confirme ces données. Nous observons en effet une réduction du niveau de phosphorylation des protéines Tau sur la Thr212 mais également sur la Thr181 et sur la Ser422. En plus de ces observations par dosage biochimique, nous observons des neurones exprimant

un marquage Tau phospho-Thr212 localisés dans le gyrus denté de l'hippocampe des rats AAV-AD de 8 mois post induction. Le marquage est alors observé au niveau du soma neuronal supportant l'idée que ces protéines Tau hyperphosphorylées soient délocalisées dans le neurone. La question de savoir comment les protéines Tau, normalement et majoritairement situées dans l'axone, s'accumulent dans le compartiment somatique du neurone a été adressée récemment. Alors qu'il est admis que l'hyperphosphorylation de Tau entraîne leurs détachements des microtubules, ces protéines sont alors incapables de passer outre le segment initial axonal (SIA). Celui-ci constitue une barrière rétrograde permettant aux protéines Tau physiologique de parcourir l'axone. D'un autre côté, il piège les formes hyperphosphorylées de Tau au niveau du soma ([Li, Kumar et al. 2011](#), [Li and Gotz 2017](#)). Pour en revenir à notre étude, nous montrons que le nombre de cellules exprimant le marquage phospho-Thr212 est augmenté chez nos rats AAV-AD placebo par rapport aux rats contrôles et aux rats AAV-AD traités à la Leucettine L41. Finalement, les rats AAV-AD présentent des cellules AT8 (Ser202 et Thr205) et AT100 (Thr212 et Thr214) positives dans le gyrus denté uniquement à partir de 30 mois post induction. Ainsi, malgré le fait que la composante amyloïde progresse de manière similaire à la condition pathologique, nous démontrons que l'inhibition de DYRK1A prévient l'hyperphosphorylation des protéines Tau et probablement l'apparition plus tardive de formes insolubles de Tau.

iii. Effets fonctionnels

L'âge auquel nous analysons nos rats dans cette étude semble être crucial dans le développement de la pathologie. A 8 mois post-induction, nous démontrons qu'un seuil d'A β ₁₋₄₂ semble suffisamment important pour induire une pathologie Tau quantifiable. Curieusement, c'est à partir de ce stade que les premiers déficits mnésiques sont observés. Ces troubles de mémoire peuvent alors être expliqués **soit par une concentration critique en A β ₁₋₄₂, soit par une quantité de protéines Tau hyperphosphorylées suffisante ou soit par la synergie des deux pathologies.**

Pour répondre à cette question, le contexte des rats AAV-AD âgés de 8 mois post-induction et traités à la Leucettine 41 semble être tout à fait approprié. Les conséquences sur la fonction cognitive des rats AAV-AD ont été analysées grâce à trois tests comportementaux déjà décrits dans ce manuscrit. La fonction motrice générale mesurée lors de l'openfield révèle aucune différence entre les animaux contrôles et AAV-AD placebo et L41, suggérant que la drogue et le mode d'administration est toléré par nos animaux. Lors de ce même test, nous n'avons montré aucun impact du traitement L41 sur le comportement émotionnel associé à l'anxiété de nos animaux AAV-AD. Alors que nous avons traité nos animaux à l'âge de 7 mois post-induction, ce

déficit émotionnel est observé dès 3 mois post-induction, ce qui suggère qu'une fois induit, ce phénotype n'est pas rétabli par un traitement stoppant le développement de la pathologie Tau. Il pourrait être la conséquence unique de la pathologie amyloïde.

Nous avons ensuite évalué la mémoire spatiale de travail et à long terme grâce respectivement aux tests du Y-maze et de la piscine de Morris. Dans les deux cas, nous démontrons que la Leucettine L41 prévient l'apparition de déficits mnésiques observés chez les rats AAV-AD. Alors que le niveau de peptide $A\beta_{1-42}$ est similaire aux conditions pathologiques, nos données suggèrent que l'inhibition de l'activité de DYRK1A prévient l'hyperphosphorylation des protéines Tau sur les résidus Thr 212, Ser 422 et Thr 181 et suffit à prévenir l'apparition de déficits mnésiques.

La toxicité de chacune des formes de Tau est largement débattue. Historiquement, il est admis que le dépôt anormal de protéines Tau insolubles peut séquestrer certaines protéines au niveau du soma neuronal et empêcher leurs fonctions biologiques. Pour certains, ces dépôts ne représentent que de simples marqueurs silencieux de la mort cellulaire, alors que pour d'autres, ils participent à un mécanisme protecteur visant à séquestrer les espèces solubles hyperphosphorylées de Tau et réduire leur diffusion d'une cellule à une autre ([Spires-Jones, Kopeikina et al. 2011](#)). Le rôle des formes solubles de Tau hyperphosphorylées est étudié de façon plus récente mais un nombre important d'études démontrent que Tau hyperphosphorylée altère le fonctionnement neuronal, ce que nous confirmons chez nos rats AAV-AD âgés de 8 mois. Plus particulièrement, une étude démontre notamment que l'injection d'oligomères de Tau, au contraire de formes monomériques ou encore fibrillaires, suffit à induire ces altérations chez la souris contrôle ([Lasagna-Reeves, Castillo-Carranza et al. 2011](#)). En plus, une étude confirme cela en utilisant des anticorps anti-oligomères de Tau (TOMA) permettant de prévenir l'apparition de déficits cognitifs sans affecter le nombre de DNFs ([Castillo-Carranza, Guerrero-Munoz et al. 2015](#)). L'état des protéines Tau présentes dans l'hippocampe de nos rats (monomériques ou oligomériques) n'a pas pu être défini et aurait nécessité de réaliser une étude par microscopie électronique. Néanmoins, l'hyperphosphorylation anormale des protéines Tau est souvent considérée comme l'élément initiant leur oligomérisation mais nécessite également d'autres modifications post-traductionnelles comme l'acétylation, l'ubiquitination, ... ([Kondo, Shahpasand et al. 2015](#), [Morris, Knudsen et al. 2015](#)).

La question de savoir comment ces formes hyperphosphorylées suffisent à produire ces phénotypes a été soulevée. D'abord, il faut reconnaître que la phosphorylation des protéines Tau n'est pas strictement pathologique. Par exemple, la phosphorylation de la Ser396 est requise pour

la LTD hippocampique ([Regan and Piers 2015](#)) alors que la phosphorylation sur la Thr205 médiée par la kinase p38 γ , améliore l'excitotoxicité induite par l'A β ([Ittner, Chua et al. 2016](#)). La principale fonction connue des protéines Tau demeure dans la stabilisation des microtubules. Ces derniers permettent un trafic axonal de molécules et organelles impliquées dans le fonctionnement neuronal et synaptique. L'hyperphosphorylation des protéines Tau soluble est connue pour affaiblir la liaison Tau-microtubules, entraînant alors la déstabilisation de ces derniers. Il en résulte la séquestration de la kinésine, une protéine motrice, dans le corps cellulaire du neurone, perturbant le transport de nombreux cargos moléculaires (incluant les vésicules synaptiques, les mitochondries, ...) vers la synapse ([Ittner, Fath et al. 2008](#)). La fonction mitochondriale semble particulièrement atteinte : plusieurs études démontrent cela par une réduction du niveau de protéines mitochondriales ainsi que de leurs activités dans le cerveau de patients atteints de MA ([Mutisya, Bowling et al. 1994](#), [Kim, Vlkolinsky et al. 2001](#)). Chez la souris transgénique exprimant une protéine Tau humaine mutée (P301L), une analyse fonctionnelle confirme ces perturbations. Dans cette étude, l'activité de la NADH déshydrogénase (complexe I), diminue avec l'âge, entraînant une perturbation de la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP ([David, Hauptmann et al. 2005](#)). Enfin, des injections d'oligomères de Tau diminuent le niveau de complexe I dans le cerveau de souris contrôles ([Lasagna-Reeves, Castillo-Carranza et al. 2011](#)). L'effet cytotoxique de l'hyperphosphorylation de protéines Tau peut également se traduire par une complète restructuration du neurone conduisant à la réduction de l'excitabilité hippocampique. En particulier, il est montré que les formes de Tau-hyperphosphorylées modifient la localisation du segment initial de l'axone en l'éloignant du soma ([Hatch, Wei et al. 2017](#)). Dans cette étude, la phosphorylation des résidus Thr231, Ser235, Ser262 et Ser356 est nécessaire pour induire ce phénotype (**Figure 58**).

Collectivement, nous démontrons que sans affecter la composante amyloïde l'inhibition de DYRK1A réduit l'hyperphosphorylation de trois épitopes de Tau ce qui est suffisant pour rétablir/prévenir l'apparition de déficits mnésiques chez le rat AAV-AD âgé de 8 mois post-induction.

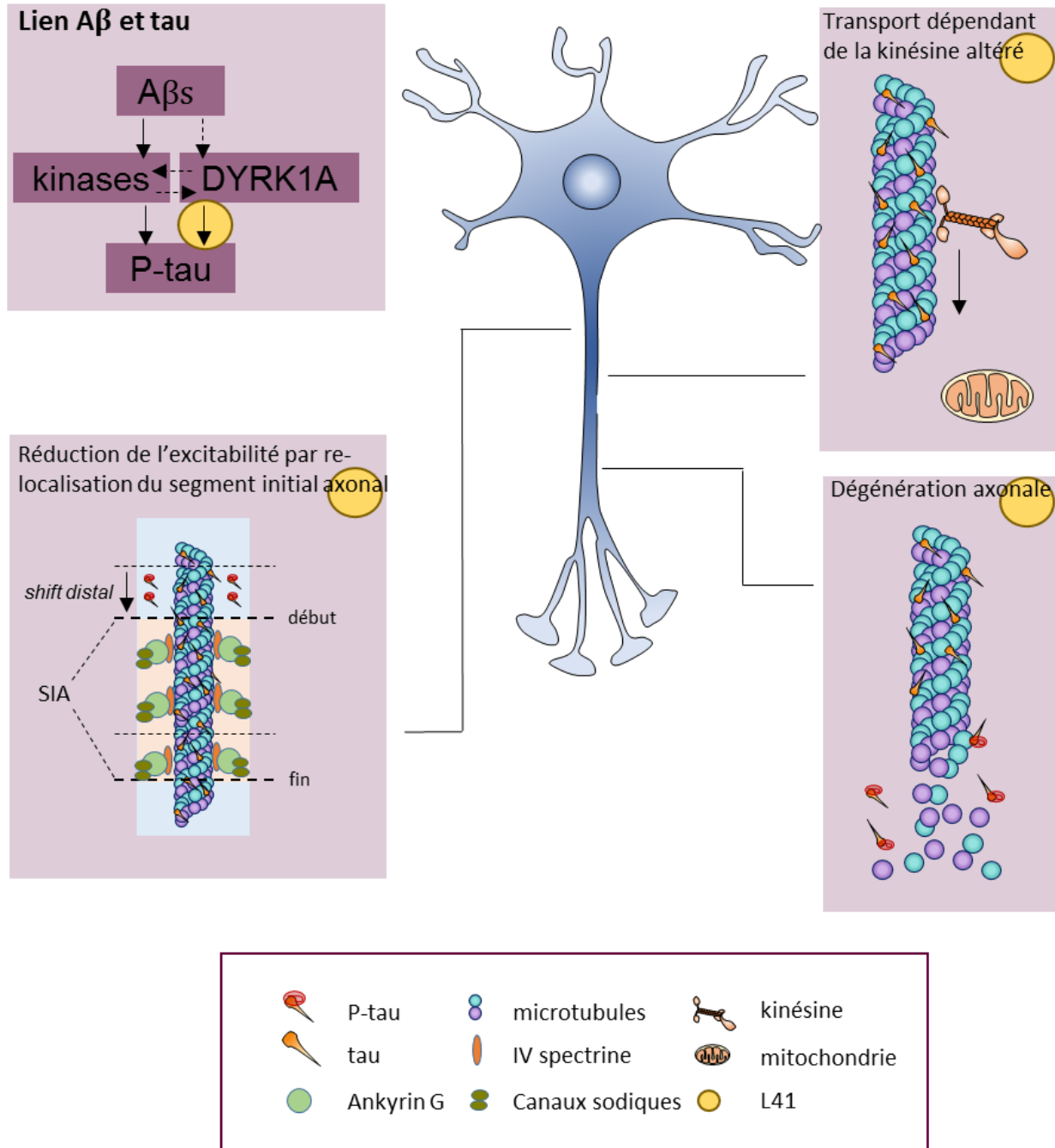


Figure 58 : Conséquences de l'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A sur la phosphorylation de Tau et la physiologie neuronale

Le lien entre l'Aβ et l'hyperphosphorylation implique l'activation de voies moléculaires, en partie, médiées par DYRK1A. L'hyperphosphorylation des protéines Tau perturbe la physiologie neuronale à divers niveaux. (i) Les protéines Tau hyperphosphorylées perturbent le transport antérograde axonal dépendant de la kinésine. Celui-ci permet l'acheminement de certains cargos moléculaires comme la mitochondrie indispensables au bon fonctionnement synaptique ; (ii) Les protéines Tau hyperphosphorylées affectent la structure de l'axone. Cela conduit à la délocalisation de son segment initial : l'excitabilité est alors réduite perturbant la décharge de

potentiels d'action ; (iii) Les protéines Tau hyperphosphorylées se détachent de leurs microtubules ce qui conduit à la déstabilisation puis à la dégénération de l'axone.

L'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A, par la Leucettine L41, réduit l'hyperphosphorylation des protéines Tau, améliorant ainsi la physiologie neuronale à de nombreux niveaux.

3. Vers une application clinique ?

Les formes solubles pathologiques d'A β et de Tau hyperphosphorylées n'agissent pas de façon isolées. Un lien de cause à effet entre ces deux éléments caractérise la pathologie Alzheimer. Selon l'hypothèse de la cascade amyloïde, la présence d'A β initierait la pathologie Tau. Cependant, cette dernière corrèle bien mieux avec le degré de symptômes cognitifs des patients atteints de MA comparé à la pathologie amyloïde ([Arriagada, Growdon et al. 1992](#), [Cho, Choi et al. 2016](#)). Cette notion est également vérifiée chez l'animal. Dès 2007, il est montré que la réduction de Tau chez des souris APP transgéniques prévient l'apparition de déficits mnésiques sans affecter les niveaux d'A β et la charge en plaques amyloïdes ([Roberson, Scearce-Levie et al. 2007](#)). Une étude plus récente utilisant les avantages de la transgénèse inductible souligne des résultats identiques ([DeVos, Corjuc et al. 2018](#)). Enfin, dans un but appliqué à une stratégie thérapeutique, il est montré que l'immunothérapie passive, basée sur l'injection d'anticorps AT8, réduit les formes solubles et insolubles de Tau chez des souris 3xTg-AD conduisant à un sauvetage des fonctions mnésiques et là encore, sans modifier les niveaux d'A β ([Walls, Ager et al. 2014](#)). Notre étude confirme cette notion. En inhibant l'activité kinase de DYRK1A, nous empêchons la pathologie Tau de progresser, prévenons l'apparition de déficits cognitifs mais sans affecter la composante amyloïde.

Alors que la pathologie Tau est stoppée, une question importante peut donc ici être posée : **est-ce que la pathologie amyloïde pourrait, à elle seule, altérer les fonctions cognitives chez l'Homme ?**

Preuves issues des modèles animaux. Pour tenter de répondre à cette question, nous pouvons d'abord citer les preuves expérimentales provenant d'études sur l'animal de laboratoire. Nous l'avons vu au cours de ce travail, de nombreux modèles murins modélisent la pathologie amyloïde ([Duyckaerts, Potier et al. 2008](#)). La présence de protéines Tau pathologiques a bien sûr été investie avec attention depuis l'hypothèse de la cascade amyloïde. Une étude fait figure d'exception et note que des formes hyperphosphorylées de Tau sont présentes chez les souris PDAPP, une lignée de souris transgénique d'amyloïdose très sévère. La présence de PHFs n'est cependant pas observée ([Masliah, Sisk et al. 2001](#)). Des neurites dystrophiques sont certes observées en quantité mais n'expriment pas un marquage des formes de Tau pathologiques chez

une souris APP x PS1. Chez la souris APP_{swE}/PS1_{ΔE9} utilisée dans l'Article 1 ([Jankowsky, Fadale et al. 2004](#)), aucun signe de pathologie Tau n'est reporté malgré la présence en quantité bien supérieure à celle observée chez l'Homme des formes Aβ solubles et insolubles. Pourtant, ces souris expriment de graves troubles de la fonction mnésique supportant l'idée que **la pathologie de l'APP peut altérer à elle seule les fonctions cognitives.**

Preuves issues des essais cliniques. Enfin, il est peut être encore plus pertinent d'analyser les résultats des premiers essais cliniques ciblant uniquement la pathologie Tau. Ils sont actuellement au nombre de 16 (contre 56 pour les stratégies ciblant l'Aβ).

<i>Cible de la Thérapie</i>	<i>Nom de la Thérapie</i>	<i>Type de Thérapie</i>	<i>Statut FDA</i>	<i>Compagnie</i>
La déstabilisation des microtubules	TPI287	molécule	Phase 1	Cortice Biosciences
L'agrégation des formes tau extracellulaires	C2N 8E12	immunothérapie passive	Phase 2	AbbVie, C2N Diagnostics
La diffusion des formes de tau fragmentées	BIB092	immunothérapie passive	Phase 2	Biogen, Bristol-Myers Squibb
Le clivage des protéines tau	ACI-35	immunothérapie active	Phase 1	Axon Neuroscience SE
L'hyperphosphorylation des protéines tau	RG7345	immunothérapie passive	stoppée	Roche
L'inhibition de protéines kinases	Tideglusib	molécule	stoppée	Zeltia Group

Tableau 3 : Exemples d'essais cliniques évaluant l'efficacité de thérapies ciblant la pathologie Tau.

Ils sont relativement récents et font suite aux essais cliniques ciblant l'Aβ dont les échecs ont conduits à renforcer l'enthousiasme vis-à-vis des approches ciblant Tau (<https://www.alzforum.org/therapeutics> ; www.clinicaltrials.gov ; introduction de cette thèse Chapitre I. VI. 4). Ces stratégies thérapeutiques sont ici classées en fonction des éléments de la pathologie Tau qu'elles ciblent (**Tableau 3**).

Les études évaluant les composés ACI-35, RG7345 et Tideglusib sont particulièrement intéressantes au regard de nos résultats montrant une réduction de l'hyperphosphorylation des protéines Tau via réduction de l'activité kinase de DYRK1A. Je peux citer ici l'étude sur le RG7345 qui a évalué l'effet d'injections d'anticorps reconnaissant les formes de Tau hyperphosphorylées sur la Ser422. Elle se base sur le fait que : l'injection de vaccin ciblant cet épitope améliore les performances cognitives chez la souris Thy-Tau22 ([Troquier, Caillierez et al. 2012](#)) et l'injection d'anticorps anti-pTauSer422 réduit la pathologie Tau chez des souris 3xTg-AD en rentrant dans les neurones et activant une dégradation dépendante des lysosomes ([Collin, Bohrmann et al. 2014](#)). Malheureusement, l'essai clinique a été stoppé dès la phase I et aucun résultat n'a été

communiqué. Le second exemple proposé ici se rapporte à l'étude ARGO de Phase 2B évaluant la molécule Tideglusib, inhibant l'activité kinase GSK3 β initiée en 2011 et stoppée en Juillet 2012. Dans cet essai, il n'a été reporté aucun effet bénéfique sur la fonction cognitive de 308 patients avec une MA légère à modérée. L'absence de résultat probant suite à ces premiers essais cliniques ciblant uniquement les formes de Tau peut s'expliquer par : (i) le fait que l'inhibition de la phosphorylation des protéines Tau (exemple de l'inhibiteur de GSK3 β) réduit également la phosphorylation physiologique des protéines Tau, indispensable au bon fonctionnement du neurone ([Regan and Piers 2015](#), [Ittner, Chua et al. 2016](#)), (ii) à l'exposition de la thérapie chez des personnes dont l'état de la MA est trop avancé si l'on se réfère au concept d'état préclinique de la MA ([Dubois, Epelbaum et al. 2018](#)) et (iii) à aucun effet sur la pathologie amyloïde.

Il est donc probable qu'une pathologie amyloïde stricte entraînera sur du long terme des troubles cognitifs chez l'Homme.

Pour conclure et pour en revenir à notre stratégie, les molécules permettant l'inhibition de la phosphorylation pathologique des protéines Tau, comme par exemple via l'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A, pourront dans le futur constituer une option pour contrer la progression de la pathologie Alzheimer. Ce type de stratégie est néanmoins en complète dépendance de tests diagnostiques qui identifieront les individus dès la phase préclinique de la MA. S'il est encore très prématuré, un réel espoir provient de tests sanguins ciblant les formes d'A β utilisé dans l'étude épidémiologique ESTHER ([Nabers, Perna et al. 2018](#)). Une fois ces tests disponibles, il faudra selon moi, associer ces thérapeutiques inhibant la phosphorylation pathologique des protéines Tau à des molécules inhibant la production d'A β ou activant leurs dégradations.

Finalement, une véritable médecine personnalisée, dépendante du stade de progression de la MA, devra être envisagée dans le futur à l'image de la prise en charge médicamenteuse des cancers. Elle consistera en un diagnostic différentiel précoce et à la prescription de traitements administrés probablement en combinatoire pendant plusieurs décennies. Les molécules utilisées devront répondre à certains critères comme le fait d'être facilement administrables, d'être bien tolérées par l'organisme sur du long-terme et de pouvoir être associées entre-elles, pour cibler plusieurs pan de la pathologie Alzheimer. Certaines molécules sont d'ores et déjà connues et pourraient potentiellement rentrer dans ce type de médecine. Quelques exemples peuvent être ici évoqués. La Donecopride, d'abord, est un agoniste partiel des récepteurs à la sérotonine (sous-type 4) (5-HT $_4$ R) et un inhibiteur de l'acétylcholinestérase (AChE) ([Lecoutey, Hedou et al. 2014](#)). Il a l'avantage d'agir de façon pléiotropique, en exerçant potentiellement des effets symptomatiques, par la restauration de la neurotransmission cholinergique, mais également

préventifs, en favorisant la production de sAPP α . Cette molécule a d'ailleurs montré des effets sur l'amyloïdose, la réactivité gliale et la fonction mnésique du modèle 5xFAD ([Baranger, Giannoni et al. 2017](#)). L'exemple de la caféine peut ensuite être développé. Cette dernière est un antagoniste non sélectif des récepteurs à l'adénosine A2A. Elle est connue pour réduire la pathologie Tau dans divers modèles transgéniques ([Batalha, Coelho et al. 2014](#), [Laurent, Burnouf et al. 2016](#)). Enfin, l'EGCG et ses dérivés (polyphénols extraits du thé vert), capables d'inhiber l'activité kinase de DYRK1A, sont également connus pour leurs propriétés anti-oxydatives et anti-inflammatoires ([Afzal, Safer et al. 2015](#)). Un essai clinique de Phase 2/3 est d'ailleurs actuellement conduit par l'Université de la Charité de Berlin chez l'Homme atteint de MA. (<https://www.alzforum.org/therapeutics/epigallocatechin-gallate-egcg>)

CONCLUSION

Mon travail de thèse permet de mieux comprendre la régulation de la protéine kinase DYRK1A et le potentiel thérapeutique de molécules pharmacologiques modulant sa fonction dans le traitement de la MA. La pathologie Alzheimer étant subdivisée en une phase préclinique suivie d'une phase clinique, ce travail a été effectué dans deux contextes pathologiques bien distincts.

La phase préclinique de la MA a été modélisée chez l'animal par transfert de gènes permettant de reproduire les événements biologiques susceptibles d'être impliqués dans les phases initiales de la MA. Des peptides A β solubles sont produits dans l'hippocampe en concentration proche de celle observée chez l'Homme atteint de MA. Ceci suffit à induire secondairement une hyperphosphorylation graduelle des protéines Tau et un déclin des capacités de mémoire à long terme. Dans ce contexte, la kinase DYRK1A semble être impliquée dans la phosphorylation pathologique des protéines Tau et constituer un lien entre les deux composantes. D'un point de vue thérapeutique, nous démontrons que des molécules diminuant son activité kinase, comme la molécule Leucettine L41, permettent de réduire les niveaux de phosphorylation des protéines Tau et de prévenir l'apparition de troubles mnésiques. Il est néanmoins à noter que la production en peptides A β n'est pas diminuée. Ainsi, l'augmentation progressive en concentration de ces derniers laisse supposer l'apparition future de lésions et symptômes dépendants d'une pathologie amyloïde unique.

La phase clinique de la MA a quant à elle été étudiée sur des biopsies d'hippocampes de patients atteints de démence Alzheimer et de souris transgéniques modélisant les lésions histologiques typiques de la pathologie amyloïde. Dans ce contexte, où il est reporté de nombreuses dérégulations, notamment calcique, nous montrons que l'homéostasie de DYRK1A est atteinte puisqu'elle subit une protéolyse médiée par la suractivation de la Calpaïne, une protéase dépendante du calcium intracellulaire. L'activité kinase de DYRK1A n'est pas affectée mais ce processus produit des formes tronquées de DYRK1A dans des cellules astrocytaires et dont la spécificité vis-à-vis de ces protéines cibles est réduite. Ainsi, les formes tronquées de DYRK1A, au contraire des formes entières, activent de nouvelles protéines, incluant au moins le régulateur de gènes pro-inflammatoires : STAT3 α . Ces formes pathologiques contribueraient alors indirectement à la neuroinflammation observée dans la MA. D'un point de vue thérapeutique, la Leucettine L41 inhibe sa protéolyse *in vivo* probablement par encombrement stérique, réduit le niveau de phosphorylation des protéines STAT3 α et par conséquent la neuroinflammation. Fonctionnellement, nous observons chez les souris, un rétablissement de la mémoire de travail et à long terme. Nos données suggèrent qu'à un stade avancé de la MA, des stratégies visant à

inhiber la protéolyse de DYRK1A semblent plus pertinentes que celles visant à inhiber son activité kinase.

En étant capable de modéliser les phases préclinique et clinique de la pathologie Alzheimer chez l'animal, j'ai donc pu identifier l'implication de deux formes distinctes de DYRK1A. En fonction du contexte biologique dans lequel se trouve cette protéine: son activité kinase ou sa protéolyse favorise l'induction de la pathologie Tau ou celle de la neuroinflammation observée dans la MA. Cette diversité (et comment elle est générée) n'est pas seulement intéressante d'un point de vue de la recherche fondamentale, puisqu'elle permet la compréhension de processus pathologiques, mais ouvre également la voie en une exploitation clinique et au design de thérapies personnalisées en fonction du stade d'avancement de la maladie.

ANNEXES

I. Publications scientifiques

1. Publications au sein de l'équipe d'accueil

i. Publiées

β APP Processing Drives Gradual Tau Pathology in an Age-Dependent Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease. Audrain M*, Souchet B*, Alves S, Fol R, Viode A, Haddjeri A, Tada S, Orefice NS, Joséphine C, Bemelmans AP, Delzescaux T, Déglon N, Hantraye P, Akwa Y, Becher F, Billard JM, Potier B, Dutar P, Cartier N, Braudeau J. *Cerebral Cortex*, Octobre 2017

Interleukin-2 improves amyloid pathology, synaptic failure and memory in Alzheimer's disease mice. Alves S, Churlaud G, Audrain M, Michaelsen-Preusse K, Fol R, Souchet B, Braudeau J, Korte M, Klitzmann D, Cartier N. *Brain*, Mars 2017

ii. Publications prochaines

Inhibition of DYRK1A proteolysis modifies its kinase specificity and rescues Alzheimer phenotype in APP/PS1 mice. Souchet B., Audrain M., Billard J.M., Dairou J., Fol R., Orefice N.S., Tada S., Gu Y., Dufayet-Chaffaud G., Limanton E., Carreaux F., Bazureau J.P., Alves S., Meijer L., Janel N., Braudeau J., Cartier N. *Brain*, under review

DYRK1A activity inhibition as an early disease-modifying therapy for Alzheimer's disease.
In preparation

Memantine limitations to cure Alzheimer's disease: despite glutamate-independent improvement of amyloid pathway, memantine fails to reduce Tau pathology. Souchet B., Audrain M., Alves S., Fol R., Tada S., Orefice NS., Hantraye P., Potier B., Dutar P., Billard JM., Cartier N., Braudeau J. *To submit*

2. Autres publications

Is it time to rethink the Alzheimer's disease drug development strategy by targeting its silent phase? Souchet B., Audrain M., Billoir B., Lecanu L., Tada S., Braudeau J. *Neural Regeneration Research*, Février 2018

Overexpression of the DYRK1A Gene (Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase 1A) Induces Alterations of the Serotonergic and Dopaminergic Processing in Murine Brain Tissues. London J, Rouch C, Bui LC, Assayag E, Souchet B, Daubigny F, Medjaoui H, Luquet S, Magnan C, Delabar JM, Dairou J, Janel N. *Molecular Neurobiology*, Mai 2017

Specific age-related molecular alterations in the cerebellum of Down syndrome mouse models. Créau N, Cabet E, Daubigny F, Souchet B, Bennai S, Delabar J. *Brain Research*, Septembre 2016

Pharmacological correction of excitation/inhibition imbalance in Down syndrome mouse models. Souchet B, Guedj F, Penke-Verdier Z, Daubigny F, Duchon A, Herault Y, Bizot JC, Janel N, Créau N, Delatour B, Delabar JM. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, Octobre 2015

Molecular rescue of DYRK1A overexpression in cystathionine beta synthase-deficient mouse brain by enriched environment combined with voluntary exercise. Souchet B, Latour A, Gu Y, Daubigny F, Paul JL, Delabar JM, Janel N. *Journal of Molecular Neuroscience*, Février 2015

Excitation/inhibition balance and learning are modified by Dyrk1a gene dosage. Souchet B, Guedj F, Sahún I, Duchon A, Daubigny F, Badel A, Yanagawa Y, Barallobre MJ, Dierssen M, Yu E, Herault Y, Arbones M, Janel N, Créau N, Delabar JM. *Neurobiology of Disease*, Septembre 2014

Prefrontal deficits in a murine model overexpressing the down syndrome candidate gene dyrk1a. Thomazeau A, Lassalle O, Iafrazi J, Souchet B, Guedj F, Janel N, Chavis P, Delabar J, Manzoni OJ. *Journal of Neuroscience*, Janvier 2014

DYRK1A: a master regulatory protein controlling brain growth. Guedj F, Pereira PL, Najas S, Barallobre MJ, Chabert C, Souchet B, Sebric C, Verney C, Herault Y, Arbones M, Delabar JM. *Neurobiology of Disease*, Avril 2012

II. Communications orales

1. Présentations poster

3rd Annual Neuroscience R&D Technologies Conference, Londres, Royaume Uni, 28 et 29 Septembre 2017, « What is the most important component for the initiation of memory decline in Alzheimer's disease patients: amyloid, Tau or synergy? ».

17^{ème} édition de la journée de l'Ecole Doctorale ED569, Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Sud, Chatenay Malabry, France, 23 Juin 2017, « A new Alzheimer's disease rat model recapitulating age-dependant Amyloid and Tau pathology ».

16^{ème} édition de la journée de l'Ecole Doctorale ED569, Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Sud, Chatenay Malabry, France, 24 Juin 2016, « Maintaining DYRK1A full length : a novel therapeutic approach to treat Alzheimer's Disease ».

2. Présentations orales

13^{ème} Journée Mondiale sur la Trisomie 21, Saint Quentin en Yvelines, France, 24 Mars 2018
« Trisomie 21 et maladie d'Alzheimer : développement d'un modèle animal pertinent pour le diagnostic et le traitement précoce de la démence Alzheimer ».

1st international DYRK Conference, St Malo, France, 28 Mars 2017 « Prevent truncated DYRK1A accumulation in astrocytes as a novel approach to treat Alzheimer's disease ».

Bibliographie

Abbott, A. (2004). "Laboratory animals: the Renaissance rat." *Nature* **428**(6982): 464-466.

Acharya, P., M. L. Segall, M. Zaiou, J. Morrow, K. H. Weisgraber, M. C. Phillips, S. Lund-Katz and J. Snow (2002). "Comparison of the stabilities and unfolding pathways of human apolipoprotein E isoforms by differential scanning calorimetry and circular dichroism." *Biochim Biophys Acta* **1584**(1): 9-19.

Adayev, T., J. Wegiel and Y. W. Hwang (2011). "Harmine is an ATP-competitive inhibitor for dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (Dyrk1A)." *Arch Biochem Biophys* **507**(2): 212-218.

Afzal, M., A. M. Safer and M. Menon (2015). "Green tea polyphenols and their potential role in health and disease." *Inflammopharmacology* **23**(4): 151-161.

Agyare, E. K., K. M. Jaruszewski, G. L. Curran, J. T. Rosenberg, S. C. Grant, V. J. Lowe, S. Ramakrishnan, A. K. Paravastu, J. F. Poduslo and K. K. Kandimalla (2014). "Engineering theranostic nanovehicles capable of targeting cerebrovascular amyloid deposits." *J Control Release* **185**: 121-129.

Alam, J. J. (2015). "Selective Brain-Targeted Antagonism of p38 MAPK α Reduces Hippocampal IL-1 β Levels and Improves Morris Water Maze Performance in Aged Rats." *J Alzheimers Dis* **48**(1): 219-227.

Altmann, A., L. Tian, V. W. Henderson and M. D. Greicius (2014). "Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease." *Ann Neurol* **75**(4): 563-573.

Alvarez, M., X. Estivill and S. de la Luna (2003). "DYRK1A accumulates in splicing speckles through a novel targeting signal and induces speckle disassembly." *J Cell Sci* **116**(Pt 15): 3099-3107.

Alves, S., G. Churlaud, M. Audrain, K. Michaelsen-Preusse, R. Fol, B. Souchet, J. Braudeau, M. Korte, D. Klatzmann and N. Cartier (2017). "Interleukin-2 improves amyloid pathology, synaptic failure and memory in Alzheimer's disease mice." *Brain* **140**(3): 826-842.

Amniai, L., P. Barbier, A. Sillen, J. M. Wieruszeski, V. Peyrot, G. Lippens and I. Landrieu (2009). "Alzheimer disease specific phosphoepitopes of Tau interfere with assembly of tubulin but not binding to microtubules." *Faseb j* **23**(4): 1146-1152.

Amouyel, P., T. Brousseau, J. C. Fruchart and J. Dallongeville (1993). "Apolipoprotein E-epsilon 4 allele and Alzheimer's disease." *Lancet* **342**(8882): 1309.

Andorfer, C., Y. Kress, M. Espinoza, R. de Silva, K. L. Tucker, Y. A. Barde, K. Duff and P. Davies (2003). "Hyperphosphorylation and aggregation of tau in mice expressing normal human tau isoforms." *J Neurochem* **86**(3): 582-590.

Arnold, S. E., B. T. Hyman, J. Flory, A. R. Damasio and G. W. Van Hoesen (1991). "The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease." *Cereb Cortex* **1**(1): 103-116.

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): 631-639.

Arron, J. R., M. M. Winslow, A. Polleri, C. P. Chang, H. Wu, X. Gao, J. R. Neilson, L. Chen, J. J. Heit, S. K. Kim, N. Yamasaki, T. Miyakawa, U. Francke, I. A. Graef and G. R. Crabtree (2006). "NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21." *Nature* **441**(7093): 595-600.

- Audrain, M., R. Fol, P. Dutar, B. Potier, J. M. Billard, J. Flament, S. Alves, M. A. Burlot, G. Dufayet-Chaffaud, A. P. Bemelmans, J. Valette, P. Hantraye, N. Deglon, N. Cartier and J. Braudeau (2016). "Alzheimer's disease-like APP processing in wild-type mice identifies synaptic defects as initial steps of disease progression." Mol Neurodegener **11**: 5.
- Audrain, M., B. Souchet, S. Alves, R. Fol, A. Viode, A. Haddjeri, S. Tada, N. S. Orefice, C. Joséphine, A.-P. Bemelmans, T. Delzescaux, N. Déglon, P. Hantraye, Y. Akwa, F. Becher, J.-M. Billard, B. Potier, P. Dutar, N. Cartier and J. Braudeau (2017). "βAPP Processing Drives Gradual Tau Pathology in an Age-Dependent Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease." Cerebral Cortex: 1-18.
- Audrain, M., B. Souchet, S. Alves, R. Fol, A. Viode, A. Haddjeri, S. Tada, N. S. Orefice, C. Josephine, A. P. Bemelmans, T. Delzescaux, N. Deglon, P. Hantraye, Y. Akwa, F. Becher, J. M. Billard, B. Potier, P. Dutar, N. Cartier and J. Braudeau (2017). "betaAPP Processing Drives Gradual Tau Pathology in an Age-Dependent Amyloid Rat Model of Alzheimer's Disease." Cereb Cortex: 1-18.
- Augustinack, J. C., A. Schneider, E. M. Mandelkow and B. T. Hyman (2002). "Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **103**(1): 26-35.
- Bain, J., H. McLauchlan, M. Elliott and P. Cohen (2003). "The specificities of protein kinase inhibitors: an update." Biochem J **371**(Pt 1): 199-204.
- Ballard, C., S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland and E. Jones (2011). "Alzheimer's disease." Lancet **377**(9770): 1019-1031.
- Baranger, K., P. Giannoni, S. D. Girard, S. Girot, F. Gaven, D. Stephan, M. Migliorati, M. Khrestchatisky, J. Bockaert, E. Marchetti-Gauthier, S. Rivera, S. Claeysen and F. S. Roman (2017). "Chronic treatments with a 5-HT4 receptor agonist decrease amyloid pathology in the entorhinal cortex and learning and memory deficits in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease." Neuropharmacology **126**: 128-141.
- Barbiero, L., L. Benussi, R. Ghidoni, A. Alberici, C. Russo, G. Schettini, S. F. Pagano, E. A. Parati, F. Mazzoli, F. Nicosia, S. Signorini, E. Feudatari and G. Binetti (2003). "BACE-2 is overexpressed in Down's syndrome." Exp Neurol **182**(2): 335-345.
- Bardou, I., H. M. Brothers, R. M. Kaercher, S. C. Hopp and G. L. Wenk (2013). "Differential effects of duration and age on the consequences of neuroinflammation in the hippocampus." Neurobiol Aging **34**(10): 2293-2301.
- Batalha, V. L., J. E. Coelho, Y. Baqi, E. Malik, E. Mariciniak, S. Parrot, A. Van der Jeugd, E. Faivre, V. Flaten, C. Ledent, R. D'Hooge, N. Sergeant, M. Hamdane, S. Humez, C. E. Muller, L. V. Lopes, L. Buee, D. Blum, C. Laurent, S. Eddarkaoui, M. Derisbourg, A. Leboucher, D. Demeyer, S. Carrier, M. Schneider, M. Hamdane, C. E. Muller, L. Buee and D. Blum (2014). "Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology." Mol Psychiatry **35**(9): 2079-2090.
- Bates, K. A., G. Verdile, Q. X. Li, D. Ames, P. Hudson, C. L. Masters and R. N. Martins (2009). "Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid-beta peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests." Mol Psychiatry **14**(5): 469-486.
- Becker, W., Y. Weber, K. Wetzel, K. Eirimbter, F. J. Tejedor and H. G. Joost (1998). "Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases." J Biol Chem **273**(40): 25893-25902.
- Belza, M. G. and H. Urich (1986). "Cerebral amyloid angiopathy in Down's syndrome." Clin Neuropathol **5**(6): 257-260.

Ben Haim, L. (2015). "The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases." J Neurosci **35**(6): 2817-2829.

Bennett, D. A., R. S. Wilson, J. A. Schneider, D. A. Evans, N. T. Aggarwal, S. E. Arnold, E. J. Cochran, E. Berry-Kravis and J. L. Bienias (2003). "Apolipoprotein E epsilon4 allele, AD pathology, and the clinical expression of Alzheimer's disease." Neurology **60**(2): 246-252.

Bezprozvanny, I. and M. P. Mattson (2008). "Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease." Trends Neurosci **31**(9): 454-463.

Billings, L. M., S. Oddo, K. N. Green, J. L. McGaugh and F. M. LaFerla (2005). "Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice." Neuron **45**(5): 675-688.

Bisht, K., K. P. Sharma, C. Lecours, M. G. Sanchez, H. El Hajj, G. Milior, A. Olmos-Alonso, D. Gomez-Nicola, G. Luheshi, L. Vallieres, I. Branchi, L. Maggi, C. Limatola, O. Butovsky and M. E. Tremblay (2016). "Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states." Glia **64**(5): 826-839.

Braak, H. and E. Braak (1991). "Neuropathological staging of Alzheimer-related changes." Acta Neuropathol **82**(4): 239-259.

Brahic, M., L. Bousset, G. Bieri, R. Melki and A. D. Gitler (2016). "Axonal transport and secretion of fibrillar forms of alpha-synuclein, Abeta42 peptide and HTTExon 1." Acta Neuropathol **131**(4): 539-548.

Branca, C., D. M. Shaw, R. Belfiore, V. Gokhale, A. Y. Shaw, C. Foley, B. Smith, C. Hulme, T. Dunckley, B. Meechoovet, A. Caccamo and S. Oddo (2017). "Dyrk1 inhibition improves Alzheimer's disease-like pathology." Aging Cell.

Brooijmans, N., Y. W. Chang, D. Mobilio, R. A. Denny and C. Humblet (2010). "An enriched structural kinase database to enable kinome-wide structure-based analyses and drug discovery." Protein Sci **19**(4): 763-774.

Brooker, D., J. La Fontaine, S. Evans, J. Bray and K. Saad (2014). "Public health guidance to facilitate timely diagnosis of dementia: Alzheimer's COoperative Valuation in Europe recommendations." Int J Geriatr Psychiatry **29**(7): 682-693.

Bu, X. L., Y. Xiang, W. S. Jin, J. Wang, L. L. Shen, Z. L. Huang, K. Zhang, Y. H. Liu, F. Zeng, J. H. Liu, H. L. Sun, Z. Q. Zhuang, S. H. Chen, X. Q. Yao, B. Giunta, Y. C. Shan, J. Tan, X. W. Chen, Z. F. Dong, H. D. Zhou, X. F. Zhou, W. Song and Y. J. Wang (2017). "Blood-derived amyloid-beta protein induces Alzheimer's disease pathologies." Mol Psychiatry.

Buescher, J. L. and C. J. Phiel (2010). "A noncatalytic domain of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is essential for activity." J Biol Chem **285**(11): 7957-7963.

Bui, L. C., L. Tabouy, F. Busi, J. M. Dupret, N. Janel, C. Planque, J. M. Delabar, F. Rodrigues-Lima and J. Dairou (2014). "A high-performance liquid chromatography assay for Dyrk1a, a Down syndrome-associated kinase." Anal Biochem **449**: 172-178.

Burda, J. E. and M. V. Sofroniew (2014). "Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease." Neuron **81**(2): 229-248.

Burlot, M. A., J. Braudeau, K. Michaelsen-Preusse, B. Potier, S. Ayciriex, J. Varin, B. Gautier, F. Djelti, M. Audrain, L. Dauphinot, F. J. Fernandez-Gomez, R. Caillierez, O. Laprevote, I. Bieche, N. Auzeil, M. C. Potier, P. Dutar, M. Korte, L. Buee, D. Blum and N. Cartier (2015). "Cholesterol 24-hydroxylase defect is

implicated in memory impairments associated with Alzheimer-like Tau pathology." Hum Mol Genet **24**(21): 5965-5976.

Busciglio, J., D. H. Gabuzda, P. Matsudaira and B. A. Yankner (1993). "Generation of beta-amyloid in the secretory pathway in neuronal and nonneuronal cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 2092-2096.

Bushman, D. M., G. E. Kaeser, B. Siddoway, J. W. Westra, R. R. Rivera, S. K. Rehen, Y. C. Yung and J. Chun (2015). "Genomic mosaicism with increased amyloid precursor protein (APP) gene copy number in single neurons from sporadic Alzheimer's disease brains." Elife **4**.

Cai, X. D., T. E. Golde and S. G. Younkin (1993). "Release of excess amyloid beta protein from a mutant amyloid beta protein precursor." Science **259**(5094): 514-516.

Carter, M. and J. Shieh (2015). Guide to Research Techniques in Neuroscience. 2nd Edition, Elsevier.

Cascella, M. and S. Bimonte (2017). "The efficacy of Epigallocatechin-3-gallate (green tea) in the treatment of Alzheimer's disease: an overview of pre-clinical studies and translational perspectives in clinical practice." **12**: 36.

Caspersen, C., N. Wang, J. Yao, A. Sosunov, X. Chen, J. W. Lustbader, H. W. Xu, D. Stern, G. McKhann and S. D. Yan (2005). "Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease." Faseb j **19**(14): 2040-2041.

Castillo-Carranza, D. L., M. J. Guerrero-Munoz, U. Sengupta, C. Hernandez, A. D. Barrett, K. Dineley and R. Kaye (2015). "Tau immunotherapy modulates both pathological tau and upstream amyloid pathology in an Alzheimer's disease mouse model." J Neurosci **35**(12): 4857-4868.

Cattaneo, A., N. Cattane, S. Galluzzi, S. Provasi, N. Lopizzo, C. Festari, C. Ferrari, U. P. Guerra, B. Paghera, C. Muscio, A. Bianchetti, G. D. Volta, M. Turla, M. S. Cotelli, M. Gennuso, A. Prella, O. Zanetti, G. Lussignoli, D. Mirabile, D. Bellandi, S. Gentile, G. Belotti, D. Villani, T. Harach, T. Bolmont, A. Padovani, M. Boccardi and G. B. Frisoni (2017). "Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly." Neurobiol Aging **49**: 60-68.

Chainay, H. (2005). "Déficit de la mémoire sémantique dans la démence de type Alzheimer." Les troubles de la mémoire dans la maladie d'Alzheimer. Marseille, France : Solal. **Dans Ergis, A.M., Gély-Nargeot, M.C. et Van der Linden, M. (dir.)**.

Chen, H. and S. E. Antonarakis (1997). "Localisation of a human homologue of the Drosophila mnb and rat Dyrk genes to chromosome 21q22.2." Hum Genet **99**(2): 262-265.

Chen, Y., Z. Liang, J. Blanchard, C. L. Dai, S. Sun, M. H. Lee, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, F. Liu and C. X. Gong (2013). "A non-transgenic mouse model (icv-STZ mouse) of Alzheimer's disease: similarities to and differences from the transgenic model (3xTg-AD mouse)." Mol Neurobiol **47**(2): 711-725.

Cheon, M. S., M. Bajo, S. H. Kim, J. O. Claudio, A. K. Stewart, D. Patterson, W. D. Kruger, H. Kondoh and G. Lubec (2003). "Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down syndrome brain: challenging the gene dosage effect hypothesis (Part II)." Amino Acids **24**(1-2): 119-125.

Chiba, T., M. Yamada, J. Sasabe, K. Terashita, M. Shimoda, M. Matsuoka and S. Aiso (2009). "Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons." Mol Psychiatry **14**(2): 206-222.

Cho, H., J. Y. Choi, M. S. Hwang, Y. J. Kim, H. M. Lee, H. S. Lee, J. H. Lee, Y. H. Ryu, M. S. Lee and C. H. Lyoo (2016). "In vivo cortical spreading pattern of tau and amyloid in the Alzheimer disease spectrum." Ann Neurol **80**(2): 247-258.

Chumakov, I., P. Rigault, S. Guillou, P. Ougen, A. Billaut, G. Guasconi, P. Gervy, I. LeGall, P. Soularue, L. Grinas and et al. (1992). "Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q." Nature **359**(6394): 380-387.

Citron, M., T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A. Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg and D. J. Selkoe (1992). "Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production." Nature **360**(6405): 672-674.

Clavaguera, F., T. Bolmont, R. A. Crowther, D. Abramowski, S. Frank, A. Probst, G. Fraser, A. K. Stalder, M. Beibel, M. Staufenbiel, M. Jucker, M. Goedert and M. Tolnay (2009). "Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain." Nat Cell Biol **11**(7): 909-913.

Clifford, P. M., S. Zarrabi, G. Siu, K. J. Kinsler, M. C. Kosciuk, V. Venkataraman, M. R. D'Andrea, S. Dinsmore and R. G. Nagele (2007). "Abeta peptides can enter the brain through a defective blood-brain barrier and bind selectively to neurons." Brain Res **1142**: 223-236.

Collin, L., B. Bohrmann, U. Gopfert, K. Oroszlan-Szovik, L. Ozmen and F. Gruninger (2014). "Neuronal uptake of tau/pS422 antibody and reduced progression of tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease." Brain **137**(Pt 10): 2834-2846.

Coppus, A., H. Evenhuis, G. J. Verberne, F. Visser, P. van Gool, P. Eikelenboom and C. van Duijn (2006). "Dementia and mortality in persons with Down's syndrome." J Intellect Disabil Res **50**(Pt 10): 768-777.

Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines and M. A. Pericak-Vance (1993). "Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families." Science **261**(5123): 921-923.

Coutadeur, S., H. Benyamine, L. Delalonde, C. de Oliveira, B. Leblond, A. Foucourt, T. Besson, A. S. Casagrande, T. Taverne, A. Girard, M. P. Pando and L. Desire (2015). "A novel DYRK1A (Dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A) inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease: effect on Tau and amyloid pathologies in vitro." J Neurochem **133**(3): 440-451.

Cummings, J., G. Lee, T. Mortsdorf, A. Ritter and K. Zhong (2017). "Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017." Alzheimers Dement (N Y) **3**(3): 367-384.

DaRocha-Souto, B., T. C. Scotton, M. Coma, A. Serrano-Pozo, T. Hashimoto, L. Sereno, M. Rodriguez, B. Sanchez, B. T. Hyman and T. Gomez-Isla (2011). "Brain oligomeric beta-amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice." J Neuropathol Exp Neurol **70**(5): 360-376.

David, D. C., S. Hauptmann, I. Scherping, K. Schuessel, U. Keil, P. Rizzu, R. Ravid, S. Drose, U. Brandt, W. E. Muller, A. Eckert and J. Gotz (2005). "Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice." J Biol Chem **280**(25): 23802-23814.

de Calignon, A., L. M. Fox, R. Pitstick, G. A. Carlson, B. J. Bacskai, T. L. Spires-Jones and B. T. Hyman (2010). "Caspase activation precedes and leads to tangles." Nature **464**(7292): 1201-1204.

de Calignon, A., M. Polydoro, M. Suarez-Calvet, C. William, D. H. Adamowicz, K. J. Kopeikina, R. Pitstick, N. Sahara, K. H. Ashe, G. A. Carlson, T. L. Spires-Jones and B. T. Hyman (2012). "Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease." Neuron **73**(4): 685-697.

de la Torre, R., S. de Sola, G. Hernandez, M. Farre, J. Pujol, J. Rodriguez, J. M. Espadaler, K. Langohr, A. Cuenca-Royo, A. Principe, L. Xicota, N. Janel, S. Catuara-Solarz, G. Sanchez-Benavides, H. Blehaut, I. Duenas-Espin, L. Del Hoyo, B. Benejam, L. Blanco-Hinojo, S. Videla, M. Fito, J. M. Delabar and M. Dierssen (2016). "Safety and efficacy of cognitive training plus epigallocatechin-3-gallate in young adults with Down's syndrome (TESDAD): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial." Lancet Neurol **15**(8): 801-810.

de Leeuw, F. E., F. Richard, J. C. de Groot, C. M. van Duijn, A. Hofman, J. Van Gijn and M. M. Breteler (2004). "Interaction between hypertension, apoE, and cerebral white matter lesions." Stroke **35**(5): 1057-1060.

Deane, R., S. Du Yan, R. K. Subramanian, B. LaRue, S. Jovanovic, E. Hogg, D. Welch, L. Manness, C. Lin, J. Yu, H. Zhu, J. Ghiso, B. Frangione, A. Stern, A. M. Schmidt, D. L. Armstrong, B. Arnold, B. Liliensiek, P. Nawroth, F. Hofman, M. Kindy, D. Stern and B. Zlokovic (2003). "RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain." Nat Med **9**(7): 907-913.

Debdab, M., F. Carreaux, S. Renault, M. Soundararajan, O. Fedorov, P. Filippakopoulos, O. Lozach, L. Babault, T. Tahtouh, B. Baratte, Y. Ogawa, M. Hagiwara, A. Eisenreich, U. Rauch, S. Knapp, L. Meijer and J. P. Bazureau (2011). "Leucettines, a class of potent inhibitors of cdc2-like kinases and dual specificity, tyrosine phosphorylation regulated kinases derived from the marine sponge leucettamine B: modulation of alternative pre-RNA splicing." J Med Chem **54**(12): 4172-4186.

DeKosky, S. T. and S. W. Scheff (1990). "Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity." Ann Neurol **27**(5): 457-464.

del Ser, T., K. C. Steinwachs, H. J. Gertz, M. V. Andres, B. Gomez-Carrillo, M. Medina, J. A. Vericat, P. Redondo, D. Fleet and T. Leon (2013). "Treatment of Alzheimer's disease with the GSK-3 inhibitor tideglusib: a pilot study." J Alzheimers Dis **33**(1): 205-215.

Delabar, J. M., D. Theophile, Z. Rahmani, Z. Chettouh, J. L. Blouin, M. Prieur, B. Noel and P. M. Sinet (1993). "Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21." Eur J Hum Genet **1**(2): 114-124.

DeVos, S. L., B. T. Corjuc, C. Commins, S. Dujardin, R. N. Bannon, D. Corjuc, B. D. Moore, R. E. Bennett, M. Jorfi, J. A. Gonzales, P. M. Dooley, A. D. Roe, R. Pitstick, D. Irimia, M. P. Frosch, G. A. Carlson and B. T. Hyman (2018). "Tau reduction in the presence of amyloid-beta prevents tau pathology and neuronal death in vivo." Brain.

Di Filippo, M., P. Sarchielli, B. Picconi and P. Calabresi (2008). "Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel, immune-centred, therapeutic approach to neurological disorders." Trends Pharmacol Sci **29**(8): 402-412.

Dickey, C. A., J. Dunmore, B. Lu, J. W. Wang, W. C. Lee, A. Kamal, F. Burrows, C. Eckman, M. Hutton and L. Petrucelli (2006). "HSP induction mediates selective clearance of tau phosphorylated at proline-directed Ser/Thr sites but not KXGS (MARK) sites." Faseb j **20**(6): 753-755.

Dixit, R., J. L. Ross, Y. E. Goldman and E. L. Holzbaur (2008). "Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau." Science **319**(5866): 1086-1089.

Do Carmo, S. and A. C. Cuello (2013). "Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats." Mol Neurodegener **8**: 37.

Donovan, N. J., J. J. Locascio, G. A. Marshall, J. Gatchel, B. J. Hanseeuw, D. M. Rentz, K. A. Johnson and R. A. Sperling (2018). "Longitudinal Association of Amyloid Beta and Anxious-Depressive Symptoms in Cognitively Normal Older Adults." Am J Psychiatry: appiajp201717040442.

Doody, R. S., R. Raman, M. Farlow, T. Iwatsubo, B. Vellas, S. Joffe, K. Kieburtz, F. He, X. Sun, R. G. Thomas, P. S. Aisen, E. Siemers, G. Sethuraman and R. Mohs (2013). "A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease." N Engl J Med **369**(4): 341-350.

Dowjat, W. K., T. Adayev, I. Kuchna, K. Nowicki, S. Palmiello, Y. W. Hwang and J. Wegiel (2007). "Trisomy-driven overexpression of DYRK1A kinase in the brain of subjects with Down syndrome." Neurosci Lett **413**(1): 77-81.

Dubal, D. B. and P. M. Wise (2002). "Estrogen and neuroprotection: from clinical observations to molecular mechanisms." Dialogues Clin Neurosci **4**(2): 149-161.

Dubois, B., S. Epelbaum, F. Nyasse, H. Bakardjian, G. Gagliardi, O. Uspenskaya, M. Houot, S. Lista, F. Cacciamani, M. C. Potier, A. Bertrand, F. Lamari, H. Benali, J. F. Mangin, O. Colliot, R. Genthon, M. O. Habert and H. Hampel (2018). "Cognitive and neuroimaging features and brain beta-amyloidosis in individuals at risk of Alzheimer's disease (INSIGHT-preAD): a longitudinal observational study." Lancet Neurol.

Dubois, B., H. H. Feldman, C. Jacova, S. T. Dekosky, P. Barberger-Gateau, J. Cummings, A. Delacourte, D. Galasko, S. Gauthier, G. Jicha, K. Meguro, J. O'Brien, F. Pasquier, P. Robert, M. Rossor, S. Salloway, Y. Stern, P. J. Visser and P. Scheltens (2007). "Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria." Lancet Neurol **6**(8): 734-746.

Dubois, B., H. H. Feldman, C. Jacova, H. Hampel, J. L. Molinuevo, K. Blennow, S. T. DeKosky, S. Gauthier, D. Selkoe, R. Bateman, S. Cappa, S. Crutch, S. Engelborghs, G. B. Frisoni, N. C. Fox, D. Galasko, M. O. Habert, G. A. Jicha, A. Nordberg, F. Pasquier, G. Rabinovici, P. Robert, C. Rowe, S. Salloway, M. Sarazin, S. Epelbaum, L. C. de Souza, B. Vellas, P. J. Visser, L. Schneider, Y. Stern, P. Scheltens and J. L. Cummings (2014). "Advancing research diagnostic criteria for Alzheimer's disease: the IWG-2 criteria." Lancet Neurol **13**(6): 614-629.

Dubois, B., H. Hampel, H. H. Feldman, P. Scheltens, P. Aisen, S. Andrieu, H. Bakardjian, H. Benali, L. Bertram, K. Blennow, K. Broich, E. Cavedo, S. Crutch, J. F. Dartigues, C. Duyckaerts, S. Epelbaum, G. B. Frisoni, S. Gauthier, R. Genthon, A. A. Gouw, M. O. Habert, D. M. Holtzman, M. Kivipelto, S. Lista, J. L. Molinuevo, S. E. O'Bryant, G. D. Rabinovici, C. Rowe, S. Salloway, L. S. Schneider, R. Sperling, M. Teichmann, M. C. Carrillo, J. Cummings and C. R. Jack, Jr. (2016). "Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria." Alzheimers Dement **12**(3): 292-323.

Duyckaerts, C., M. C. Potier and B. Delatour (2008). "Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences." Acta Neuropathol **115**(1): 5-38.

Echeverria, V., A. Ducatenzeiler, L. Alhonen, J. Janne, S. M. Grant, F. Wandosell, A. Muro, F. Baralle, H. Li, K. Duff, M. Szyf and A. C. Cuervo (2004). "Rat transgenic models with a phenotype of intracellular Abeta accumulation in hippocampus and cortex." J Alzheimers Dis **6**(3): 209-219.

Edison, P., H. A. Archer, R. Hinz, A. Hammers, N. Pavese, Y. F. Tai, G. Hotton, D. Cutler, N. Fox, A. Kennedy, M. Rossor and D. J. Brooks (2007). "Amyloid, hypometabolism, and cognition in Alzheimer disease: an [11C]PIB and [18F]FDG PET study." Neurology **68**(7): 501-508.

Epelbaum, S., R. Genthon, E. Cavedo, M. O. Habert, F. Lamari, G. Gagliardi, S. Lista, M. Teichmann, H. Bakardjian, H. Hampel and B. Dubois (2017). "Preclinical Alzheimer's disease: A systematic review of the cohorts underlying the concept." Alzheimers Dement **13**(4): 454-467.

Erten-Lyons, D., H. H. Dodge, R. Woltjer, L. C. Silbert, D. B. Howieson, P. Kramer and J. A. Kaye (2013). "Neuropathologic basis of age-associated brain atrophy." JAMA Neurol **70**(5): 616-622.

Esiri, M. M. (2007). "Ageing and the brain." J Pathol **211**(2): 181-187.

Farrer, L. A., L. A. Cupples, J. L. Haines, B. Hyman, W. A. Kukull, R. Mayeux, R. H. Myers, M. A. Pericak-Vance, N. Risch and C. M. van Duijn (1997). "Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium." Jama **278**(16): 1349-1356.

Ferreira, A. and E. H. Bigio (2011). "Calpain-mediated tau cleavage: a mechanism leading to neurodegeneration shared by multiple tauopathies." Mol Med **17**(7-8): 676-685.

Ferreira, S. T., M. V. Lourenco, M. M. Oliveira and F. G. De Felice (2015). "Soluble amyloid-beta oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease." Front Cell Neurosci **9**: 191.

Ferrer, I., M. Barrachina, B. Puig, M. Martinez de Lagran, E. Marti, J. Avila and M. Dierssen (2005). "Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models." Neurobiol Dis **20**(2): 392-400.

Finch, C. E. (2003). "The biology of aging in model organisms." Alzheimer Dis Assoc Disord **17 Suppl 2**: S39-41.

Finch, C. E. and R. M. Sapolsky (1999). "The evolution of Alzheimer disease, the reproductive schedule, and apoE isoforms." Neurobiol Aging **20**(4): 407-428.

Fischer, D., M. D. Mukrasch, J. Biernat, S. Bibow, M. Blackledge, C. Griesinger, E. Mandelkow and M. Zweckstetter (2009). "Conformational changes specific for pseudophosphorylation at serine 262 selectively impair binding of tau to microtubules." Biochemistry **48**(42): 10047-10055.

Flood, D. G., Y. G. Lin, D. M. Lang, S. P. Trusko, J. D. Hirsch, M. J. Savage, R. W. Scott and D. S. Howland (2009). "A transgenic rat model of Alzheimer's disease with extracellular Abeta deposition." Neurobiol Aging **30**(7): 1078-1090.

Fol, R., J. Braudeau, S. Ludewig, T. Abel, S. W. Weyer, J. P. Roederer, F. Brod, M. Audrain, A. P. Bemelmans, C. J. Buchholz, M. Korte, N. Cartier and U. C. Muller (2015). "Viral gene transfer of APPalpha rescues synaptic failure in an Alzheimer's disease mouse model." Acta Neuropathol.

Folkesson, R., K. Malkiewicz, E. Kloskowska, T. Nilsson, E. Popova, N. Bogdanovic, U. Ganten, D. Ganten, M. Bader, B. Winblad and E. Benedikz (2007). "A transgenic rat expressing human APP with the Swedish Alzheimer's disease mutation." Biochem Biophys Res Commun **358**(3): 777-782.

Folstein, M. F., S. E. Folstein and P. R. McHugh (1975). ""Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician." J Psychiatr Res **12**(3): 189-198.

Forny-Germano, L., N. M. Lyra e Silva, A. F. Batista, J. Brito-Moreira and M. Gralle (2014). "Alzheimer's disease-like pathology induced by amyloid-beta oligomers in nonhuman primates." **34**(41): 13629-13643.

Frank, S., G. J. Burbach, M. Bonin, M. Walter, W. Streit, I. Bechmann and T. Deller (2008). "TREM2 is upregulated in amyloid plaque-associated microglia in aged APP23 transgenic mice." Glia **56**(13): 1438-1447.

Garcia-Alloza, M., E. M. Robbins, S. X. Zhang-Nunes, S. M. Purcell, R. A. Betensky, S. Raju, C. Prada, S. M. Greenberg, B. J. Bacskai and M. P. Frosch (2006). "Characterization of amyloid deposition in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer disease." Neurobiol Dis **24**(3): 516-524.

Ghisso, J., M. Shayo, M. Calero, D. Ng, Y. Tomidokoro, S. Gandy, A. Rostagno and B. Frangione (2004). "Systemic catabolism of Alzheimer's Abeta40 and Abeta42." J Biol Chem **279**(44): 45897-45908.

Giannakopoulos, P., F. R. Herrmann, T. Bussiere, C. Bouras, E. Kovari, D. P. Perl, J. H. Morrison, G. Gold and P. R. Hof (2003). "Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease." Neurology **60**(9): 1495-1500.

Gimenez-Llort, L., G. Rivera-Hernandez, M. Marin-Argany, J. L. Sanchez-Quesada and S. Villegas (2013). "Early intervention in the 3xTg-AD mice with an amyloid beta-antibody fragment ameliorates first hallmarks of Alzheimer disease." MAbs **5**(5): 665-677.

Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-890.

Goate, A., M. C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, L. James and et al. (1991). "Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease." Nature **349**(6311): 704-706.

Gockler, N., G. Jofre, C. Papadopoulos, U. Soppa, F. J. Tejedor and W. Becker (2009). "Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation." Febs j **276**(21): 6324-6337.

Godeluck, S. (2018). "Les médicaments contre Alzheimer ne seront plus remboursés à compter du 1er août."

Goldgaber, D., M. I. Lerman, O. W. McBride, U. Saffiotti and D. C. Gajdusek (1987). "Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease." Science **235**(4791): 877-880.

Gomez-Isla, T., R. Hollister, H. West, S. Mui, J. H. Growdon, R. C. Petersen, J. E. Parisi and B. T. Hyman (1997). "Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease." Ann Neurol **41**(1): 17-24.

Goode, B. L. and S. C. Feinstein (1994). "Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau." J Cell Biol **124**(5): 769-782.

Gotz, J., F. Chen, J. van Dorpe and R. M. Nitsch (2001). "Formation of neurofibrillary tangles in P301 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils." Science **293**(5534): 1491-1495.

Gotz, J. and L. M. Ittner (2008). "Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia." Nat Rev Neurosci **9**(7): 532-544.

Gotz, J., A. Probst, M. G. Spillantini, T. Schafer, R. Jakes, K. Burki and M. Goedert (1995). "Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform." Embo j **14**(7): 1304-1313.

Gouras, G. K., J. Tsai, J. Naslund, B. Vincent, M. Edgar, F. Checler, J. P. Greenfield, V. Haroutunian, J. D. Buxbaum, H. Xu, P. Greengard and N. R. Relkin (2000). "Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain." Am J Pathol **156**(1): 15-20.

Greenberg, S. G., P. Davies, J. D. Schein and L. I. Binder (1992). "Hydrofluoric acid-treated tau PHF proteins display the same biochemical properties as normal tau." J Biol Chem **267**(1): 564-569.

Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, Y. C. Tung, M. Quinlan, H. M. Wisniewski and L. I. Binder (1986). "Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(13): 4913-4917.

- Guedj, F., P. L. Pereira, S. Najas, M. J. Barallobre, C. Chabert, B. Souchet, C. Sebrie, C. Verney, Y. Herault, M. Arbones and J. M. Delabar (2012). "DYRK1A: a master regulatory protein controlling brain growth." Neurobiol Dis **46**(1): 190-203.
- Guedj, F., C. Sebrie, I. Rivals, A. Ledru, E. Paly, J. C. Bizot, D. Smith, E. Rubin, B. Gillet, M. Arbones and J. M. Delabar (2009). "Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A." PLoS One **4**(2): e4606.
- Guerreiro, R., A. Wojtas, J. Bras, M. Carrasquillo, E. Rogaeva, E. Majounie, C. Cruchaga, C. Sassi, J. S. Kauwe, S. Younkin, L. Hazrati, J. Collinge, J. Pocock, T. Lashley, J. Williams, J. C. Lambert, P. Amouyel, A. Goate, R. Rademakers, K. Morgan, J. Powell, P. St George-Hyslop, A. Singleton and J. Hardy (2013). "TREM2 variants in Alzheimer's disease." N Engl J Med **368**(2): 117-127.
- Guimera, J., C. Casas, X. Estivill and M. Pritchard (1999). "Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome." Genomics **57**(3): 407-418.
- Guimera, J., C. Casas, C. Pucharcos, A. Solans, A. Domenech, A. M. Planas, J. Ashley, M. Lovett, X. Estivill and M. A. Pritchard (1996). "A human homologue of Drosophila minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region." Hum Mol Genet **5**(9): 1305-1310.
- Gyure, K. A., R. Durham, W. F. Stewart, J. E. Smialek and J. C. Troncoso (2001). "Intraneuronal abeta-amyloid precedes development of amyloid plaques in Down syndrome." Arch Pathol Lab Med **125**(4): 489-492.
- Haass, C. and D. J. Selkoe (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 101-112.
- Hamelin, L., J. Lagarde, G. Dorothee, C. Leroy, M. Labit, R. A. Comley, L. C. de Souza, H. Corne, L. Dauphinot, M. Bertoux, B. Dubois, P. Gervais, O. Colliot, M. C. Potier, M. Bottlaender and M. Sarazin (2016). "Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging." Brain **139**(Pt 4): 1252-1264.
- Hammerle, B., C. Elizalde, J. Galceran, W. Becker and F. J. Tejedor (2003). "The MNB/DYRK1A protein kinase: neurobiological functions and Down syndrome implications." J Neural Transm Suppl(67): 129-137.
- Hammerle, B., C. Elizalde and F. J. Tejedor (2008). "The spatio-temporal and subcellular expression of the candidate Down syndrome gene Mnb/Dyrk1A in the developing mouse brain suggests distinct sequential roles in neuronal development." Eur J Neurosci **27**(5): 1061-1074.
- Hanks, S. K. and T. Hunter (1995). "Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification." Faseb j **9**(8): 576-596.
- Hanks, S. K. and A. M. Quinn (1991). "Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members." Methods Enzymol **200**: 38-62.
- Hanks, S. K., A. M. Quinn and T. Hunter (1988). "The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains." Science **241**(4861): 42-52.
- Hardingham, G. E. and H. Bading (2010). "Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders." Nat Rev Neurosci **11**(10): 682-696.

Hardy, J. and D. Allsop (1991). "Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease." Trends Pharmacol Sci **12**(10): 383-388.

Hardy, J. and D. J. Selkoe (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**(5580): 353-356.

Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." Science **256**(5054): 184-185.

Hartmann, T., S. C. Bieger, B. Bruhl, P. J. Tienari, N. Ida, D. Allsop, G. W. Roberts, C. L. Masters, C. G. Dotti, K. Unsicker and K. Beyreuther (1997). "Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides." Nat Med **3**(9): 1016-1020.

Hashiguchi, M., K. Sobue and H. K. Paudel (2000). "14-3-3zeta is an effector of tau protein phosphorylation." J Biol Chem **275**(33): 25247-25254.

Hatch, R. J., Y. Wei, D. Xia and J. Gotz (2017). "Hyperphosphorylated tau causes reduced hippocampal CA1 excitability by relocating the axon initial segment." Acta Neuropathol **133**(5): 717-730.

Haure-Mirande, J. V., M. Audrain, T. Fanutza, S. H. Kim, W. L. Klein, C. Glabe, B. Readhead, J. T. Dudley, R. D. Blitzer, M. Wang, B. Zhang, E. E. Schadt, S. Gandy and M. E. Ehrlich (2017). "Deficiency of TYROBP, an adapter protein for TREM2 and CR3 receptors, is neuroprotective in a mouse model of early Alzheimer's pathology." Acta Neuropathol.

Head, E., I. T. Lott, D. Patterson, E. Doran and R. J. Haier (2007). "Possible compensatory events in adult Down syndrome brain prior to the development of Alzheimer disease neuropathology: targets for nonpharmacological intervention." J Alzheimers Dis **11**(1): 61-76.

Head, E., I. T. Lott, D. M. Wilcock and C. A. Lemere (2016). "Aging in Down Syndrome and the Development of Alzheimer's Disease Neuropathology." Curr Alzheimer Res **13**(1): 18-29.

Heim, M. H. (1999). "The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus." J Recept Signal Transduct Res **19**(1-4): 75-120.

Helmer, C., K. Peres, A. Pariente, F. Pasquier, S. Auriacombe, M. Poncet, F. Portet, O. Rouaud, K. Ritchie, C. Tzourio and J. F. Dartigues (2008). "Primary and secondary care consultations in elderly demented individuals in France. Results from the Three-City Study." Dement Geriatr Cogn Disord **26**(5): 407-415.

Heneka, M. T., M. J. Carson, J. El Khoury, G. E. Landreth, F. Brosseron, D. L. Feinstein, A. H. Jacobs, T. Wyss-Coray, J. Vitorica, R. M. Ransohoff, K. Herrup, S. A. Frautschy, B. Finsen, G. C. Brown, A. Verkhratsky, K. Yamanaka, J. Koistinaho, E. Latz, A. Halle, G. C. Petzold, T. Town, D. Morgan, M. L. Shinohara, V. H. Perry, C. Holmes, N. G. Bazan, D. J. Brooks, S. Hunot, B. Joseph, N. Deigendesch, O. Garaschuk, E. Boddeke, C. A. Dinarello, J. C. Breitner, G. M. Cole, D. T. Golenbock and M. P. Kummer (2015). "Neuroinflammation in Alzheimer's disease." Lancet Neurol **14**(4): 388-405.

Heneka, M. T., M. P. Kummer and E. Latz (2014). "Innate immune activation in neurodegenerative disease." Nat Rev Immunol **14**(7): 463-477.

Heneka, M. T., M. Sastre, L. Dumitrescu-Ozimek, I. Dewachter, J. Walter, T. Klockgether and F. Van Leuven (2005). "Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice." J Neuroinflammation **2**: 22.

Heppner, F. L., R. M. Ransohoff and B. Becher (2015). "Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease." Nat Rev Neurosci **16**(6): 358-372.

- Herrup, K. (2015). "The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis." Nat Neurosci **18**(6): 794-799.
- Hickman, S. E., E. K. Allison and J. El Khoury (2008). "Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice." J Neurosci **28**(33): 8354-8360.
- Higgins, L. S., R. Catalano, D. Quon and B. Cordell (1993). "Transgenic mice expressing human beta-APP751, but not mice expressing beta-APP695, display early Alzheimer's disease-like histopathology." Ann N Y Acad Sci **695**: 224-227.
- Higuchi, M., T. Ishihara, B. Zhang, M. Hong, A. Andreadis, J. Trojanowski and V. M. Lee (2002). "Transgenic mouse model of tauopathies with glial pathology and nervous system degeneration." Neuron **35**(3): 433-446.
- Himpel, S., P. Panzer, K. Eirnbter, H. Czajkowska, M. Sayed, L. C. Packman, T. Blundell, H. Kentrup, J. Grotzinger, H. G. Joost and W. Becker (2001). "Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A." Biochem J **359**(Pt 3): 497-505.
- Holmes, C., D. Boche, D. Wilkinson, G. Yadegarfar, V. Hopkins, A. Bayer, R. W. Jones, R. Bullock, S. Love, J. W. Neal, E. Zotova and J. A. Nicoll (2008). "Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial." Lancet **372**(9634): 216-223.
- Holmes, C., C. Cunningham, E. Zotova, J. Woolford, C. Dean, S. Kerr, D. Culliford and V. H. Perry (2009). "Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease." Neurology **73**(10): 768-774.
- Hone, E., I. J. Martins, J. Fonte and R. N. Martins (2003). "Apolipoprotein E influences amyloid-beta clearance from the murine periphery." J Alzheimers Dis **5**(1): 1-8.
- Hubbard, S. R. (1997). "Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog." Embo j **16**(18): 5572-5581.
- Hubbard, S. R. and W. T. Miller (2007). "Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling." Curr Opin Cell Biol **19**(2): 117-123.
- Huse, M. and J. Kuriyan (2002). "The conformational plasticity of protein kinases." Cell **109**(3): 275-282.
- Hyman, B. T., G. W. Van Hoesen, A. R. Damasio and C. L. Barnes (1984). "Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation." Science **225**(4667): 1168-1170.
- Ikeda, M., K. Hirayanagi, M. Arai, S. Kakuda, K. Makioka, N. Furuta, E. Takai, H. Kasahara, S. Tsukagoshi, Y. Fujita, M. Amari, M. Takatama, Y. Nakazato and K. Okamoto (2012). "Encephalopathy with amyloid angiopathy and numerous amyloid plaques with low levels of CSF Abeta1-40/Abeta1-42." Amyloid **19**(4): 186-190.
- Iqbal, K., C. Alonso Adel, S. Chen, M. O. Chohan, E. El-Akkad, C. X. Gong, S. Khatoon, B. Li, F. Liu, A. Rahman, H. Tanimukai and I. Grundke-Iqbal (2005). "Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies." Biochim Biophys Acta **1739**(2-3): 198-210.
- 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 **2**(8504): 421-426.
- Ittner, A., S. W. Chua, J. Bertz, A. Volkerling, J. van der Hoven, A. Gladbach, M. Przybyla, M. Bi, A. van Hummel, C. H. Stevens, S. Ippati, L. S. Suh, A. Macmillan, G. Sutherland, J. J. Kril, A. P. Silva, J. P.

Mackay, A. Poljak, F. Delerue, Y. D. Ke and L. M. Ittner (2016). "Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid-beta toxicity in Alzheimer's mice." Science **354**(6314): 904-908.

Ittner, L. M., T. Fath, Y. D. Ke, M. Bi, J. van Eersel, K. M. Li, P. Gunning and J. Gotz (2008). "Parkinsonism and impaired axonal transport in a mouse model of frontotemporal dementia." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(41): 15997-16002.

Ittner, L. M., Y. D. Ke, F. Delerue, M. Bi, A. Gladbach, J. van Eersel, H. Wolfing, B. C. Chieng, M. J. Christie, I. A. Napier, A. Eckert, M. Staufenbiel, E. Hardeman and J. Gotz (2010). "Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models." Cell **142**(3): 387-397.

Jack, C. R., Jr., D. S. Knopman, W. J. Jagust, R. C. Petersen, M. W. Weiner, P. S. Aisen, L. M. Shaw, P. Vemuri, H. J. Wiste, S. D. Weigand, T. G. Lesnick, V. S. Pankratz, M. C. Donohue and J. Q. Trojanowski (2013). "Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers." Lancet Neurol **12**(2): 207-216.

Jack, C. R., Jr., D. S. Knopman, W. J. Jagust, L. M. Shaw, P. S. Aisen, M. W. Weiner, R. C. Petersen and J. Q. Trojanowski (2010). "Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade." Lancet Neurol **9**(1): 119-128.

Jack, C. R., Jr., T. M. Therneau, H. J. Wiste, S. D. Weigand, D. S. Knopman, V. J. Lowe, M. M. Mielke, P. Vemuri, R. O. Roberts, M. M. Machulda, M. L. Senjem, J. L. Gunter, W. A. Rocca and R. C. Petersen (2016). "Transition rates between amyloid and neurodegeneration biomarker states and to dementia: a population-based, longitudinal cohort study." Lancet Neurol **15**(1): 56-64.

Janel, N., P. Alexopoulos, A. Badel, F. Lamari, A. C. Camproux, J. Lagarde, S. Simon, C. Feraudet-Tarisse, P. Lamourette, M. Arbones, J. L. Paul, B. Dubois, M. C. Potier, M. Sarazin and J. M. Delabar (2017). "Combined assessment of DYRK1A, BDNF and homocysteine levels as diagnostic marker for Alzheimer's disease." Transl Psychiatry **7**(6): e1154.

Janel, N., M. Sarazin, F. Corlier, H. Corne, L. C. de Souza, L. Hamelin, A. Aka, J. Lagarde, H. Blehaut, V. Hindie, J. C. Rain, M. L. Arbones, B. Dubois, M. C. Potier, M. Bottlaender and J. M. Delabar (2014). "Plasma DYRK1A as a novel risk factor for Alzheimer's disease." Transl Psychiatry **4**: e425.

Jang, S. M., S. Azebi, G. Soubigou and C. Muchardt (2014). "DYRK1A phosphorylates histone H3 to differentially regulate the binding of HP1 isoforms and antagonize HP1-mediated transcriptional repression." EMBO Rep **15**(6): 686-694.

Jankowsky, J. L., D. J. Fadale, J. Anderson, G. M. Xu, V. Gonzales, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, M. K. Lee, L. H. Younkin, S. L. Wagner, S. G. Younkin and D. R. Borchelt (2004). "Mutant presenilins specifically elevate the levels of the 42 residue beta-amyloid peptide in vivo: evidence for augmentation of a 42-specific gamma secretase." Hum Mol Genet **13**(2): 159-170.

Jankowsky, J. L., L. H. Younkin, V. Gonzales, D. J. Fadale, H. H. Slunt, H. A. Lester, S. G. Younkin and D. R. Borchelt (2007). "Rodent A beta modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice." J Biol Chem **282**(31): 22707-22720.

Jin, N., X. Yin, J. Gu, X. Zhang, J. Shi, W. Qian, Y. Ji, M. Cao, X. Gu, F. Ding, K. Iqbal, C. X. Gong and F. Liu (2015). "Truncation and Activation of Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation-regulated Kinase 1A by Calpain I: A MOLECULAR MECHANISM LINKED TO TAU PATHOLOGY IN ALZHEIMER DISEASE." J Biol Chem **290**(24): 15219-15237.

Jonsson, T., H. Stefansson, S. Steinberg, I. Jonsdottir, P. V. Jonsson, J. Snaedal, S. Bjornsson, J. Huttenlocher, A. I. Levey, J. J. Lah, D. Rujescu, H. Hampel, I. Giegling, O. A. Andreassen, K. Engedal, I. Ulstein, S. Djurovic, C. Ibrahim-Verbaas, A. Hofman, M. A. Ikram, C. M. van Duijn, U. Thorsteinsdottir, A.

Kong and K. Stefansson (2013). "Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease." N Engl J Med **368**(2): 107-116.

Kang, J., H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther and B. Muller-Hill (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." Nature **325**(6106): 733-736.

Kentrup, H., W. Becker, J. Heukelbach, A. Wilmes, A. Schurmann, C. Huppertz, H. Kainulainen and H. G. Joost (1996). "Dyrk, a dual specificity protein kinase with unique structural features whose activity is dependent on tyrosine residues between subdomains VII and VIII." J Biol Chem **271**(7): 3488-3495.

Kervern, M., A. Angeli, O. Nicole, F. Leveille, B. Parent, V. Villette, A. Buisson and P. Dutar (2012). "Selective impairment of some forms of synaptic plasticity by oligomeric amyloid-beta peptide in the mouse hippocampus: implication of extrasynaptic NMDA receptors." J Alzheimers Dis **32**(1): 183-196.

Kettenmann, H., U. K. Hanisch, M. Noda and A. Verkhratsky (2011). "Physiology of microglia." Physiol Rev **91**(2): 461-553.

Khor, B., J. D. Gagnon, G. Goel, M. I. Roche, K. L. Conway, K. Tran, L. N. Aldrich, T. B. Sundberg, A. M. Paterson, S. Mordecai, D. Dombkowski, M. Schirmer, P. H. Tan, A. K. Bhan, R. Roychoudhuri, N. P. Restifo, J. J. O'Shea, B. D. Medoff, A. F. Shamji, S. L. Schreiber, A. H. Sharpe, S. Y. Shaw and R. J. Xavier (2015). "The kinase DYRK1A reciprocally regulates the differentiation of Th17 and regulatory T cells." Elife **4**.

Kidd, M. (1963). "Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease." Nature **197**: 192-193.

Kii, I., Y. Sumida, T. Goto, R. Sonamoto, Y. Okuno, S. Yoshida, T. Kato-Sumida, Y. Koike, M. Abe, Y. Nonaka, T. Ikura, N. Ito, H. Shibuya, T. Hosoya and M. Hagiwara (2016). "Selective inhibition of the kinase DYRK1A by targeting its folding process." Nat Commun **7**: 11391.

Kim, H., S. O. Sablin and R. R. Ramsay (1997). "Inhibition of monoamine oxidase A by beta-carboline derivatives." Arch Biochem Biophys **337**(1): 137-142.

Kim, S. H., R. Vlkolinsky, N. Cairns, M. Fountoulakis and G. Lubec (2001). "The reduction of NADH ubiquinone oxidoreductase 24- and 75-kDa subunits in brains of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease." Life Sci **68**(24): 2741-2750.

Kimura, R., K. Kamino, M. Yamamoto, A. Nuripa, T. Kida, H. Kazui, R. Hashimoto, T. Tanaka, T. Kudo, H. Yamagata, Y. Tabara, T. Miki, H. Akatsu, K. Kosaka, E. Funakoshi, K. Nishitomi, G. Sakaguchi, A. Kato, H. Hattori, T. Uema and M. Takeda (2007). "The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease." Hum Mol Genet **16**(1): 15-23.

Kimura, R. and M. Ohno (2009). "Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model." Neurobiol Dis **33**(2): 229-235.

Kitazawa, M., R. Medeiros and F. M. Laferla (2012). "Transgenic mouse models of Alzheimer disease: developing a better model as a tool for therapeutic interventions." Curr Pharm Des **18**(8): 1131-1147.

Kloskowska, E., T. M. Pham, T. Nilsson, S. Zhu, J. Oberg, A. Codita, L. A. Pedersen, J. T. Pedersen, K. Malkiewicz, B. Winblad, R. Folkesson and E. Benedikz (2010). "Cognitive impairment in the Tg6590 transgenic rat model of Alzheimer's disease." J Cell Mol Med **14**(6b): 1816-1823.

Klunemann, H. H., W. Fronhofer, H. Wurster, W. Fischer, B. Ibach and H. E. Klein (2002). "Alzheimer's second patient: Johann F. and his family." Ann Neurol **52**(4): 520-523.

Kohli, V., W. Gao, C. A. Camargo, Jr. and P. A. Clavien (1997). "Calpain is a mediator of preservation-reperfusion injury in rat liver transplantation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 9354-9359.

Koivisto, A. M., I. Hallikainen, T. Valimaki, K. Hongisto, A. Hiltunen, P. Karppi, J. Sivenius, H. Soininen and J. Martikainen (2016). "Early psychosocial intervention does not delay institutionalization in persons with mild Alzheimer disease and has impact on neither disease progression nor caregivers' well-being: ALSOVA 3-year follow-up." Int J Geriatr Psychiatry **31**(3): 273-283.

Kojro, E. and F. Fahrenholz (2005). "The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases." Subcell Biochem **38**: 105-127.

Kondo, A., K. Shahpasand, R. Mannix, J. Qiu, J. Moncaster, C. H. Chen, Y. Yao, Y. M. Lin, J. A. Driver, Y. Sun, S. Wei, M. L. Luo, O. Albayram, P. Huang, A. Rotenberg, A. Ryo, L. E. Goldstein, A. Pascual-Leone, A. C. McKee, W. Meehan, X. Z. Zhou and K. P. Lu (2015). "Antibody against early driver of neurodegeneration cis P-tau blocks brain injury and tauopathy." Nature **523**(7561): 431-436.

Kontsekova, E., N. Zilka, B. Kovacech, R. Skrabana and M. Novak (2014). "Identification of structural determinants on tau protein essential for its pathological function: novel therapeutic target for tau immunotherapy in Alzheimer's disease." Alzheimers Res Ther **6**(4): 45.

Kopeikina, K. J., B. T. Hyman and T. L. Spires-Jones (2012). "Soluble forms of tau are toxic in Alzheimer's disease." Transl Neurosci **3**(3): 223-233.

Kornev, A. P. and S. S. Taylor (2010). "Defining the conserved internal architecture of a protein kinase." Biochim Biophys Acta **1804**(3): 440-444.

Krolak-Salmon, P. (2010). "Quelle place pour les biomarqueurs dans le diagnostic de la maladie d'Alzheimer et des maladies apparentées ?" Psychol NeuroPsychiatr Vieil **8** (1) : 25-31.

Kurabayashi, N., M. D. Nguyen and K. Sanada (2015). "DYRK1A overexpression enhances STAT activity and astroglialogenesis in a Down syndrome mouse model." EMBO Rep **16**(11): 1548-1562.

Kurbatskaya, K., E. C. Phillips, C. L. Croft, G. Dentoni, M. M. Hughes, M. A. Wade, S. Al-Sarraj, C. Troakes, M. J. O'Neill, B. G. Perez-Nievas, D. P. Hanger and W. Noble (2016). "Upregulation of calpain activity precedes tau phosphorylation and loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease brain." **4**: 34.

Kurt, M. A., D. C. Davies, M. Kidd, K. Duff and D. R. Howlett (2003). "Hyperphosphorylated tau and paired helical filament-like structures in the brains of mice carrying mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin-1 transgenes." Neurobiol Dis **14**(1): 89-97.

LaFerla, F. M., K. N. Green and S. Oddo (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." Nat Rev Neurosci **8**(7): 499-509.

Langbaum, J. B., A. S. Fleisher, K. Chen, N. Ayutyanont, F. Lopera, Y. T. Quiroz, R. J. Caselli, P. N. Tariot and E. M. Reiman (2013). "Ushering in the study and treatment of preclinical Alzheimer disease." Nat Rev Neurol **9**(7): 371-381.

Languille, S., S. Blanc, O. Blin, C. I. Canale, A. Dal-Pan, G. Devau, M. Dhenain, O. Dorieux, J. Epelbaum, D. Gomez, I. Hardy, P. Y. Henry, E. A. Irving, J. Marchal, N. Mestre-Frances, M. Perret, J. L. Picq, F. Pifferi, A. Rahman, E. Schenker, J. Terrien, M. Thery, J. M. Verdier and F. Aujard (2012). "The grey mouse lemur: a non-human primate model for ageing studies." Ageing Res Rev **11**(1): 150-162.

Lasagna-Reeves, C. A., D. L. Castillo-Carranza, U. Sengupta, A. L. Clos, G. R. Jackson and R. Kayed (2011). "Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice." Mol Neurodegener **6**: 39.

Laskowitz, D. T., H. Sheng, R. D. Bart, K. A. Joyner, A. D. Roses and D. S. Warner (1997). "Apolipoprotein E-deficient mice have increased susceptibility to focal cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **17**(7): 753-758.

Laurent, C., S. Burnouf and B. Ferry (2016). "A2A adenosine receptor deletion is protective in a mouse model of Tauopathy." **21**(1): 97-107.

Lazarov, O., G. A. Morfini, G. Pigino, A. Gadadhar, X. Chen, J. Robinson, H. Ho, S. T. Brady and S. S. Sisodia (2007). "Impairments in fast axonal transport and motor neuron deficits in transgenic mice expressing familial Alzheimer's disease-linked mutant presenilin 1." J Neurosci **27**(26): 7011-7020.

Lecoutey, C., D. Hedou, T. Freret, P. Giannoni, F. Gaven, M. Since, V. Bouet, C. Ballandonne, S. Corvaisier, A. Malzert Freon, S. Mignani, T. Cresteil, M. Boulouard, S. Claeysen, C. Rochais and P. Dallemagne (2014). "Design of donecopride, a dual serotonin subtype 4 receptor agonist/acetylcholinesterase inhibitor with potential interest for Alzheimer's disease treatment." **111**(36): E3825-3830.

Lee, J. E. and P. L. Han (2013). "An update of animal models of Alzheimer disease with a reevaluation of plaque depositions." Exp Neurobiol **22**(2): 84-95.

Lee, M. S., S. C. Kao, C. A. Lemere, W. Xia, H. C. Tseng, Y. Zhou, R. Neve, M. K. Ahljianian and L. H. Tsai (2003). "APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation." J Cell Biol **163**(1): 83-95.

Lee, M. S., Y. T. Kwon, M. Li, J. Peng, R. M. Friedlander and L. H. Tsai (2000). "Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain." Nature **405**(6784): 360-364.

Leibson, C. L., W. A. Rocca, V. A. Hanson, R. Cha, E. Kokmen, P. C. O'Brien and P. J. Palumbo (1997). "The risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study." Ann N Y Acad Sci **826**: 422-427.

Leon, W. C., F. Canneva, V. Partridge, S. Allard, M. T. Ferretti, A. DeWilde, F. Vercauteren, R. Atifeh, A. Ducatenzeiler, W. Klein, M. Szyf, L. Alhonen and A. C. Cuellar (2010). "A novel transgenic rat model with a full Alzheimer's-like amyloid pathology displays pre-plaque intracellular amyloid-beta-associated cognitive impairment." J Alzheimers Dis **20**(1): 113-126.

Levy-Lahad, E., W. Wasco, P. Poorkaj, D. M. Romano, J. Oshima, W. H. Pettingell, C. E. Yu, P. D. Jondro, S. D. Schmidt, K. Wang and et al. (1995). "Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus." Science **269**(5226): 973-977.

Levy, E., M. D. Carman, I. J. Fernandez-Madrid, M. D. Power, I. Lieberburg, S. G. van Duinen, G. T. Bots, W. Luyendijk and B. Frangione (1990). "Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type." Science **248**(4959): 1124-1126.

Lewis, J., D. W. Dickson, W. L. Lin, L. Chisholm, A. Corral, G. Jones, S. H. Yen, N. Sahara, L. Skipper, D. Yager, C. Eckman, J. Hardy, M. Hutton and E. McGowan (2001). "Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP." Science **293**(5534): 1487-1491.

Lewis, J., E. McGowan, J. Rockwood, H. Melrose, P. Nacharaju, M. Van Slegtenhorst, K. Gwinn-Hardy, M. Paul Murphy, M. Baker, X. Yu, K. Duff, J. Hardy, A. Corral, W. L. Lin, S. H. Yen, D. W. Dickson, P. Davies and M. Hutton (2000). "Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein." Nat Genet **25**(4): 402-405.

- Li, C. and J. Gotz (2017). "Somatodendritic accumulation of Tau in Alzheimer's disease is promoted by Fyn-mediated local protein translation." *36*(21): 3120-3138.
- Li, S., M. Jin, T. Koeglsperger, N. E. Shepardson, G. M. Shankar and D. J. Selkoe (2011). "Soluble Aβ oligomers inhibit long-term potentiation through a mechanism involving excessive activation of extrasynaptic NR2B-containing NMDA receptors." *J Neurosci* **31**(18): 6627-6638.
- Li, X., Y. Kumar, H. Zempel, E. M. Mandelkow, J. Biernat and E. Mandelkow (2011). "Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration." *Embo j* **30**(23): 4825-4837.
- Liddel, S. A., K. A. Guttenplan, L. E. Clarke, F. C. Bennett, C. J. Bohlen, L. Schirmer, M. L. Bennett, A. E. Munch, W. S. Chung, T. C. Peterson, D. K. Wilton, A. Frouin, B. A. Napier, N. Panicker, M. Kumar, M. S. Buckwalter, D. H. Rowitch, V. L. Dawson, T. M. Dawson, B. Stevens and B. A. Barres (2017). "Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia." *Nature* **541**(7638): 481-487.
- Lindberg, R. A., A. M. Quinn and T. Hunter (1992). "Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do?" *Trends Biochem Sci* **17**(3): 114-119.
- Liu, C. C., C. W. Tsai, F. Deak, J. Rogers, M. Penuliar, Y. M. Sung, J. N. Maher, Y. Fu, X. Li, H. Xu, S. Estus, H. S. Hoe, J. D. Fryer, T. Kanekiyo and G. Bu (2014). "Deficiency in LRP6-mediated Wnt signaling contributes to synaptic abnormalities and amyloid pathology in Alzheimer's disease." *Neuron* **84**(1): 63-77.
- Liu, F., Z. Liang, J. Wegiel, Y. W. Hwang, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, N. Ramakrishna and C. X. Gong (2008). "Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome." *Faseb j* **22**(9): 3224-3233.
- Lochhead, P. A., G. Sibbet, N. Morrice and V. Cleghon (2005). "Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs." *Cell* **121**(6): 925-936.
- Lopez, E. M., K. F. Bell, A. Ribeiro-da-Silva and A. C. Cuervo (2004). "Early changes in neurons of the hippocampus and neocortex in transgenic rats expressing intracellular human a-β." *J Alzheimers Dis* **6**(4): 421-431; discussion 443-429.
- Love, R. (2004). "Good fats prevent dendritic damage in mouse model of AD." *Lancet Neurol* **3**(11): 636.
- Love, S. and J. S. Miners (2016). "Cerebrovascular disease in ageing and Alzheimer's disease." *Acta Neuropathol* **131**(5): 645-658.
- Luchsinger, J. A., M. X. Tang, Y. Stern, S. Shea and R. Mayeux (2001). "Diabetes mellitus and risk of Alzheimer's disease and dementia with stroke in a multiethnic cohort." *Am J Epidemiol* **154**(7): 635-641.
- Lue, L. F., Y. M. Kuo, A. E. Roher, L. Brachova, Y. Shen, L. Sue, T. Beach, J. H. Kurth, R. E. Rydel and J. Rogers (1999). "Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease." *Am J Pathol* **155**(3): 853-862.
- Luna-Munoz, J., L. Chavez-Macias, F. Garcia-Sierra and R. Mena (2007). "Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* **12**(4): 365-375.
- Mackenzie, I. R., R. S. McLachlan, C. S. Kubu and L. A. Miller (1996). "Prospective neuropsychological assessment of nondemented patients with biopsy proven senile plaques." *Neurology* **46**(2): 425-429.

- Mackic, J. B., J. Bading, J. Ghiso, L. Walker, T. Wisniewski, B. Frangione and B. V. Zlokovic (2002). "Circulating amyloid-beta peptide crosses the blood-brain barrier in aged monkeys and contributes to Alzheimer's disease lesions." Vascul Pharmacol **38**(6): 303-313.
- Magara, F., U. Muller, Z. W. Li, H. P. Lipp, C. Weissmann, M. Stagljar and D. P. Wolfer (1999). "Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the beta-amyloid-precursor protein." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4656-4661.
- Mandrekar, S., Q. Jiang, C. Y. Lee, J. Koenigsnecht-Talboo, D. M. Holtzman and G. E. Landreth (2009). "Microglia mediate the clearance of soluble A β through fluid phase macropinocytosis." J Neurosci **29**(13): 4252-4262.
- Mann, D. M. and M. M. Esiri (1989). "The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome." J Neurol Sci **89**(2-3): 169-179.
- Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter and S. Sudarsanam (2002). "The protein kinase complement of the human genome." Science **298**(5600): 1912-1934.
- Maphis, N., G. Xu, O. N. Kokiko-Cochran, S. Jiang, A. Cardona, R. M. Ransohoff, B. T. Lamb and K. Bhaskar (2015). "Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain." Brain **138**(Pt 6): 1738-1755.
- Margallo-Lana, M. L., P. B. Moore, D. W. Kay, R. H. Perry, B. E. Reid, T. P. Berney and S. P. Tyrer (2007). "Fifteen-year follow-up of 92 hospitalized adults with Down's syndrome: incidence of cognitive decline, its relationship to age and neuropathology." J Intellect Disabil Res **51**(Pt. 6): 463-477.
- Marmot, M. G., G. D. Smith, S. Stansfeld, C. Patel, F. North, J. Head, I. White, E. Brunner and A. Feeney (1991). "Health inequalities among British civil servants: the Whitehall II study." Lancet **337**(8754): 1387-1393.
- Marti, E., X. Altafaj, M. Dierssen, S. de la Luna, V. Fotaki, M. Alvarez, M. Perez-Riba, I. Ferrer and X. Estivill (2003). "Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system." Brain Res **964**(2): 250-263.
- Martin, L., X. Latypova and F. Terro (2011). "Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease." Neurochem Int **58**(4): 458-471.
- Masliah, E. (1995). "Mechanisms of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease." Histol Histopathol **10**(2): 509-519.
- Masliah, E., A. Sisk, M. Mallory and D. Games (2001). "Neurofibrillary pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein." J Neuropathol Exp Neurol **60**(4): 357-368.
- Masters, C. L. and K. Beyreuther (1987). "Neuronal origin of cerebral amyloidogenic proteins: their role in Alzheimer's disease and unconventional virus diseases of the nervous system." Ciba Found Symp **126**: 49-64.
- Mattson, M. P., B. Cheng, A. R. Culwell, F. S. Esch, I. Lieberburg and R. E. Rydel (1993). "Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein." Neuron **10**(2): 243-254.
- Maurice, T., B. P. Lockhart and A. Privat (1996). "Amnesia induced in mice by centrally administered beta-amyloid peptides involves cholinergic dysfunction." Brain Res **706**(2): 181-193.

- Mazanetz, M. P. and P. M. Fischer (2007). "Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases." Nat Rev Drug Discov **6**(6): 464-479.
- McCade, D., G. Savage and S. L. Naismith (2011). "Review of emotion recognition in mild cognitive impairment." Dement Geriatr Cogn Disord **32**(4): 257-266.
- McDade, E. and R. J. Bateman (2017). "Stop Alzheimer's before it starts." Nature **547**(7662): 153-155.
- McElyea, S. D., J. M. Starbuck, D. M. Tumbleson-Brink, E. Harrington, J. D. Blazek, A. Ghoneima, K. Kula and R. J. Roper (2016). "Influence of prenatal EGCG treatment and Dyrk1a dosage reduction on craniofacial features associated with Down syndrome." Hum Mol Genet **25**(22): 4856-4869.
- McGeer, P. L. and E. G. McGeer (2015). "Targeting microglia for the treatment of Alzheimer's disease." Expert Opin Ther Targets **19**(4): 497-506.
- McLean, C. A., R. A. Cherny, F. W. Fraser, S. J. Fuller, M. J. Smith, K. Beyreuther, A. I. Bush and C. L. Masters (1999). "Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease." Ann Neurol **46**(6): 860-866.
- Medeiros, R., M. Kitazawa, M. A. Chabrier, D. Cheng, D. Baglietto-Vargas, A. Kling, A. Moeller, K. N. Green and F. M. LaFerla (2012). "Calpain inhibitor A-705253 mitigates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline in aged 3xTgAD mice." Am J Pathol **181**(2): 616-625.
- Miller-Thomas, M. M., A. L. Sipe, T. L. Benzinger, J. McConathy, S. Connolly and K. E. Schwetye (2016). "Multimodality Review of Amyloid-related Diseases of the Central Nervous System." Radiographics **36**(4): 1147-1163.
- Moller, H. J. and M. B. Graeber (1998). "The case described by Alois Alzheimer in 1911. Historical and conceptual perspectives based on the clinical record and neurohistological sections." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **248**(3): 111-122.
- Monro, O. R., J. B. Mackic, S. Yamada, M. B. Segal, J. Ghiso, C. Maurer, M. Calero, B. Frangione and B. V. Zlokovic (2002). "Substitution at codon 22 reduces clearance of Alzheimer's amyloid-beta peptide from the cerebrospinal fluid and prevents its transport from the central nervous system into blood." Neurobiol Aging **23**(3): 405-412.
- Mookherjee, P., P. S. Green, G. S. Watson, M. A. Marques, K. Tanaka, K. D. Meeker, J. S. Meabon, N. Li, P. Zhu, V. G. Olson and D. G. Cook (2011). "GLT-1 loss accelerates cognitive deficit onset in an Alzheimer's disease animal model." J Alzheimers Dis **26**(3): 447-455.
- Morales-Garcia, J. A., R. Luna-Medina, S. Alonso-Gil, M. Sanz-Sancristobal, V. Palomo, C. Gil, A. Santos, A. Martinez and A. Perez-Castillo (2012). "Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes adult hippocampal neurogenesis in vitro and in vivo." ACS Chem Neurosci **3**(11): 963-971.
- Moreira, R. O., S. C. Campos and A. L. Soldera (2013). "Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: from physiopathology to treatment implications." Diabetes Metab Res Rev.
- Morris, M., G. M. Knudsen and S. Maeda (2015). "Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice." **18**(8): 1183-1189.
- Morris, M., S. Maeda, K. Vossel and L. Mucke (2011). "The many faces of tau." Neuron **70**(3): 410-426.
- Morris, R. G. M. (1981). "Spatial localization does not require the presence of local cues." Learning and Motivation **Volume 12, Issue 2, May 1981, Pages 239-260**.

Mudher, A., M. Colin, S. Dujardin, M. Medina, I. Dewachter, S. M. Alavi Naini, E. M. Mandelkow, E. Mandelkow, L. Buee, M. Goedert and J. P. Brion (2017). "What is the evidence that tau pathology spreads through prion-like propagation?" Acta Neuropathol Commun **5**(1): 99.

Mufson, E. J., S. E. Counts, S. E. Perez and S. D. Ginsberg (2008). "Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications." Expert Rev Neurother **8**(11): 1703-1718.

Murray, M. M., S. L. Bernstein, V. Nyugen, M. M. Condron, D. B. Teplow and M. T. Bowers (2009). "Amyloid beta protein: Abeta40 inhibits Abeta42 oligomerization." J Am Chem Soc **131**(18): 6316-6317.

Mutisya, E. M., A. C. Bowling and M. F. Beal (1994). "Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease." J Neurochem **63**(6): 2179-2184.

Nabers, A., J. Ollesch, J. Schartner, C. Kotting, J. Genius, H. Hafermann, H. Klafki, K. Gerwert and J. Wiltfang (2016). "Amyloid-beta-Secondary Structure Distribution in Cerebrospinal Fluid and Blood Measured by an Immuno-Infrared-Sensor: A Biomarker Candidate for Alzheimer's Disease." Anal Chem **88**(5): 2755-2762.

Nabers, A., L. Perna, J. Lange, U. Mons, J. Schartner, J. Guldenhaupt, K. U. Saum, S. Janelidze, B. Holleczek, D. Rujescu and O. Hansson (2018). "Amyloid blood biomarker detects Alzheimer's disease." **10**(5).

Naert, G., V. Ferre, J. Meunier, E. Keller, S. Malmstrom, L. Givalois, F. Carreaux, J. P. Bazureau and T. Maurice (2015). "Leucettine L41, a DYRK1A-preferential DYRKs/CLKs inhibitor, prevents memory impairments and neurotoxicity induced by oligomeric Abeta peptide administration in mice." Eur Neuropsychopharmacol.

Nakamura, A., N. Kaneko, V. L. Villemagne, T. Kato, J. Doecke, V. Dore, C. Fowler, Q. X. Li, R. Martins, C. Rowe, T. Tomita, K. Matsuzaki, K. Ishii, K. Ishii, Y. Arahata, S. Iwamoto, K. Ito, K. Tanaka, C. L. Masters and K. Yanagisawa (2018). "High performance plasma amyloid-beta biomarkers for Alzheimer's disease." Nature **554**(7691): 249-254.

Nguyen, T. L., C. Fruit, Y. Herault, L. Meijer and T. Besson (2017). "Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) inhibitors: a survey of recent patent literature." Expert Opin Ther Pat **27**(11): 1183-1199.

Nistor, M., M. Don, M. Parekh, F. Sarsoza, M. Goodus, G. E. Lopez, C. Kawas, J. Leverenz, E. Doran, I. T. Lott, M. Hill and E. Head (2007). "Alpha- and beta-secretase activity as a function of age and beta-amyloid in Down syndrome and normal brain." Neurobiol Aging **28**(10): 1493-1506.

Norris, C. M., I. Kadish, E. M. Blalock, K. C. Chen, V. Thibault, N. M. Porter, P. W. Landfield and S. D. Kraner (2005). "Calcineurin triggers reactive/inflammatory processes in astrocytes and is upregulated in aging and Alzheimer's models." J Neurosci **25**(18): 4649-4658.

Oddo, S., L. Billings, J. P. Kesslak, D. H. Cribbs and F. M. LaFerla (2004). "Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome." Neuron **43**(3): 321-332.

Oddo, S., A. Caccamo, K. N. Green, K. Liang, L. Tran, Y. Chen, F. M. Leslie and F. M. LaFerla (2005). "Chronic nicotine administration exacerbates tau pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 3046-3051.

Oddo, S., A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari and F. M. LaFerla (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." Neuron **39**(3): 409-421.

Oddo, S., A. Caccamo, L. Tran, M. P. Lambert, C. G. Glabe, W. L. Klein and F. M. LaFerla (2006). "Temporal profile of amyloid-beta (Abeta) oligomerization in an in vivo model of Alzheimer disease. A link between Abeta and tau pathology." J Biol Chem **281**(3): 1599-1604.

Ogawa, Y., Y. Nonaka, T. Goto, E. Ohnishi, T. Hiramatsu, I. Kii, M. Yoshida, T. Ikura, H. Onogi, H. Shibuya, T. Hosoya, N. Ito and M. Hagiwara (2010). "Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A." Nat Commun **1**: 86.

Okamura, N., S. Furumoto, M. T. Fodero-Tavoletti, R. S. Mulligan, R. Harada, P. Yates, S. Pejoska, Y. Kudo, C. L. Masters, K. Yanai, C. C. Rowe and V. L. Villemagne (2014). "Non-invasive assessment of Alzheimer's disease neurofibrillary pathology using 18F-THK5105 PET." Brain **137**(Pt 6): 1762-1771.

Okui, M., T. Ide, K. Morita, E. Funakoshi, F. Ito, K. Ogita, Y. Yoneda, J. Kudoh and N. Shimizu (1999). "High-level expression of the Mnb/Dyrk1A gene in brain and heart during rat early development." Genomics **62**(2): 165-171.

Onyango, I. G., J. Dennis and S. M. Khan (2016). "Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease and the Rationale for Bioenergetics Based Therapies." Aging Dis **7**(2): 201-214.

Ortiz-Abalia, J., I. Sahun, X. Altafaj, N. Andreu, X. Estivill, M. Dierssen and C. Fillat (2008). "Targeting Dyrk1A with AAVshRNA attenuates motor alterations in TgDyrk1A, a mouse model of Down syndrome." Am J Hum Genet **83**(4): 479-488.

Pan, X. D., Y. G. Zhu, N. Lin, J. Zhang, Q. Y. Ye, H. P. Huang and X. C. Chen (2011). "Microglial phagocytosis induced by fibrillar beta-amyloid is attenuated by oligomeric beta-amyloid: implications for Alzheimer's disease." Mol Neurodegener **6**: 45.

Park, J., W. J. Song and K. C. Chung (2009). "Function and regulation of Dyrk1A: towards understanding Down syndrome." Cell Mol Life Sci **66**(20): 3235-3240.

Parsons, M. P. and L. A. Raymond (2014). "Extrasynaptic NMDA receptor involvement in central nervous system disorders." Neuron **82**(2): 279-293.

Patton, R. L., W. M. Kalback, C. L. Esh, T. A. Kokjohn, G. D. Van Vickle, D. C. Luehrs, Y. M. Kuo, J. Lopez, D. Brune, I. Ferrer, E. Masliah, A. J. Newel, T. G. Beach, E. M. Castano and A. E. Roher (2006). "Amyloid-beta peptide remnants in AN-1792-immunized Alzheimer's disease patients: a biochemical analysis." Am J Pathol **169**(3): 1048-1063.

Pawson, T. and M. Kofler (2009). "Kinome signaling through regulated protein-protein interactions in normal and cancer cells." Curr Opin Cell Biol **21**(2): 147-153.

Perdomini, M., B. Belbellaa, L. Monassier, L. Reutenauer, N. Messaddeq, N. Cartier, R. G. Crystal, P. Aubourg and H. Puccio (2014). "Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich's ataxia." Nat Med **20**(5): 542-547.

Perl, D. P. (2010). "Neuropathology of Alzheimer's disease." Mt Sinai J Med **77**(1): 32-42.

Phaneuf, M. and M. T. Bal-Craquin (2007). "La maladie d'Alzheimer et la prise en charge infirmière." Paris : Elsevier Masson.

Pilcher, H. (2006). "Alzheimer's mouse model raises treatment queries." Lancet Neurol **5**(1): 28.

Pines, A. (2014). "Surgical menopause and cognitive decline." Climacteric **17**(5): 580-582.

Poirier, J. (2005). "Apolipoprotein E, cholesterol transport and synthesis in sporadic Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **26**(3): 355-361.

Polanco, J. C., C. Li, L. G. Bodea, R. Martinez-Marmol, F. A. Meunier and J. Gotz (2018). "Amyloid-beta and tau complexity - towards improved biomarkers and targeted therapies." Nat Rev Neurol **14**(1): 22-39.

Polanco, J. C., C. Li, N. Durisic, R. Sullivan and J. Gotz (2018). "Exosomes taken up by neurons hijack the endosomal pathway to spread to interconnected neurons." **6**(1): 10.

Polydoro, M., V. I. Dzhala, A. M. Pooler, S. B. Nicholls, A. P. McKinney, L. Sanchez, R. Pitstick, G. A. Carlson, K. J. Staley, T. L. Spires-Jones and B. T. Hyman (2014). "Soluble pathological tau in the entorhinal cortex leads to presynaptic deficits in an early Alzheimer's disease model." Acta Neuropathol **127**(2): 257-270.

Portha, B., M. H. Giroix, C. Turrel-Cuzin, H. Le-Stunff and J. Movassat (2012). "The GK rat: a prototype for the study of non-overweight type 2 diabetes." Methods Mol Biol **933**: 125-159.

Potier, B., J. M. Billard, S. Riviere, P. M. Sinet, I. Denis, G. Champeil-Potokar, B. Grintal, A. Jouvenceau, M. Kollen and P. Dutar (2010). "Reduction in glutamate uptake is associated with extrasynaptic NMDA and metabotropic glutamate receptor activation at the hippocampal CA1 synapse of aged rats." Aging Cell **9**(5): 722-735.

Prokop, S., K. R. Miller and F. L. Heppner (2013). "Microglia actions in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **126**(4): 461-477.

Qian, X., B. Hamad and G. Dias-Lalcaca (2015). "The Alzheimer disease market." Nat Rev Drug Discov **14**(10): 675-676.

Rajan, K. B., R. S. Wilson, J. Weuve, L. L. Barnes and D. A. Evans (2015). "Cognitive impairment 18 years before clinical diagnosis of Alzheimer disease dementia." Neurology **85**(10): 898-904.

Rechsteiner, M. and S. W. Rogers (1996). "PEST sequences and regulation by proteolysis." Trends Biochem Sci **21**(7): 267-271.

Regan, P. and T. Piers (2015). "Tau phosphorylation at serine 396 residue is required for hippocampal LTD." **35**(12): 4804-4812.

Roberson, E. D., K. Scarce-Levie, J. J. Palop, F. Yan, I. H. Cheng, T. Wu, H. Gerstein, G. Q. Yu and L. Mucke (2007). "Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model." Science **316**(5825): 750-754.

Rogaeva, E., Y. Meng, J. H. Lee, Y. Gu, T. Kawarai, F. Zou, T. Katayama, C. T. Baldwin, R. Cheng, H. Hasegawa, F. Chen, N. Shibata, K. L. Lunetta, R. Pardossi-Piquard, C. Bohm, Y. Wakutani, L. A. Cupples, K. T. Cuenco, R. C. Green, L. Pinessi, I. Rainero, S. Sorbi, A. Bruni, R. Duara, R. P. Friedland, R. Inzelberg, W. Hampe, H. Bujo, Y. Q. Song, O. M. Andersen, T. E. Willnow, N. Graff-Radford, R. C. Petersen, D. Dickson, S. D. Der, P. E. Fraser, G. Schmitt-Ulms, S. Younkin, R. Mayeux, L. A. Farrer and P. St George-Hyslop (2007). "The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease." Nat Genet **39**(2): 168-177.

Rogers, S., R. Wells and M. Rechsteiner (1986). "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis." Science **234**(4774): 364-368.

Roy, M., C. Cardoso, O. Dorieux, C. Malgorn, S. Epelbaum, F. Petit, A. Kraska, E. Brouillet, B. Delatour, M. Perret, F. Aujard and M. Dhenain (2015). "Age-associated evolution of plasmatic amyloid in mouse lemur primates: relationship with intracellular amyloid deposition." Neurobiol Aging **36**(1): 149-156.

Rudrabhatla, P., H. Jaffe and H. C. Pant (2011). "Direct evidence of phosphorylated neuronal intermediate filament proteins in neurofibrillary tangles (NFTs): phosphoproteomics of Alzheimer's NFTs." Faseb j **25**(11): 3896-3905.

Ruiz-Opazo, N., K. S. Kosik, L. V. Lopez, P. Bagamasbad, L. R. Ponce and V. L. Herrera (2004). "Attenuated hippocampus-dependent learning and memory decline in transgenic TgAPPswe Fischer-344 rats." Mol Med **10**(1-6): 36-44.

Ryoo, S. R., H. J. Cho, H. W. Lee, H. K. Jeong, C. Radnaabazar, Y. S. Kim, M. J. Kim, M. Y. Son, H. Seo, S. H. Chung and W. J. Song (2008). "Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease." J Neurochem **104**(5): 1333-1344.

Ryoo, S. R., H. K. Jeong, C. Radnaabazar, J. J. Yoo, H. J. Cho, H. W. Lee, I. S. Kim, Y. H. Cheon, Y. S. Ahn, S. H. Chung and W. J. Song (2007). "DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease." J Biol Chem **282**(48): 34850-34857.

Ryu, Y. S., S. Y. Park, M. S. Jung, S. H. Yoon, M. Y. Kwen, S. Y. Lee, S. H. Choi, C. Radnaabazar, M. K. Kim, H. Kim, K. Kim, W. J. Song and S. H. Chung (2010). "Dyrk1A-mediated phosphorylation of Presenilin 1: a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease." J Neurochem **115**(3): 574-584.

Sabbagh, J. J. and C. A. Dickey (2016). "The Metamorphic Nature of the Tau Protein: Dynamic Flexibility Comes at a Cost." Front Neurosci **10**: 3.

Sala Frigerio, C. and B. De Strooper (2016). "Alzheimer's Disease Mechanisms and Emerging Roads to Novel Therapeutics." Annu Rev Neurosci **39**: 57-79.

Salloway, S., R. Sperling and H. R. Brashear (2014). "Phase 3 trials of solanezumab and bapineuzumab for Alzheimer's disease." N Engl J Med **370**(15): 1460.

Scheff, S. W. and D. A. Price (1998). "Synaptic density in the inner molecular layer of the hippocampal dentate gyrus in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **57**(12): 1146-1153.

Scheltens, P., K. Blennow, M. M. Breteler, B. de Strooper, G. B. Frisoni, S. Salloway and W. M. Van der Flier (2016). "Alzheimer's disease." Lancet **388**(10043): 505-517.

Schindowski, K., A. Bretteville, K. Leroy, S. Begard, J. P. Brion, M. Hamdane and L. Buee (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." Am J Pathol **169**(2): 599-616.

Schmechel, D. E., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, B. J. Crain, C. M. Hulette, S. H. Joo, M. A. Pericak-Vance, D. Goldgaber and A. D. Roses (1993). "Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9649-9653.

Selkoe, D. J. (1991). "Alzheimer's disease. In the beginning." Nature **354**(6353): 432-433.

Selkoe, D. J. (2002). "Alzheimer's disease is a synaptic failure." Science **298**(5594): 789-791.

Selkoe, D. J. and J. Hardy (2016). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years." EMBO Mol Med **8**(6): 595-608.

Selznick, L. A., D. M. Holtzman, B. H. Han, M. Gokden, A. N. Srinivasan, E. M. Johnson, Jr. and K. A. Roth (1999). "In situ immunodetection of neuronal caspase-3 activation in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **58**(9): 1020-1026.

Sereno, L., M. Coma, M. Rodriguez, P. Sanchez-Ferrer, M. B. Sanchez, I. Gich, J. M. Agullo, M. Perez, J. Avila, C. Guardia-Laguarta, J. Clarimon, A. Lleo and T. Gomez-Isla (2009). "A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo." Neurobiol Dis **35**(3): 359-367.

Serpente, M., R. Bonsi, E. Scarpini and D. Galimberti (2014). "Innate immune system and inflammation in Alzheimer's disease: from pathogenesis to treatment." Neuroimmunomodulation **21**(2-3): 79-87.

Serrano-Pozo, A., M. P. Frosch, E. Masliah and B. T. Hyman (2011). "Neuropathological alterations in Alzheimer disease." Cold Spring Harb Perspect Med **1**(1): a006189.

Sherrington, R., E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, C. Lin, G. Li, K. Holman, T. Tsuda, L. Mar, J. F. Foncin, A. C. Bruni, M. P. Montesi, S. Sorbi, I. Rainero, L. Pinessi, L. Nee, I. Chumakov, D. Pollen, A. Brookes, P. Sanseau, R. J. Polinsky, W. Wasco, H. A. Da Silva, J. L. Haines, M. A. Perkicak-Vance, R. E. Tanzi, A. D. Roses, P. E. Fraser, J. M. Rommens and P. H. St George-Hyslop (1995). "Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease." Nature **375**(6534): 754-760.

Shi, Y., K. Yamada, S. A. Liddelow, S. T. Smith, L. Zhao, W. Luo, R. M. Tsai, S. Spina, L. T. Grinberg, J. C. Rojas, G. Gallardo, K. Wang, J. Roh, G. Robinson, M. B. Finn, H. Jiang, P. M. Sullivan, C. Baufeld, M. W. Wood, C. Sutphen, L. McCue, C. Xiong, J. L. Del-Aguila, J. C. Morris, C. Cruchaga, A. M. Fagan, B. L. Miller, A. L. Boxer, W. W. Seeley, O. Butovsky, B. A. Barres, S. M. Paul and D. M. Holtzman (2017). "ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy." Nature **549**(7673): 523-527.

Shin, R. W., K. Ogino, A. Shimabuku, T. Taki, H. Nakashima, T. Ishihara and T. Kitamoto (2007). "Amyloid precursor protein cytoplasmic domain with phospho-Thr668 accumulates in Alzheimer's disease and its transgenic models: a role to mediate interaction of Abeta and tau." Acta Neuropathol **113**(6): 627-636.

Shoghi-Jadid, K., G. W. Small, E. D. Agdeppa, V. Kepe, L. M. Ercoli, P. Siddarth, S. Read, N. Satyamurthy, A. Petric, S. C. Huang and J. R. Barrio (2002). "Localization of neurofibrillary tangles and beta-amyloid plaques in the brains of living patients with Alzheimer disease." Am J Geriatr Psychiatry **10**(1): 24-35.

Shumway, S. D., M. Maki and S. Miyamoto (1999). "The PEST domain of IkappaBalpha is necessary and sufficient for in vitro degradation by mu-calpain." J Biol Chem **274**(43): 30874-30881.

Simard, A. R., D. Soulet, G. Gowing, J. P. Julien and S. Rivest (2006). "Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease." Neuron **49**(4): 489-502.

Simic, G., M. Babic Leko, S. Wray, C. Harrington, I. Delalle, N. Jovanov-Milosevic, D. Bazadona, L. Buee, R. de Silva, G. Di Giovanni, C. Wischik and P. R. Hof (2016). "Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies." Biomolecules **6**(1): 6.

Singh-Manoux, A., A. Dugravot, A. Fournier, J. Abell, K. Ebmeier, M. Kivimaki and S. Sabia (2017). "Trajectories of Depressive Symptoms Before Diagnosis of Dementia: A 28-Year Follow-up Study." JAMA Psychiatry **74**(7): 712-718.

Small, S. A. and K. Duff (2008). "Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis." Neuron **60**(4): 534-542.

Smith, B., F. Medda, V. Gokhale, T. Dunckley and C. Hulme (2012). "Recent advances in the design, synthesis, and biological evaluation of selective DYRK1A inhibitors: a new avenue for a disease modifying treatment of Alzheimer's?" ACS Chem Neurosci **3**(11): 857-872.

Soeda, E., D. X. Hou, K. Osoegawa, Y. Atsuchi, T. Yamagata, T. Shimokawa, H. Kishida, E. Soeda, S. Okano, I. Chumakov and et al. (1995). "Cosmid assembly and anchoring to human chromosome 21." Genomics **25**(1): 73-84.

Sofroniew, M. V. (2014). "Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators." Neuroscientist **20**(2): 160-172.

Sondag, C. M., G. Dhawan and C. K. Combs (2009). "Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia." J Neuroinflammation **6**: 1.

Song, W. J., S. H. Chung and D. M. Kurnit (1997). "The murine Dyrk protein maps to chromosome 16, localizes to the nucleus, and can form multimers." Biochem Biophys Res Commun **231**(3): 640-644.

Song, W. J., L. R. Sternberg, C. Kasten-Sportes, M. L. Keuren, S. H. Chung, A. C. Slack, D. E. Miller, T. W. Glover, P. W. Chiang, L. Lou and D. M. Kurnit (1996). "Isolation of human and murine homologues of the Drosophila minibrain gene: human homologue maps to 21q22.2 in the Down syndrome "critical region"." Genomics **38**(3): 331-339.

Souchet, B., F. Guedj, Z. Penke-Verdier, F. Daubigney, A. Duchon, Y. Herault, J. C. Bizot, N. Janel, N. Creau, B. Delatour and J. M. Delabar (2015). "Pharmacological correction of excitation/inhibition imbalance in Down syndrome mouse models." Front Behav Neurosci **9**: 267.

Souchet, B., F. Guedj, I. Sahun, A. Duchon, F. Daubigney, A. Badel, Y. Yanagawa, M. J. Barallobre, M. Dierssen, E. Yu, Y. Herault, M. Arbones, N. Janel, N. Creau and J. M. Delabar (2014). "Excitation/inhibition balance and learning are modified by Dyrk1a gene dosage." Neurobiol Dis **69**: 65-75.

Souchet B., A. M., Billoir B., Lecanu L., Tada S., Braudeau J. (2018). "Is it time to rethink the Alzheimer's disease drug development strategy by targeting its silent phase?" NEURAL REGENERATION RESEARCH **in press**.

Sperling, R. A., P. S. Aisen, L. A. Beckett, D. A. Bennett, S. Craft, A. M. Fagan, T. Iwatsubo, C. R. Jack, Jr., J. Kaye, T. J. Montine, D. C. Park, E. M. Reiman, C. C. Rowe, E. Siemers, Y. Stern, K. Yaffe, M. C. Carrillo, B. Thies, M. Morrison-Bogorad, M. V. Wagster and C. H. Phelps (2011). "Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease." Alzheimers Dement **7**(3): 280-292.

Spillantini, M. G. and M. Goedert (2013). "Tau pathology and neurodegeneration." Lancet Neurol **12**(6): 609-622.

Spires-Jones, T. L., K. J. Kopeikina, R. M. Koffie, A. de Calignon and B. T. Hyman (2011). "Are tangles as toxic as they look?" J Mol Neurosci **45**(3): 438-444.

Spires-Jones, T. L., W. H. Stoothoff, A. de Calignon, P. B. Jones and B. T. Hyman (2009). "Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue." Trends Neurosci **32**(3): 150-159.

Spires, T. L., J. D. Orne, K. SantaCruz, R. Pitstick, G. A. Carlson, K. H. Ashe and B. T. Hyman (2006). "Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy." Am J Pathol **168**(5): 1598-1607.

Stagni, F., A. Giacomini, S. Guidi, E. Ciani, E. Ragazzi, M. Filonzi, R. De lasio, R. Rimondini and R. Bartesaghi (2015). "Long-term effects of neonatal treatment with fluoxetine on cognitive performance in Ts65Dn mice." Neurobiol Dis **74**: 204-218.

Strittmatter, W. J., A. M. Saunders, D. Schmechel, M. Pericak-Vance, J. Enghild, G. S. Salvesen and A. D. Roses (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 1977-1981.

Sweatt, J. D. (2016). "Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances." J Neurochem **139 Suppl 2**: 179-199.

Tahtouh, T., J. M. Elkins, P. Filippakopoulos, M. Soundararajan, G. Burgy, E. Durieu, C. Cochet, R. S. Schmid, D. C. Lo, F. Delhommel, A. E. Oberholzer, L. H. Pearl, F. Carreaux, J. P. Bazureau, S. Knapp and L. Meijer (2012). "Selectivity, cocrystal structures, and neuroprotective properties of leucettines, a family of protein kinase inhibitors derived from the marine sponge alkaloid leucettamine B." J Med Chem **55**(21): 9312-9330.

Takeda, S., N. Sato, K. Uchio-Yamada, K. Sawada, T. Kunieda, D. Takeuchi, H. Kurinami, M. Shinohara, H. Rakugi and R. Morishita (2010). "Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(15): 7036-7041.

Talantova, M., S. Sanz-Blasco, X. Zhang, P. Xia, M. W. Akhtar, S. Okamoto, G. Dziejczapolski, T. Nakamura, G. Cao, A. E. Pratt, Y. J. Kang, S. Tu, E. Molokanova, S. R. McKercher, S. A. Hires, H. Sason, D. G. Stouffer, M. W. Buczynski, J. P. Solomon, S. Michael, E. T. Powers, J. W. Kelly, A. Roberts, G. Tong, T. Fang-Newmeyer, J. Parker, E. A. Holland, D. Zhang, N. Nakanishi, H. S. Chen, H. Wolosker, Y. Wang, L. H. Parsons, R. Ambasadhan, E. Masliah, S. F. Heinemann, J. C. Pina-Crespo and S. A. Lipton (2013). "Abeta induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(27): E2518-2527.

Tanemura, K., M. Murayama, T. Akagi, T. Hashikawa, T. Tominaga, M. Ichikawa, H. Yamaguchi and A. Takashima (2002). "Neurodegeneration with tau accumulation in a transgenic mouse expressing V337M human tau." J Neurosci **22**(1): 133-141.

Tang, Y. and W. Le (2016). "Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases." Mol Neurobiol **53**(2): 1181-1194.

Tanzi, R. E. and L. Bertram (2005). "Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective." Cell **120**(4): 545-555.

Tanzi, R. E., J. F. Gusella, P. C. Watkins, G. A. Bruns, P. St George-Hyslop, M. L. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D. M. Kurnit and R. L. Neve (1987). "Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus." Science **235**(4791): 880-884.

Tarkowski, E., N. Andreasen, A. Tarkowski and K. Blennow (2003). "Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **74**(9): 1200-1205.

Teller, J. K., C. Russo, L. M. DeBusk, G. Angelini, D. Zaccheo, F. Dagna-Bricarelli, P. Scartezzini, S. Bertolini, D. M. Mann, M. Tabaton and P. Gambetti (1996). "Presence of soluble amyloid beta-peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome." Nat Med **2**(1): 93-95.

Terry, R. D., E. Masliah, D. P. Salmon, N. Butters, R. DeTeresa, R. Hill, L. A. Hansen and R. Katzman (1991). "Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment." Ann Neurol **30**(4): 572-580.

Thal, D. R., U. Rub, M. Orantes and H. Braak (2002). "Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD." Neurology **58**(12): 1791-1800.

Tomiya, T., S. Matsuyama, H. Iso, T. Umeda, H. Takuma, K. Ohnishi, K. Ishibashi, R. Teraoka, N. Sakama, T. Yamashita, K. Nishitsuji, K. Ito, H. Shimada, M. P. Lambert, W. L. Klein and H. Mori (2010). "A mouse model of amyloid beta oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, and neuronal loss in vivo." J Neurosci **30**(14): 4845-4856.

Tosto, G. and C. Reitz (2013). "Genome-wide association studies in Alzheimer's disease: a review." Curr Neurol Neurosci Rep **13**(10): 381.

Tremblay, M. E., B. Stevens, A. Sierra, H. Wake, A. Bessis and A. Nimmerjahn (2011). "The role of microglia in the healthy brain." J Neurosci **31**(45): 16064-16069.

Trinchese, F., M. Fa, S. Liu, H. Zhang, A. Hidalgo, S. D. Schmidt, H. Yamaguchi, N. Yoshii, P. M. Mathews, R. A. Nixon and O. Arancio (2008). "Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease." J Clin Invest **118**(8): 2796-2807.

Troquier, L., R. Caillierez, S. Burnouf, F. J. Fernandez-Gomez, M. E. Grosjean, N. Zommer, N. Sergeant, S. Schraen-Maschke, D. Blum and L. Buee (2012). "Targeting phospho-Ser422 by active Tau Immunotherapy in the THY_{Tau22} mouse model: a suitable therapeutic approach." Curr Alzheimer Res **9**(4): 397-405.

Tyas, S. L., R. B. Tate, K. Wooldrage, J. Manfreda and L. A. Strain (2006). "Estimating the incidence of dementia: the impact of adjusting for subject attrition using health care utilization data." Ann Epidemiol **16**(6): 477-484.

Ubersax, J. A. and J. E. Ferrell, Jr. (2007). "Mechanisms of specificity in protein phosphorylation." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(7): 530-541.

Varon, D., D. A. Loewenstein, E. Potter, M. T. Greig, J. Agron, Q. Shen, W. Zhao, M. Celeste Ramirez, I. Santos, W. Barker, H. Potter and R. Duara (2011). "Minimal atrophy of the entorhinal cortex and hippocampus: progression of cognitive impairment." Dement Geriatr Cogn Disord **31**(4): 276-283.

Vazquez-Higuera, J. L., P. Sanchez-Juan, E. Rodriguez-Rodriguez, I. Mateo, A. Pozueta, A. Frank, I. Sastre, F. Valdivieso, J. Berciano, M. J. Bullido and O. Combarros (2009). "DYRK1A genetic variants are not linked to Alzheimer's disease in a Spanish case-control cohort." BMC Med Genet **10**: 129.

Villemagne, V. L., S. Burnham, P. Bourgeat, B. Brown, K. A. Ellis, O. Salvado, C. Szoeker, S. L. Macaulay, R. Martins, P. Maruff, D. Ames, C. C. Rowe and C. L. Masters (2013). "Amyloid beta deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study." Lancet Neurol **12**(4): 357-367.

Walls, K. C., R. R. Ager, V. Vasilevko, D. Cheng, R. Medeiros and F. M. LaFerla (2014). "p-Tau immunotherapy reduces soluble and insoluble tau in aged 3xTg-AD mice." Neurosci Lett **575**: 96-100.

Walte, A., K. Ruben, R. Birner-Gruenberger, C. Preisinger, S. Bamberg-Lemper, N. Hilz, F. Bracher and W. Becker (2013). "Mechanism of dual specificity kinase activity of DYRK1A." Febs j **280**(18): 4495-4511.

Wan, J., A. K. Fu, F. C. Ip, H. K. Ng, J. Hugon, G. Page, J. H. Wang, K. O. Lai, Z. Wu and N. Y. Ip (2010). "Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid-induced neuronal cell death: implications in Alzheimer's disease." J Neurosci **30**(20): 6873-6881.

Wang, H. Y., D. H. Lee, M. R. D'Andrea, P. A. Peterson, R. P. Shank and A. B. Reitz (2000). "beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology." J Biol Chem **275**(8): 5626-5632.

- Wang, Y., V. Balaji, S. Kaniyappan, L. Kruger, S. Irsen, K. Tepper, R. Chandupatla, W. Maetzler, A. Schneider, E. Mandelkow and E. M. Mandelkow (2017). "The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes." Mol Neurodegener **12**(1): 5.
- Wang, Y., M. Cella, K. Mallinson, J. D. Ulrich, K. L. Young, M. L. Robinette, S. Gilfillan, G. M. Krishnan, S. Sudhakar, B. H. Zinselmeyer, D. M. Holtzman, J. R. Cirrito and M. Colonna (2015). "TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model." Cell **160**(6): 1061-1071.
- Wang, Z. C., J. Zhao and S. Li (2013). "Dysregulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors induced by amyloid-beta." Neurosci Bull **29**(6): 752-760.
- Wegiel, J., K. Dowjat, W. Kaczmarek, I. Kuchna, K. Nowicki, J. Frackowiak, B. Mazur Koleccka, J. Wegiel, W. P. Silverman, B. Reisberg, M. DeLeon, T. Wisniewski, C. X. Gong, F. Liu, T. Adayev, M. C. Chen-Hwang and Y. W. Hwang (2008). "The role of overexpressed DYRK1A protein in the early onset of neurofibrillary degeneration in Down syndrome." Acta Neuropathol **116**(4): 391-407.
- Wegiel, J., C. X. Gong and Y. W. Hwang (2011). "The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases." Febs j **278**(2): 236-245.
- Wegiel, J., W. Kaczmarek, M. Barua, I. Kuchna, K. Nowicki, K. C. Wang, J. Wegiel, S. M. Yang, J. Frackowiak, B. Mazur-Koleccka, W. P. Silverman, B. Reisberg, I. Monteiro, M. de Leon, T. Wisniewski, A. Dalton, F. Lai, Y. W. Hwang, T. Adayev, F. Liu, K. Iqbal, I. G. Iqbal and C. X. Gong (2011). "Link between DYRK1A overexpression and several-fold enhancement of neurofibrillary degeneration with 3-repeat tau protein in Down syndrome." J Neuropathol Exp Neurol **70**(1): 36-50.
- Wegiel, J., I. Kuchna, K. Nowicki, J. Frackowiak, K. Dowjat, W. P. Silverman, B. Reisberg, M. DeLeon, T. Wisniewski, T. Adayev, M. C. Chen-Hwang and Y. W. Hwang (2004). "Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain." Brain Res **1010**(1-2): 69-80.
- Wegiel, J., K. C. Wang, H. Imaki, R. Rubenstein, A. Wronska, M. Osuchowski, W. J. Lipinski, L. C. Walker and H. LeVine (2001). "The role of microglial cells and astrocytes in fibrillar plaque evolution in transgenic APP(SW) mice." Neurobiol Aging **22**(1): 49-61.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo and M. W. Kirschner (1975). "A protein factor essential for microtubule assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(5): 1858-1862.
- Weller, R. O., D. Boche and J. A. Nicoll (2009). "Microvasculature changes and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease and their potential impact on therapy." Acta Neuropathol **118**(1): 87-102.
- Weller, R. O. and J. A. Nicoll (2003). "Cerebral amyloid angiopathy: pathogenesis and effects on the ageing and Alzheimer brain." Neurol Res **25**(6): 611-616.
- Wemeau, J. L. and M. Ladsous (2017). "[Levothyrox((R)): The teachings of a senseless polemic]." Presse Med **46**(10): 887-889.
- Weston, P. S. J., J. M. Nicholas, S. M. D. Henley, Y. Liang, K. Macpherson, E. Donnachie, J. M. Schott, M. N. Rossor, S. J. Crutch, C. R. Butler, A. Z. Zeman and N. C. Fox (2018). "Accelerated long-term forgetting in presymptomatic autosomal dominant Alzheimer's disease: a cross-sectional study." Lancet Neurol **17**(2): 123-132.
- Wiechmann, S., H. Czajkowska, K. de Graaf, J. Grotzinger, H. G. Joost and W. Becker (2003). "Unusual function of the activation loop in the protein kinase DYRK1A." Biochem Biophys Res Commun **302**(2): 403-408.

Wiltfang, J., H. Esselmann, M. Bibl, M. Hull, H. Hampel, H. Kessler, L. Frolich, J. Schroder, O. Peters, F. Jessen, C. Luckhaus, R. Perneczky, H. Jahn, M. Fiszer, J. M. Maler, R. Zimmermann, R. Bruckmoser, J. Kornhuber and P. Lewczuk (2007). "Amyloid beta peptide ratio 42/40 but not A beta 42 correlates with phospho-Tau in patients with low- and high-CSF A beta 40 load." J Neurochem **101**(4): 1053-1059.

Wisniewski, H. M. and A. Rabe (1986). "Discrepancy between Alzheimer-type neuropathology and dementia in persons with Down's syndrome." Ann N Y Acad Sci **477**: 247-260.

Wisniewski, K. E., H. M. Wisniewski and G. Y. Wen (1985). "Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome." Ann Neurol **17**(3): 278-282.

Wittmann, C. W., M. F. Wszolek, J. M. Shulman, P. M. Salvaterra, J. Lewis, M. Hutton and M. B. Feany (2001). "Tauopathy in Drosophila: neurodegeneration without neurofibrillary tangles." Science **293**(5530): 711-714.

Wolber, G., T. Seidel, F. Bendix and T. Langer (2008). "Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design." Drug Discov Today **13**(1-2): 23-29.

Woods, Y. L., P. Cohen, W. Becker, R. Jakes, M. Goedert, X. Wang and C. G. Proud (2001). "The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase." Biochem J **355**(Pt 3): 609-615.

Wu, P., T. E. Nielsen and M. H. Clausen (2015). "FDA-approved small-molecule kinase inhibitors." Trends Pharmacol Sci **36**(7): 422-439.

Wu, P., T. E. Nielsen and M. H. Clausen (2016). "Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs." Drug Discov Today **21**(1): 5-10.

Xue, Q. S. and W. J. Streit (2011). "Microglial pathology in Down syndrome." Acta Neuropathol **122**(4): 455-466.

Yaish, P., A. Gazit, C. Gilon and A. Levitzki (1988). "Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors." Science **242**(4880): 933-935.

Yamada, M. (2015). "Cerebral amyloid angiopathy: emerging concepts." J Stroke **17**(1): 17-30.

Yoon, S. S. and S. A. Jo (2012). "Mechanisms of Amyloid-beta Peptide Clearance: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease." Biomol Ther (Seoul) **20**(3): 245-255.

Yoon, T., J. Okada, M. W. Jung and J. J. Kim (2008). "Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats." Learn Mem **15**(3): 97-105.

Yoshiyama, Y., M. Higuchi, B. Zhang, S. M. Huang, N. Iwata, T. C. Saido, J. Maeda, T. Suhara, J. Q. Trojanowski and V. M. Lee (2007). "Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model." Neuron **53**(3): 337-351.

Zerbinatti, C. V., S. E. Wahrle, H. Kim, J. A. Cam, K. Bales, S. M. Paul, D. M. Holtzman and G. Bu (2006). "Apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor-related protein facilitate intraneuronal Abeta42 accumulation in amyloid model mice." J Biol Chem **281**(47): 36180-36186.

Zhao, Y., X. Wu, X. Li, L. L. Jiang, X. Gui, Y. Liu, Y. Sun, B. Zhu, J. C. Pina-Crespo, M. Zhang, N. Zhang, X. Chen, G. Bu, Z. An, T. Y. Huang and H. Xu (2018). "TREM2 Is a Receptor for beta-Amyloid that Mediates Microglial Function." Neuron **97**(5): 1023-1031.e1027.

Zheng, J., E. A. Trafny, D. R. Knighton, N. H. Xuong, S. S. Taylor, L. F. Ten Eyck and J. M. Sowadski (1993). "2.2 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **49**(Pt 3): 362-365.

Zhu, G., Y. Liu and S. Shaw (2005). "Protein kinase specificity. A strategic collaboration between kinase peptide specificity and substrate recruitment." Cell Cycle **4**(1): 52-56.

Zou, Y., S. Lim, K. Lee, X. Deng and E. Friedman (2003). "Serine/threonine kinase Mirk/Dyrk1B is an inhibitor of epithelial cell migration and is negatively regulated by the Met adaptor Ran-binding protein M." J Biol Chem **278**(49): 49573-49581.

Implications de la protéine DYRK1A dans la pathologie Alzheimer et développement de stratégies thérapeutiques

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, phase préclinique, DYRK1A, modèle animal et médecine personnalisée

Résumé : La **maladie d'Alzheimer (MA)** est actuellement conceptualisée comme un continuum : la démence représentant la conséquence clinique d'une longue période où s'accumule des éléments pathologiques dans le cerveau d'individus indemnes de symptômes comportementaux. Les futures thérapies devront idéalement débiter avant l'apparition des symptômes mais le manque actuel d'outils reproduisant avec pertinence cette **phase préclinique** empêche leurs développements. Dans ce travail de thèse, nous avons d'abord levé ce verrou technologique. Un nouveau modèle a été créé dans lequel la production de **peptides A β solubles** en quantité faible, mais néanmoins suffisante pour induire une hyper-phosphorylation des protéines Tau, perturbe la fonction cognitive bien avant l'apparition d'éléments caractéristiques de la MA (plaques amyloïdes, dégénérescences neurofibrillaires, inflammation).

Cette avancée technologique, nous a ensuite permis d'évaluer l'implication de la protéine kinase **DYRK1A** et le potentiel thérapeutique de molécules modulant ses fonctions dans l'ensemble de la pathologie Alzheimer. Nos résultats démontrent que l'inhibition de son activité kinase réduit l'hyper-phosphorylation des protéines Tau et améliore la fonction mnésique chez **notre animal modélisant la phase préclinique de la MA**. A contrario, nous démontrons que DYRK1A est sensible à un clivage protéolytique dans le cerveau de patients atteints de démence Alzheimer et acquiert de nouvelles fonctions biologiques. Dans ce contexte, la prévention de ce clivage réduit l'inflammation et restaure les déficits cognitifs chez **la souris modélisant la phase clinique de la MA**. En ciblant différentes phases de la MA, ces données ouvrent donc la voie à la **médecine personnalisée** et à des stratégies de traitement plus ciblées.

Involvements of DYRK1A protein in Alzheimer's pathology and development of therapeutic strategies

Keywords: Alzheimer's disease, preclinical phase, DYRK1A, animal model and personalized medicine

Abstract: Current view conceptualizes **Alzheimer's disease (AD)** as a *continuum*, with dementia representing the clinical outcome of a long period of cumulative pathological events in the brain of individual with free cognitive symptoms. New therapies for AD should ideally be started before the onset of symptoms but the lack of suitable tools mimicking **preclinical stage** of AD limits their future evaluations. In this work, we break this technological limitation. A new animal model have been developed in which a small amount of **soluble A β forms** able to induce hyper-phosphorylation of Tau is sufficient to disturb cognitive function long before classical lesions occur (amyloid plaques, neurofibrillary tangles and inflammation).

This technological breakthrough allows us to evaluate involvement of the protein kinase **DYRK1A** and therapeutic potential of molecules modifying its functions in different stages of AD. Our results demonstrate that inhibition of its kinase activity reduces hyper-phosphorylation of Tau proteins and alleviates memory function in our **preclinical AD-like animal model**. In contrast, we provide evidences that DYRK1A undergoes a cleavage in brain of patient with clinical AD and gains new biological functions. Prevention of this proteolysis reduces inflammation and restores cognitive impairments in a **clinical AD-like mice model**. By targeting distinct phases of the disease, these data open avenue for **personalized medicine** and more-targeted treatment strategies.

